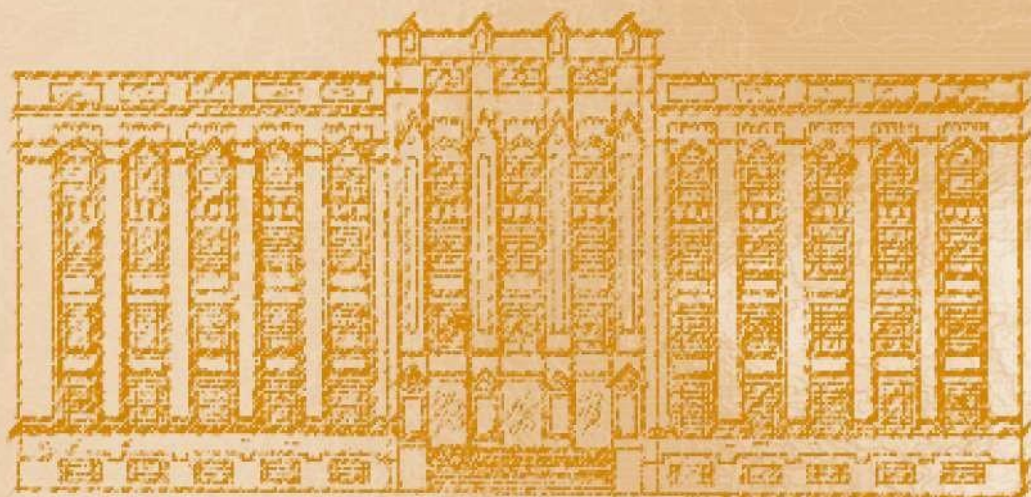


ISSN: 1983-3814 (*on-line*)
RIALA6

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ



Volume 83 número único, 2024





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

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Volume 83, 2024

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 Chefe

Adriana Bugno

Editor Adjunto

Adriano Abbud

Editor Convidado

Márcia Liane Buzzo

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
2024, 83

RIALA 6
ISSN 1983-3814 versão *on line*
ISSN 0073-9855 versão impressa
ISSN 2176-3844 CD-ROM

CDD₁₈ 614.07205

(*) ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE BIBLIOTECÁRIOS. Grupo de Bibliotecários Biomédicos. Normas para catalogação de publicações seriadas especializadas, São Paulo, Ed. Polígono, 1072.

Indexadores

Base de Dados

LILACS – Literatura Latino-Americana em Ciências da Saúde
BVS – Rede de Informação e Conhecimento – RIC
Google Acadêmico
Index Medicus Global
BVS-Vet
Toxicology
Abstracts
WorldCat
National Library of Medicine – NIH

Diretórios

CARINIANA (Rede Brasileira de Serviços de Preservação Digital)
DIADORIM (Diretório de Políticas Editoriais das Revistas Científicas Brasileira)
LATINDEX
MIGUILIM (Diretório de Revistas Científicas Eletrônicas Brasileiras)
ROAD (Diretório de Recursos Acadêmicos de Acesso Aberto)

Índices e Portais

Portal de Revistas Científicas da SES – SP
Periódicos Capes
Vetindex (Periódicos Brasileiros em Medicina Veterinária e Zootecnia)

Associada/Membro

ABEC (Associação Brasileira de Editores Científicos)
Crossref
DORA

Métrica

PlumX Metrics

Redes Sociais Acadêmicas

ResearchGate

Redes Sociais

LinkedIn

Acesso on-line / *online access*. Texto integral / *full text*
<https://periodicos.saude.sp.gov.br/index.php/RIAL/login>

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

ARTIGO ORIGINAL/ORIGINAL ARTICLE

e39267 Análise da influência de determinantes meteorológicos na periodicidade de epidemias de dengue em Porto Alegre

Analysis of the influence of meteorological determinants on the periodicity of dengue epidemics in Porto Alegre

Rafaela Breda, Amanda de Souza da Motta

e39226 Instruments to evaluate the profile of food and enteral formulation handlers

Instrumentos para avaliação do perfil do manipulador de alimentos e de formulações enterais

Julia Fernanda Costa Kozow, Caroline Opolski Medeiros, Rayane Luizi da Costa, Lize Stangarlin-Fiori

e49325 Endotoxin test by recombinant Factor C for 0.9% sodium chloride injection

Teste de endotoxina por Fator C recombinante para solução injetável de cloreto de sódio 0,9%

Ellen Gameiro Hilinski, Daniela Dal Molim Ghisleni, Carla Lilian de Agostini Utescher, Wagner Quintilio, Adriana Aparecida Buzzo

Almodovar, Adriana Bugno, Terezinha de Jesus Andreoli Pinto

e39379 Aplicação de farinhas de coprodutos de frutas em bolos sem glúten

Application of fruit co-product flours in gluten-free cakes

Sabrina Alves Ramos, Daniela Gomes de Moura, Bárbara Eduarda de Laia Queiroz, Rafaela das Dores Pereira, Michely Capobiango,

Marcio Schmiele, Tatiana Nunes Amaral

e40492 Perfil epidemiológico dos pacientes com leishmaniose visceral na Região Nordeste do Brasil no período de 2012-2022

Epidemiological profile of patients with visceral leishmaniasis in the Northeast Region of Brazil in the period 2012-2022

Victor Hugo Ferraz da Silva, Leonardo Luiz de Freitas, Yago Abilio Silva Santos, Diego dos Passos Santiago, Aline Dalarme Gomes

Galvão, Sara Maria da Cruz Lima, Beatriz Ferreira Couto, Alexandre Machado de Andrade

COMUNICAÇÃO BREVE/ BRIEF COMMUNICATION

e40274 Utilização da Microscopia Eletrônica de Varredura na detecção de matérias estranhas em águas envasadas

Scanning Electron Microscopy as a tool to detect and quantify microscopic physical hazards in bottled mineral Waters

Celli Rodrigues Muniz, Jaqueline Rabelo de Lima, Adroaldo Guimarães Rossetti

COMENTÁRIOS TÉCNICO-CIENTÍFICOS/TECHNICAL-SCIENTIFIC COMMENTS

e39429 Integridade na pesquisa: ética profissional dos cientistas. O papel do Comitê de Integridade na Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz

Research integrity: professional ethics of scientists. The role of the Research Integrity Committee at the Adolfo Lutz Institute

Bráulio Caetano Machado, Márcia Jorge Castejon, Adriana Aparecida Buzzo Almodovar, Andrea Gobetti Coelho Bombonatte, Andréia

Moreira dos Santos Carmo, Giselle Ibetta Silva López Lopes, Regina Maria Catarino

NOTA CIENTÍFICA

e40020 Produção de anticorpos e citocinas em resposta ao SARS-CoV-2: comparação entre imunidade vacinal e híbrida

Antibody and cytokine production in response to SARS-CoV-2: vaccine versus hybrid immunity comparison

Júlia Bombini Faustini, Ana Paula Campanelli, Thais Fernanda de Campos Fraga da Silva, Vânia Nieto Brito de Souza

COLABORADORES

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

SUBMISSÕES - INSTRUÇÕES AOS AUTORES

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

Análise da influência de determinantes meteorológicos na periodicidade de epidemias de dengue em Porto Alegre

Analysis of the influence of meteorological determinants on the periodicity of dengue epidemics in Porto Alegre

Rafaela Breda¹ , Amanda de Souza da Motta^{2*} 

¹ Programa de Residência Integrada Multiprofissional em Saúde Coletiva, Escola de Enfermagem, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

² Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

*Autor de correspondência/Corresponding author: amanda.motta@ufrgs.br

Recebido/Received: 16.07.2023

Aceito/Accepted: 22.01.2024

Publicação/Publication: 01.02.2024

Editor Chefe: Adriana Bugno

RESUMO

A incidência da dengue, doença viral transmitida pelo mosquito *Aedes aegypti*, vem crescendo em Porto Alegre ao longo dos anos, com recorde de casos registrados em 2022. Epidemias da doença parecem ocorrer de forma cíclica no município, com registros a cada três anos. Dada a influência de fatores climáticos no ciclo de vida do vetor, este trabalho buscou analisar a influência de determinantes meteorológicos na periodicidade de epidemias de dengue na capital gaúcha entre 2010 e 2022. Análises descritivas foram realizadas para averiguar o padrão dos indicadores climáticos e dos casos de dengue ao longo dos anos, ao passo que análises estatísticas foram feitas para avaliar a correlação entre os fatores climáticos e os casos autóctones registrados entre 2016 e 2022. Os resultados obtidos não apontaram padrões meteorológicos que se repetem a cada três anos e que poderiam explicar a ciclicidade observada. Ainda, não foram constatadas correlações entre temperatura, umidade e pluviosidade com casos autóctones de dengue no município, ao menos em nível quadrimestral. Para além destas análises, constatou-se expressivo aumento de casos em 2022, apesar dos esforços de controle desempenhados pelo poder público, o que aponta a necessidade de maior investimento em educação em saúde para a população.

Palavras-chave. *Aedes aegypti*, Clima, Dengue, Epidemias, Meteorologia.

ABSTRACT

The incidence of dengue, a viral disease transmitted by the *Aedes aegypti* mosquito, has been increasing in Porto Alegre over the years, with a record number of cases reported in 2022. Epidemics of the disease seem to occur cyclically in the city, with reports every three years. Given the influence of climatic factors on the vector's life cycle, this study aimed to analyze the influence of meteorological determinants on the periodicity of dengue epidemics in Porto Alegre between 2010 and 2022. Descriptive analyses were used to investigate the pattern of climatic indicators and dengue cases over the years, while statistical analyses were performed to evaluate the correlation between climatic factors and autochthonous cases registered between 2016 and 2022. The results did not point out meteorological patterns that repeat every three years and could explain the observed cyclicity. Furthermore, no correlations were found between temperature, humidity and rainfall and autochthonous dengue cases in the city, at least on a four-monthly basis. Beyond these analyses, a significant increase in dengue cases was observed in 2022, despite the efforts of the public authorities to control the disease, which highlights the need for greater investment in health education for the population.

Keywords. *Aedes aegypti*, Climate, Dengue, Epidemics, Meteorology.

INTRODUÇÃO

A dengue é uma doença transmitida através da picada de mosquitos fêmea da espécie *Aedes aegypti* infectadas pelo Vírus da Dengue, sendo a arbovirose urbana mais prevalente nas Américas¹. É a doença viral transmitida por mosquitos com a maior disseminação geográfica, estando presente de forma generalizada ao longo dos trópicos, com variações locais de risco devido a condições climáticas e sociais, sendo considerada um problema de saúde pública^{2,3}.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) e com a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), estima-se que 390 milhões de infecções por dengue ocorram anualmente, com 500 mil hospitalizações e taxa de fatalidade de 2,5%². No Brasil, a circulação viral ocorre de forma expressiva desde a década de 1980 e, em 2022, o país registrou 1.450.270 casos prováveis da doença, com incidência de 679,9 casos por 100 mil habitantes^{4,5}. No mesmo ano, o Rio Grande do Sul registrou 66.779 casos confirmados de dengue e 66 óbitos relacionados à doença, sendo o ano com o maior número de casos e mortes registrado^{6,7}.

Em Porto Alegre, 3.897 casos autóctones de dengue foram registrados em 2022, número recorde no município⁸. Desde o primeiro caso autóctone registrado em 2010, a dengue parece estar apresentando característica de ciclicidade, com aparente aumento de casos ocorrendo a cada três anos, os quais são intercalados por dois anos de baixa incidência. Esta periodicidade é percebida pelos diversos pontos da Rede de Atenção à Saúde do município, em especial pelo Laboratório Central de Saúde Pública de Porto Alegre (Labcen), Diretoria de Vigilância em Saúde (DVS) e pontos assistenciais. Entretanto, há carência de trabalhos na área que busquem esclarecer a questão.

Uma vez que o ciclo de vida do vetor é afetado por fatores climáticos⁹, este trabalho buscou avaliar a influência de indicadores meteorológicos, em especial temperatura, umidade e pluviosidade, na periodicidade de epidemias de dengue em Porto Alegre, com o intuito de elucidar a ciclicidade da doença no município. Ainda, visto que a abundância de mosquitos é fator necessário, porém não suficiente, para a transmissão da arbovirose¹⁰, estudos que busquem identificar outros elementos relevantes para a predição e controle da dengue são importantes.

A pesquisa buscou beneficiar especialmente o Sistema Único de Saúde (SUS), em especial os setores das vigilâncias epidemiológica e ambiental, podendo auxiliar no planejamento de ações de prevenção e monitoramento e, conseqüentemente, resultar em um futuro controle da disseminação do vetor e da crescente incidência de dengue em Porto Alegre. Ainda, se comprovada a ciclicidade, as áreas assistenciais e de planejamento poderão se preparar com antecedência para futuras epidemias, resultando em um melhor atendimento ao paciente.

MATERIAL E MÉTODOS

Para o desenvolvimento deste trabalho, todos os dados utilizados foram coletados a partir de bases de dados públicas, não sendo necessária a aprovação por Comitê de Ética. As análises descritivas e estatísticas foram realizadas com auxílio do Núcleo de Assessoria Estatística (NAE) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Casos notificados, confirmados e autóctones de dengue em Porto Alegre

O período selecionado para a análise foi de 2010 a 2022, intervalo que engloba todos os anos a partir do primeiro caso autóctone de dengue registrado no município. Os dados escolhidos para análise foram os

casos de dengue notificados, confirmados e autóctones, visto que expressam a incidência da doença e estão disponíveis de forma pública.

O Painel de Arboviroses⁸, ferramenta pública de *Microsoft Business Intelligence* (BI) desenvolvida pela Secretaria Municipal de Saúde de Porto Alegre em parceria com a Empresa Pública de Tecnologia da Informação e Comunicação da Prefeitura de Porto Alegre (Procempa), foi utilizado para acessar os dados de casos anuais e trimestrais no período de 2016 a 2022, interstício disponibilizado pelo instrumento. Os dados de 2022 foram coletados até o dia 12 de dezembro. Uma vez que o Painel não apresenta dados anteriores a 2016, estes foram coletados de outras fontes.

Os dados de 2010 foram coletados a partir do Boletim Epidemiológico (BE) n° 45 de 2011, publicado pela Coordenadoria Geral de Vigilância em Saúde (CGVS), atual DVS de Porto Alegre¹¹. Os dados de 2011 e 2012 foram coletados a partir do BE n° 50 de 2013¹². Os dados de 2013 e 2014 foram obtidos a partir do BE n° 55 de 2014, que disponibiliza dados apenas até a Semana Epidemiológica (SE) 48, o que pode ser uma limitação¹³. Os dados de 2015 foram coletados a partir do BE n° 62 de 2016, que contém informações até a SE 35, correspondente ao final de agosto e início de setembro¹⁴.

Os casos notificados e confirmados foram utilizados apenas para as análises descritivas iniciais. As demais análises levaram em conta apenas os casos autóctones, visto que representam a transmissão sustentada no município e efetivamente são influenciados pelas condições socioambientais locais, diferentemente dos casos importados.

Temperatura, umidade e pluviosidade no município de Porto Alegre

Os indicadores meteorológicos escolhidos para as análises foram temperatura, umidade e pluviosidade, uma vez que estão relacionados com a dengue e disponíveis de forma pública. Os dados mensais foram obtidos através da base de dados pública do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), disponível no endereço eletrônico da instituição, através da opção Dados Meteorológicos – Tabela de Dados das Estações¹⁵. A estação meteorológica de escolha foi a Porto Alegre (A801), do tipo automática.

Foi realizado *download* das planilhas contendo os dados mensais de janeiro a dezembro, de 2010 a 2022, totalizando 156 planilhas para análise. As planilhas continham informações coletadas em intervalos de 60 minutos pela estação automática, totalizando 24 dados por dia e 720 a 744 dados por mês a serem incluídos nos cálculos. Os dados finais mensais de temperatura foram obtidos a partir da média aritmética simples das temperaturas máximas e mínimas e, em seguida, da média destes resultados. Os dados de umidade foram obtidos por média aritmética simples. Quanto à pluviosidade, os dados disponíveis em intervalos de 60 minutos foram somados, para obtenção de chuva acumulada mensal.

Os horários que não possuíam informação sobre os parâmetros analisados não foram incluídos nos cálculos. Os dados de 2022 foram coletados até o dia 12 de dezembro, data limite utilizada para a coleta do número de casos de dengue autóctones.

Análises descritivas e estatísticas

Este trabalho contou com a ajuda do NAE da UFRGS, para realizar as análises estatísticas, que foram feitas através do *software* R, versão 4.2.1. Os gráficos foram gerados através do pacote *ggplot2*, versão 3.4.0.

Inicialmente foram realizadas análises descritivas dos indicadores meteorológicos para temperatura, umidade e pluviosidade. A análise da distribuição mensal dos indicadores englobou o período de janeiro de 2010 a dezembro de 2022, enquanto a análise quadrimestral englobou desde o período do primeiro quadrimestre de 2016 ao último quadrimestre de 2022. Esta primeira etapa teve a finalidade de gerar gráficos para identificar possíveis padrões visuais dos dados e embasar análises subsequentes.

Para os casos de dengue, foram realizadas análises descritivas anuais, de 2010 a 2022, e quadrimestrais, do primeiro quadrimestre de 2016 ao último quadrimestre de 2022.

Para as análises estatísticas, as séries temporais comumente são analisadas através de decomposição clássica, modelo utilizado neste trabalho, descrito pela fórmula $Y_t = T_t + S_t + e_t$, onde Y_t é a série original, T_t é o componente de tendência, S_t é o de sazonalidade e e_t é o de irregularidade. A decomposição separa a série original Y_t nestes componentes para que se possa analisar cada um deles separadamente.

O componente de tendência foi obtido a partir da média móvel da série original. O componente de sazonalidade usou a série com o efeito de tendência já removido e calculou a média para cada unidade do tempo para todos os períodos. Por fim, o componente de sazonalidade foi centralizado.

Os dados de casos autóctones foram decompostos de forma quadrimestral, uma vez que dados mensais não estavam disponíveis. Os dados de temperatura, umidade e pluviosidade foram decompostos de forma mensal e quadrimestral, para efeito de comparação com os dados de dengue.

A correlação por quadrimestre entre os casos de dengue e os indicadores meteorológicos foi analisada através da Correlação de Spearman, medida que varia de -1 a 1, que expressa com que intensidade duas variáveis podem ser descritas por uma função monótona. Quanto mais próximo de -1 ou 1 o resultado, maior será a correlação entre as variáveis. Ainda, testes estatísticos foram realizados para cada par de variáveis, para determinar se o valor de cada correlação era significativamente diferente de zero, ou seja, se havia correlação significativa.

Uma vez que a influência dos determinantes meteorológicos nos casos autóctones de dengue pode ser indireta, com atrasos temporais, também foram realizadas análises de Correlação Cruzada, considerando um atraso de dez quadrimestres para mais e para menos. A Correlação Cruzada é uma medida de associação entre duas séries temporais que, assim como a Correlação de Spearman, varia de -1 a 1, sendo que valores mais próximos aos extremos do intervalo indicam maiores correlações. O intervalo de confiança de 95% utilizado para as análises foi calculado utilizando o método *bootstrap*.

Em todas as análises foi considerado o nível de significância $\alpha = 0,05$.

RESULTADOS

Distribuição de indicadores meteorológicos e casos de dengue em Porto Alegre, entre 2010 e 2022

Temperatura, umidade e pluviosidade

A distribuição da temperatura média mensal entre 2010 e 2022 esteve dentro da amplitude de cerca de 12 °C a 26,5 °C, indicando uma provável tendência constante ao longo do período analisado, sem desvios expressivos entre os anos. No gráfico representado na **Figura 1** é possível observar que o indicador

apresentou comportamento sazonal com pouca variabilidade entre os anos, tendo sido mais alta nos meses de verão e mais baixa nos meses de inverno, resultado esperado devido ao clima subtropical da região. Os meses de agosto dos anos 2012, 2015 e 2017 apresentaram temperaturas mais elevadas em relação aos demais anos, enquanto o mês de junho registrou temperaturas mais baixas do que o habitual em 2016.

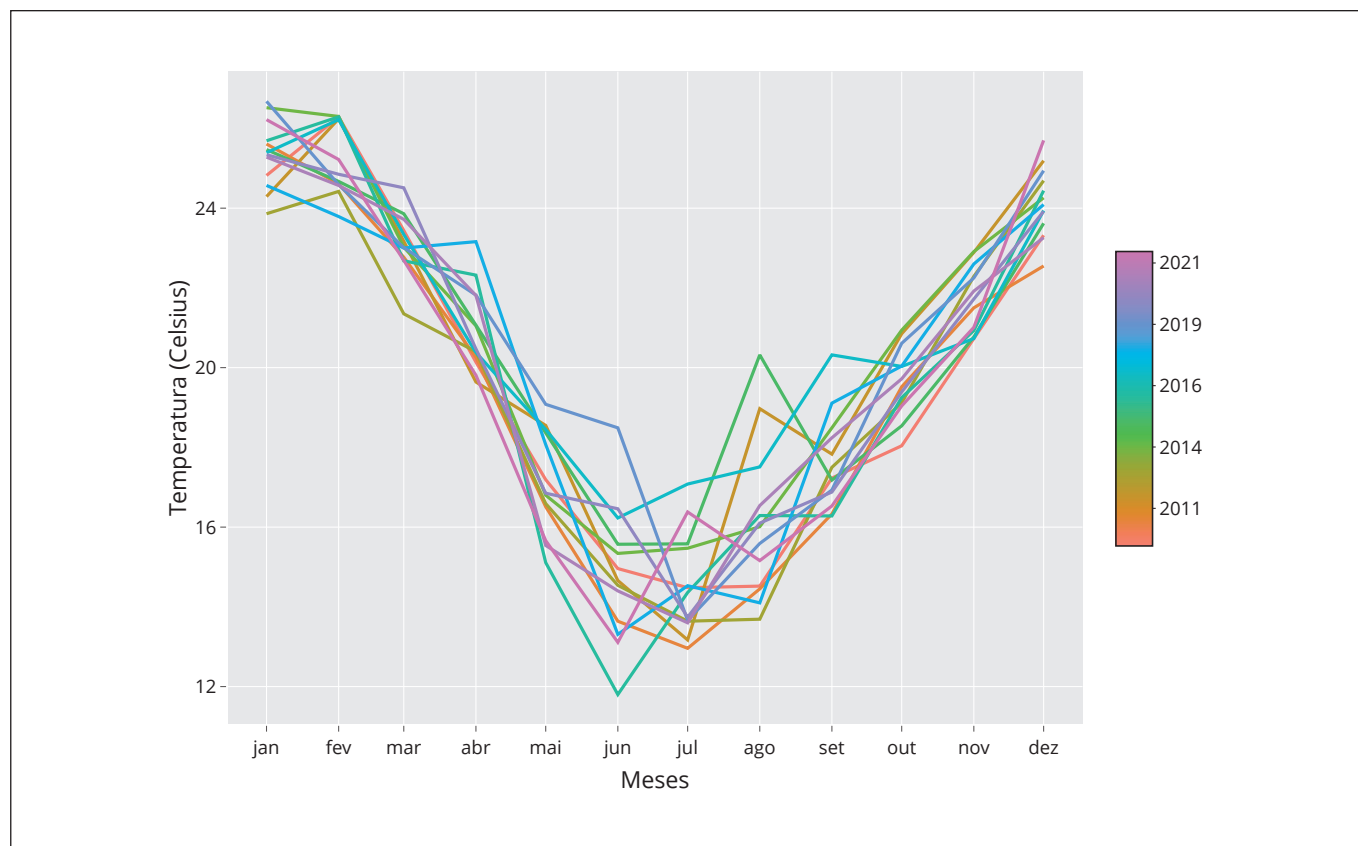


Figura 1. Distribuição da temperatura média mensal (°C) em Porto Alegre, entre 2010 e 2022

A distribuição da média mensal da umidade, por sua vez, variou de 61,3% a 90,1% e apresentou tendência crescente de 2010 até 2019, sendo que em 2019 sofreu queda, seguida por uma possível tendência levemente crescente até o final de 2022. A sazonalidade do indicador, demonstrada na **Figura 2**, apresentou maior variação entre os anos analisados quando comparado à temperatura, porém foi superior nos meses de inverno e inferior nos meses de verão.

Quanto à pluviosidade mensal, que variou de 7,4 mm a 313,1 mm, apresentou tendência crescente de 2010 a 2015, sendo que em 2015 se tornou decrescente e assim permaneceu até o final de 2022. O indicador apresentou efeito de sazonalidade disperso no período analisado (**Figura 3**), além de grande variabilidade entre os anos, não sendo possível visualizar um padrão. Os meses de outubro dos anos 2015, 2017 e 2019, assim como março de 2016 e julho de 2015, registraram uma maior quantidade de chuva quando comparados aos outros anos.

Analisando estes mesmos indicadores de forma quadrimestral, verificou-se que o primeiro quadrimestre apresentou menor variabilidade de temperatura entre os anos analisados (23,5 a 24,2 °C),

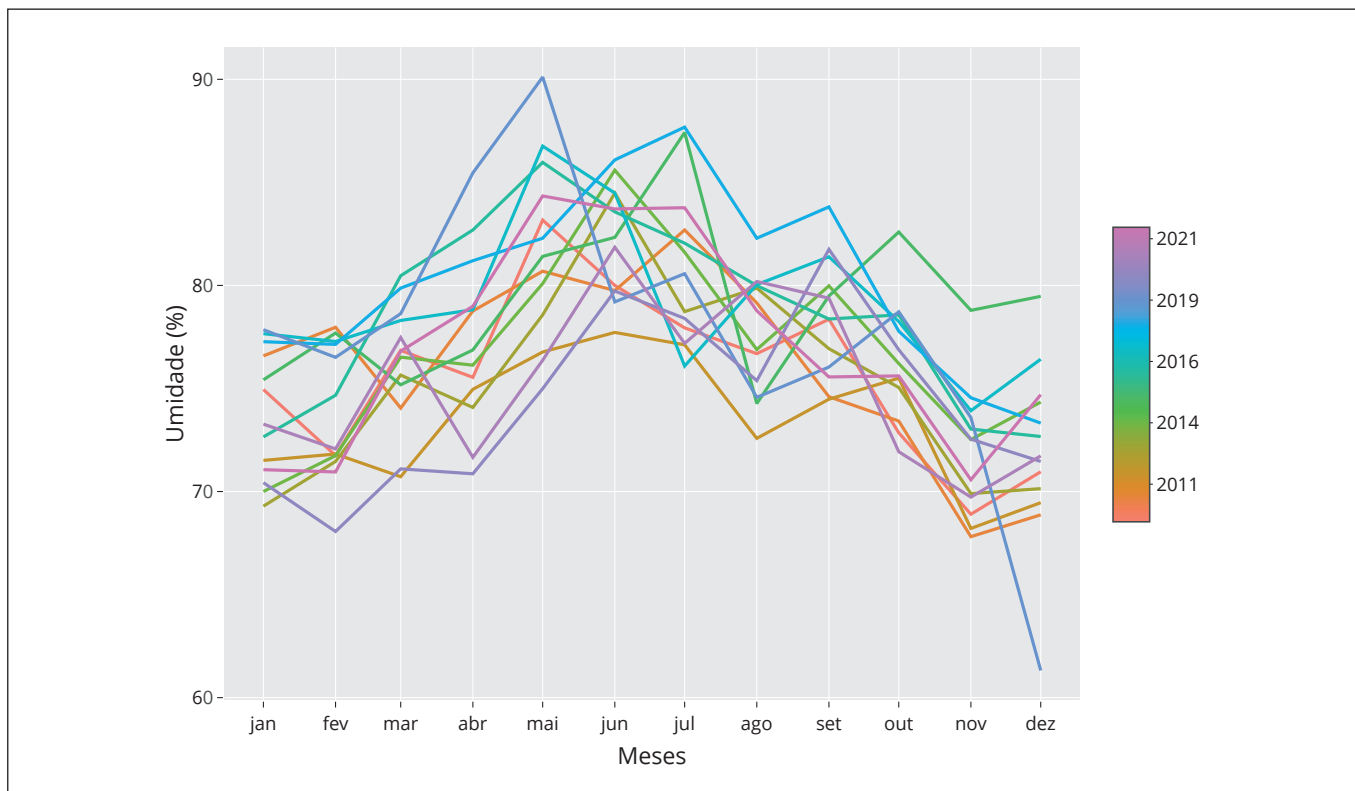


Figura 2. Distribuição da umidade média mensal (%) em Porto Alegre, entre 2010 e 2022

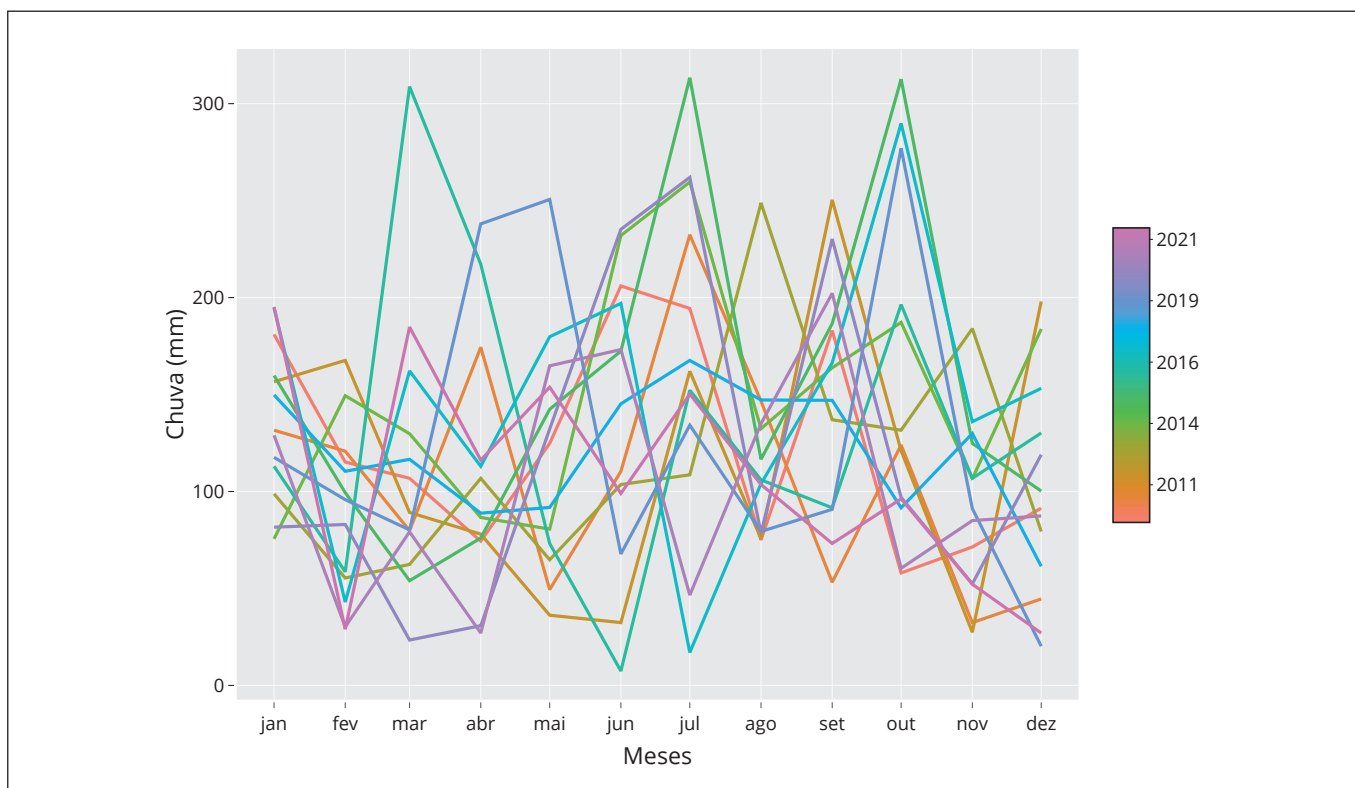


Figura 3. Distribuição da pluviosidade mensal (mm) em Porto Alegre, entre 2010 e 2022

o segundo quadrimestre tendeu a apresentar maior variação (14,4 a 17,3 °C) e o terceiro quadrimestre, variação intermediária (20,2 °C a 21,5 °C). Analisando a média quadrimestral de 2016 a 2022, houve confirmação da sazonalidade observada nos gráficos anteriores, onde os primeiros meses do ano foram mais quentes (23,8 °C), os meses intermediários foram mais frios (15,6 °C) e os últimos quatro meses apresentaram comportamento de transição entre inverno e verão (20,8 °C).

O comportamento sazonal da umidade também ficou mais evidente quando analisado de forma quadrimestral, visto que a média do segundo quadrimestre (Q2), de 81,8%, foi maior do que os demais (Q1: 76%; Q3: 75,1%) e o indicador exibiu maior variabilidade nos três quadrimestres, quando comparado à temperatura. Quanto à pluviosidade, a análise quadrimestral apresentou grande variabilidade entre os anos analisados, enquanto a média variou pouco entre os quadrimestres (Q1: 114,9 mm; Q2: 130,5 mm; Q3: 120,1 mm).

Casos de dengue

A análise descritiva anual da distribuição dos casos de dengue (Figura 4) exibiu tendência crescente na série analisada, visto que os números de casos confirmados e autóctones foram maiores a cada ano epidêmico (2013, 2016, 2019 e 2022). Ainda, mostrou-se nítido o aumento no número de casos em 2022, o que tornou a distribuição dos dados assimétrica.

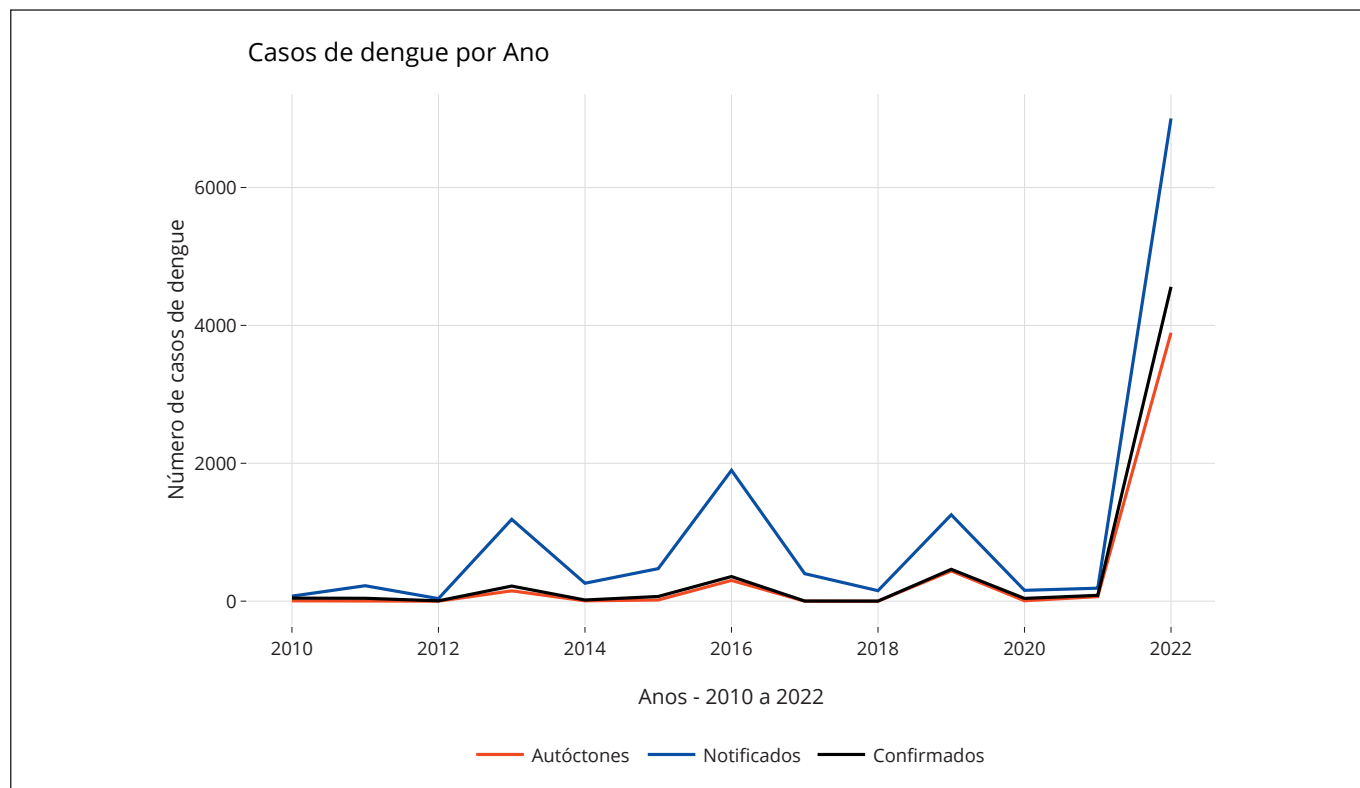


Figura 4. Distribuição anual dos casos notificados, confirmados e autóctones de dengue em Porto Alegre, entre 2010 e 2022

A análise quadrimestral dos casos de dengue de 2016 a 2022 demonstrou que, nos três anos de surto contemplados no período analisado, os picos de notificações, casos confirmados e casos autóctones ocorreram duas vezes no primeiro quadrimestre (2016 e 2022) e uma vez no segundo (2019). Os casos

autóctones de dengue pareceram ser mais frequentes no primeiro quadrimestre, enquanto a média de casos ficou próxima de zero no terceiro quadrimestre em todo o período analisado.

Decomposição de indicadores meteorológicos e casos autóctones de dengue em Porto Alegre, entre 2010 e 2022

Temperatura, umidade e pluviosidade

Ao decompor a série da temperatura com intervalo mensal, o componente de tendência pareceu aumentar e diminuir alternadamente com pequena oscilação (19,1 a 20,1 °C), o que explicou o comportamento constante do indicador ao longo dos anos. A sazonalidade observada também corroborou os resultados anteriores que indicaram baixa variabilidade, com oscilação de cerca de 11 °C (-6 a 5 °C) entre os meses de verão e inverno durante toda a série.

A umidade, quando decomposta em intervalos mensais, também reforçou os resultados encontrados nas análises descritivas, com tendência crescente até o início de 2019, ponto em que passa a ser decrescente, e novamente uma tendência crescente do início de 2020 até 2022. A sazonalidade do indicador apontou variabilidade moderada.

A decomposição mensal da pluviosidade, da mesma forma, apoiou os comportamentos observados nas análises anteriores, com tendência crescente de 2012 a 2015 e posteriormente decrescente até 2022. A sazonalidade apresentou maior variabilidade, com oscilação de até 83 mm entre os meses de um mesmo ano.

Estes mesmos indicadores foram decompostos de forma quadrimestral, a fim de comparação com os casos autóctones de dengue, também decompostos neste intervalo. Os resultados foram similares às análises anteriores, com algumas alterações no padrão de tendência, especialmente da temperatura, que mostrou tendência decrescente entre 2019 e 2022. Esta diferença, provavelmente, decorre do fato de que os dados de média quadrimestral utilizados são amplos e, portanto, menos detalhados do que os dados mensais.

Casos autóctones de dengue

A decomposição quadrimestral dos casos autóctones de dengue indicou uma tendência crescente em 2022, comportamento semelhante à distribuição dos casos em si. Este resultado possivelmente decorreu do número de casos ocorridos no ano (3.893 casos), da grande quantidade de quadrimestres (Q) sem casos registrado (1° Q de 2017 e 2018; 2° Q de 2017, 2018 e 2020; e 3° Q de 2016, 2017, 2018, 2020 e 2021) e da pequena quantidade de dados disponíveis para uma série histórica, que também pode ter contribuído para uma decomposição menos suave dos componentes como um todo. A sazonalidade, por sua vez, apontou o primeiro quadrimestre como o de maior transmissibilidade.

Correlação quadrimestral entre indicadores meteorológicos e casos autóctones de dengue em Porto Alegre, entre 2016 e 2022

Correlação de Spearman

Os coeficientes de correlação entre os casos autóctones de dengue e temperatura, umidade e pluviosidade quadrimestrais, calculados a partir de análise de Correlação de Spearman (**Figura 5**), indicaram ausência de correlação entre as variáveis, uma vez que os valores se mostraram próximos de zero. Para além dos casos de dengue, a análise apontou correlação negativa entre umidade e temperatura.

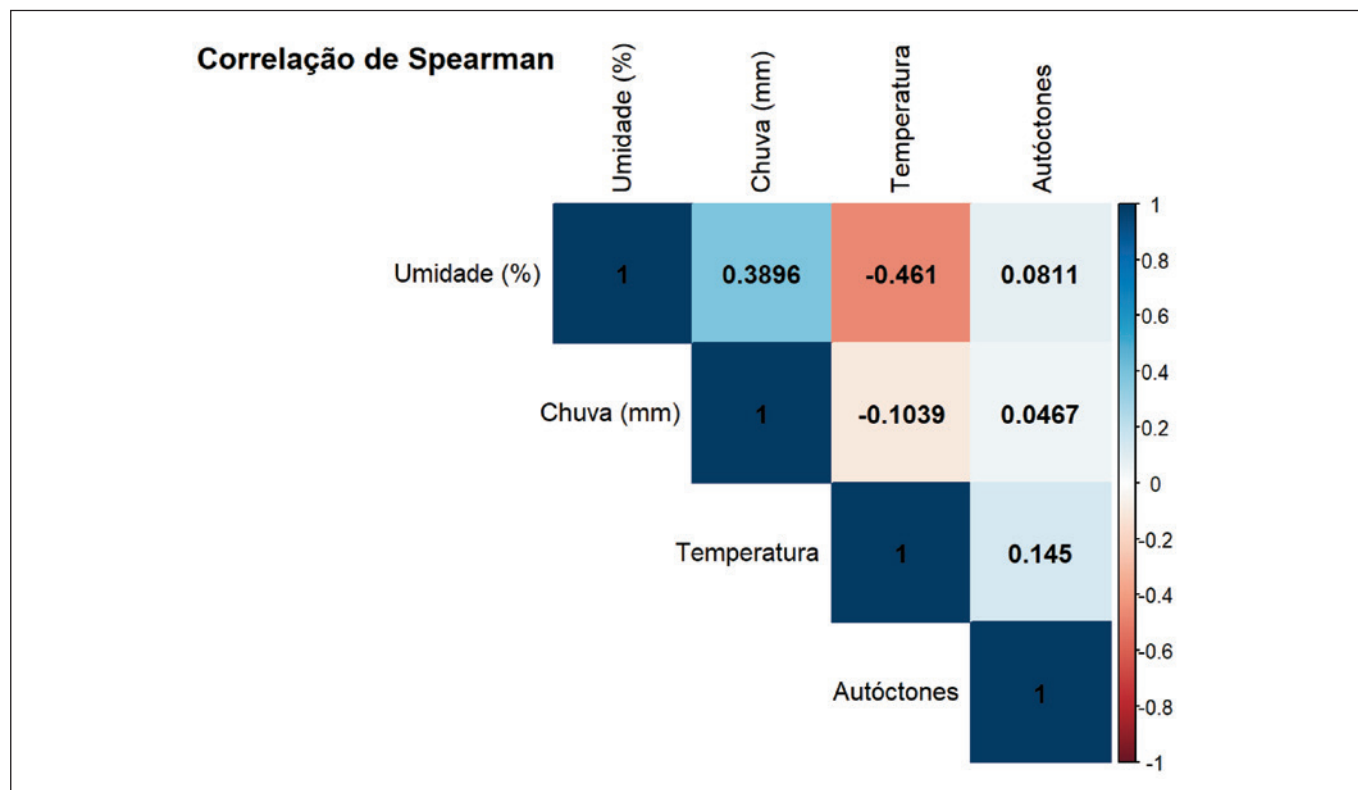


Figura 5. Correlação entre casos autóctones de dengue e indicadores meteorológicos em Porto Alegre. Análise quadrimestral, de 2016 a 2022

Para corroborar esta análise foram realizados testes estatísticos de amostras pareadas para cada par de variáveis, para verificar se o valor de cada correlação era significativamente diferente de zero ou não. O *p-valor* para a hipótese alternativa (correlação diferente de zero) foi de 0,531 entre casos e temperatura, 0,727 para umidade e 0,841 para pluviosidade. Entre umidade e temperatura, o *p-valor* obtido foi de 0,037. Uma vez que o *p-valor* de todos os testes que envolvem casos autóctones foi superior a 0,05, concluiu-se que os valores não foram significativamente diferentes de zero e, portanto, não houve correlação entre as variáveis, exceto entre umidade e temperatura, ao menos quando analisadas por quadrimestre.

Correlação Cruzada

A análise quadrimestral de Correlação Cruzada entre casos autóctones de dengue e temperatura, apresentou três *lags* (atrasos) fora do intervalo de confiança: -1, 8 e 10. Estes resultados indicam que o efeito da temperatura em um determinado quadrimestre esteve correlacionado significativamente com os casos autóctones observados no quadrimestre anterior, e em oito e dez quadrimestres posteriores. As correlações com quadrimestres posteriores provavelmente foram espúrias, uma vez que parece improvável haver influência entre as variáveis em um intervalo de cerca de três anos. Ainda, apesar de significativos, os três pontos destacados foram observados próximos ao intervalo de confiança.

A Correlação Cruzada entre os casos de dengue e a umidade indicou os *lags* -9, -2, 4 e 7 como significativos, sendo que o *lag* -2 esteve mais distante do intervalo de confiança. Estes resultados indicam que a umidade de um determinado quadrimestre esteve correlacionada com nove e dois

quadrimestres anteriores e quatro e sete quadrimestres posteriores. Os *lags* -9, 4 e 7 mostraram-se como correlações espúrias, por representarem um longo período de tempo e estarem próximos do intervalo de confiança.

Em relação à pluviosidade, a análise de Correlação Cruzada não apontou nenhum *lag* significativo, indicando que não houve correlação entre chuva e casos autóctones de dengue com qualquer atraso a nível quadrimestral.

DISCUSSÃO

As análises descritivas dos casos notificados, confirmados e autóctones sugerem que as epidemias de dengue ocorrem a cada três anos em Porto Alegre, resultado em concordância com o que já havia sido observado pelos servidores da rede pública de saúde. Esta periodicidade também já foi observada no Nepal¹⁶. Não foram realizadas análises estatísticas para comprovação da ciclicidade, uma vez que o ciclo observado foi de três anos e o período disponível para estudo englobou apenas 13 anos, contemplando poucos eventos.

Os quatro anos epidêmicos, 2013, 2016, 2019 e 2022, coincidiram com anos de alta incidência da doença no país, porém diferiram um pouco em relação ao estado do Rio Grande do Sul, que apresentou elevado número de casos também em 2020 e 2021^{17,18}. Ainda, a maior incidência já registrada no Brasil ocorreu em 2015¹⁷, ano em que Porto Alegre apresentou poucos casos. A quantidade de casos registrada em níveis federal e estadual pode ter relação com a incidência em nível municipal, devido à introdução de casos importados e à proximidade geográfica, por exemplo, porém não é suficiente para explicar o fenômeno cíclico em Porto Alegre.

A análise descritiva mensal e quadrimestral dos indicadores meteorológicos não apontou padrões que pudessem explicar a ciclicidade das epidemias no município. A ausência de padrões climáticos diferenciados entre anos de baixa e alta incidência de dengue também foi observada em Tamil Nadu, estado ao sul da Índia¹⁹.

A temperatura, variante climática apontada como a mais influente para o desenvolvimento de *Aedes aegypti*²⁰, apresentou baixa variabilidade entre os anos analisados, com poucos episódios que desviaram do comportamento esperado. Dentre estes episódios destaca-se o seu aumento em agosto de 2012, 2015 e 2017, porém o fenômeno não ocorreu em ciclos de três anos e provavelmente não está relacionado à periodicidade da dengue.

A umidade e a pluviosidade, apesar de apresentarem maior variação entre os anos e tendência mais definida quando comparadas à temperatura, também não exibiram padrões de repetição em intervalos de três anos e, portanto, não sinalizaram indicativos de influência na ciclicidade das epidemias no município. Estes resultados foram corroborados pelas análises de decomposição dos indicadores climáticos, que também não exibiram características cíclicas no eixo de tendência.

Para além da análise de ciclicidade, foi possível observar o comportamento quadrimestral dos fatores climáticos e dos casos autóctones de dengue no município. O clima da cidade mostrou-se tipicamente subtropical, com o primeiro quadrimestre mais quente, o segundo mais frio e úmido e os meses de setembro a dezembro com comportamento de transição entre inverno e verão. Assim como descrito no Plano Municipal de Contingência de Arboviroses²¹, a dengue apresentou característica sazonal em Porto

Alegre nos anos epidêmicos, com aumento dos casos nos meses de verão e queda a partir do segundo quadrimestre, chegando a níveis próximos de zero nos últimos quatro meses do ano.

Uma exceção ao padrão sazonal dos casos de dengue foi a epidemia de 2019, que registrou ápice de casos no segundo quadrimestre. Analisando este ano, observa-se que, em relação aos demais, um pico de umidade foi registrado no mês de maio (**Figura 2**), o início do quadrimestre foi mais chuvoso (**Figura 3**) e o inverno se iniciou com temperaturas um pouco mais altas do que o esperado (**Figura 1**), porém estudos mais aprofundados precisam ser realizados para concluir se fatores climáticos podem ter sido responsáveis por este comportamento diferenciado da dengue em 2019.

Apesar da interferência dos indicadores meteorológicos no ciclo de vida de *Aedes aegypti*^{9,20,22,23}, este trabalho não identificou correlação pontual entre clima e incidência de dengue quadrimestral. Estudos demonstraram a existência de influência entre estas variáveis com atrasos temporais. Na Argentina foi observada relação entre a temperatura registrada no outono com a ocorrência de dengue no ano posterior²⁴, ao passo que no estado do Paraná constatou-se existência de correlação entre temperatura e pluviosidade com a incidência de dengue com atraso de quatro e três meses, respectivamente²⁵.

As correlações com atrasos temporais encontradas neste trabalho, entretanto, pareceram ser espúrias, visto que se apresentaram muito próximas do intervalo de confiança amostral. A correlação entre umidade e incidência de dengue com atraso de dois quadrimestres, esteve mais distante do intervalo de confiança e é possível que não corresponda a um achado ao acaso. A ideia que representa, entretanto, é de que a umidade de um certo momento esteve correlacionada com os casos de dengue de dois quadrimestres anteriores, informação que parece ser improvável, dado o elemento retrospectivo. Contudo, vale ressaltar que correlação não implica em causalidade.

Vale destacar que as análises realizadas neste estudo, tanto descritivas quanto estatísticas, utilizaram apenas dados da temperatura média mensal e quadrimestral, e não das temperaturas máximas e mínimas registradas nos respectivos períodos. Visto que os extremos de frio e calor podem interferir na dinâmica de vida do vetor^{22,23}, trabalhos futuros podem ser elaborados para averiguar a correlação destes indicadores com a ciclicidade e a incidência de dengue em Porto Alegre.

Outro ponto a salientar é o fato de que as análises de correlação levaram em conta apenas dados meteorológicos quadrimestrais, que englobam uma grande quantidade de eventos climáticos, em virtude de os casos de dengue só estarem disponíveis publicamente neste intervalo de tempo. Esta abundância de informações agrupada em um único dado pode ser a responsável pela ausência de correlação nítida entre as variáveis examinadas, resultado que destoa de outras pesquisas, inclusive realizadas em Porto Alegre²⁶. Estudos futuros podem ser feitos com dados de dengue semanais ou mensais, disponíveis em bancos de dados de acesso restrito, para averiguar se a ausência de correlação se mantém. A plataforma pública *Tabnet* não foi utilizada, visto que alguns dados divergiram dos presentes em boletins epidemiológicos e no Painel de Arboviroses⁸ e havia carência de informações relativas a alguns anos, em especial 2022.

A despeito das análises centrais desta pesquisa, mostrou-se evidente o aumento dos casos de dengue em 2022, não explicado pelos indicadores climáticos avaliados. Em 2013 e 2016, anos epidêmicos, a incidência de dengue registrada no município, entre 15 e 150 casos por 100 mil habitantes, estava mais próxima da média argentina do que da brasileira²⁷. Em 2022, a capital gaúcha

registrou incidência aproximada de 261 casos confirmados por 100 mil habitantes, um salto em direção ao nível nacional⁵. Porto Alegre parece estar em transição epidemiológica de uma cidade sem transmissão sustentada para uma cidade com frequentes epidemias, observação também apontada por Guzzetta et al²⁷.

É importante frisar que os ciclos com epidemias de dengue a cada três anos foram constatados até o momento e não se pode inferir que o padrão continue o mesmo para os próximos anos, em especial devido ao significativo crescimento de casos em 2022, que pode resultar em alterações na dinâmica da arbovirose no município.

Ainda, em virtude de 2020 e 2021 terem sido transpassados por uma pandemia de COVID-19, é possível que a incidência de dengue nestes anos tenha sido maior do que a reportada, tanto a nível local como estadual e federal. A ciclicidade das arboviroses observada neste trabalho, por conseguinte, pode não ter ocorrido de fato desde a emergência do SARS-CoV-2. Uma vez que as enfermidades possuem sintomatologia semelhante²⁸ e que o isolamento social ocorreu como forma de prevenção e controle da doença emergente, é possível que a dengue tenha sido subdiagnosticada e subnotificada em grandes proporções durante o período em questão.

O monitoramento de *Aedes aegypti* já está bem estabelecido no município, através de vigilância vetorial por meio de armadilhas georreferenciadas (*MosquiTRAP*) e cálculo periódico do índice de infestação, além de vínculo entre Vigilância Epidemiológica e Labcen, para acompanhamento rápido de casos positivos para dengue²⁹. Ações de controle, como aplicação de inseticida, também vêm sendo realizadas após detecção de positividade viral em mosquitos fêmea coletadas de armadilhas, a fim de evitar a disseminação do agente etiológico. Entretanto, apesar do acompanhamento, o crescimento da arbovirose na capital gaúcha é nítido e alarmante.

Visto que ações individuais de manejo do ambiente domiciliar são importantes para o combate à dengue, o poder público precisa investir recursos em educação popular em saúde para além de programas como o Saúde na Escola. O público-alvo das ações educativas deve passar a ser a população adulta, que efetivamente é responsável pelas condições do lar que habita. A conscientização a nível pessoal é mais um passo rumo ao enfrentamento de problemas de saúde pública.

CONCLUSÃO

A ciclicidade de epidemias de dengue observada nesta pesquisa se encaixa no contexto de 2010 a 2022 e não pode ser extrapolada aos anos que virão. As ações de controle e combate à dengue não devem ficar restritas a esta periodicidade e há a possibilidade de que a dinâmica da doença se altere após o recorde de casos registrado no último ano. Ainda, a pandemia por COVID-19 pode ter mascarado uma possível alteração da ciclicidade das epidemias de dengue nos últimos três anos em Porto Alegre, representando uma limitação neste estudo.

Apesar da ausência de correlação entre clima, incidência e periodicidade de dengue constatada neste trabalho, a associação entre as variáveis não pode ser descartada, dado as ressalvas mencionadas ao longo do texto. Pesquisas futuras podem ser realizadas com dados mais detalhados, em uma menor escala de tempo.

Por fim, as ações de educação em saúde precisam ser intensificadas e, principalmente, alcançar a população adulta, através de capacitações públicas e ajuda da grande mídia, por exemplo, para que a prevenção da dengue receba a devida importância por parte da comunidade.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não existir conflitos de interesse.

FINANCIAMENTO

Não declarado pelos autores.

AGRADECIMENTO

Ao Núcleo de Assessoria Estatística da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo apoio técnico prestado.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

As autoras participaram da concepção, planejamento, análise e interpretação dos dados e aprovação da versão final do manuscrito.

NOTA DE APRESENTAÇÃO

Os resultados deste artigo integram o trabalho de conclusão de residência (TCR) de Rafaela Breda, da Residência Integrada Multiprofissional em Saúde Coletiva (RIMSCOL), Escola de Enfermagem, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, defendido em de fevereiro de 2023.

REFERÊNCIAS

1. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância em Saúde. 5 ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2022. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_5ed_rev_atual.pdf
2. Organização Pan-Americana da Saúde – OPAS. Dengue. [acesso 2022 Dez 26]. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/dengue>
3. World Health Organization – WHO. Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Genebra; 2009. Disponível em: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789241547871>
4. Ministério da Saúde (BR). Plano de contingência para resposta às emergências em saúde pública por dengue, chikungunya e Zika. 1 ed. Ministério da Saúde, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/publicacoes-svs/dengue/plano-de-contingencia-para-resposta-as-emergencias-em-saude-publica-por-dengue-chikungunya-e-zika>

5. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. Boletim Epidemiológico. Monitoramento dos casos de arboviroses até a semana epidemiológica 52 de 2022. 2023;54(1). Disponível em:
<https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2023/boletim-epidemiologico-volume-54-no-01/>
6. Secretaria Estadual de Saúde (Rio Grande do Sul). Óbitos por dengue no RS chegam a 56 no ano. [acesso 2023 Jan 13]. Disponível em:
<https://saude.rs.gov.br/obitos-por-dengue-no-rs-chegam-a-56-no-ano>
7. Secretaria Estadual de Saúde (Rio Grande do Sul). Informativo Epidemiológico de Arboviroses. Semana Epidemiológica 01 a 52 de 2022. [acesso 2023 Jan 13]. Disponível em:
<https://www.cevs.rs.gov.br/upload/arquivos/202301/11173110-informativo-epidemiologico-dengue-chik-zika-e-fa-se-52-2022-1.pdf>
8. Prefeitura de Porto Alegre. Casos de Dengue/Chikungunya/Zika de Porto Alegre. [acesso 2023 Jan 13]. Disponível em:
<https://pentaho-pmpa.procempa.com.br/pentaho/api/repos/%3Apublic%3ASMS%3AIndicadores%3ADengue%3Adengue.wcdf/generatedContent>
9. Codeço CT, Villela DAM, Coelho FC. Estimating the effective reproduction number of dengue considering temperature-dependent generation intervals. Epidemics. 2018;25:101-11.
<https://doi.org/10.1016/j.epidem.2018.05.011>
10. Lowe R, Coelho CAS, Barcellos C, Carvalho MS, Catão RC, Coelho GE et al. Evaluating probabilistic dengue risk forecasts from a prototype early warning system for Brazil. Elife. 2016;5:e11285.
<https://doi.org/10.7554/eLife.11285.001>
11. Secretaria Municipal de Saúde (Porto Alegre – RS). Coordenadoria Geral de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico número 45. 2011, ano XIII. Disponível em:
http://lproweb.procempa.com.br/pmpa/prefpoa/cgvs/usu_doc/boletimepidemiologico-cgvs-sms-pmpa-45.pdf
12. Secretaria Municipal De Saúde (Porto Alegre – RS). Coordenadoria Geral de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico número 50. Situação epidemiológica do início da epidemia de dengue em Porto Alegre no Ano de 2013. 2013, ano XV. Disponível em:
http://lproweb.procempa.com.br/pmpa/prefpoa/cgvs/usu_doc/boletimepidemiologico-cgvs-sms-pmpa-50.pdf
13. Secretaria Municipal de Saúde (Porto Alegre – RS). Coordenadoria Geral de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico número 55. Edição Especial – Dengue. 2014, ano XVI. Disponível em:
http://lproweb.procempa.com.br/pmpa/prefpoa/cgvs/usu_doc/boletimepidemiologico-cgvs-sms-pmpa-55.pdf

14. Secretaria Municipal de Saúde (Porto Alegre – RS). Coordenadoria Geral de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico número 62. 2016. Disponível em:
http://lproweb.procempa.com.br/pmpa/prefpoa/cgvs/usu_doc/boletimepidemiologico-cgvs-sms-pmpa-62.pdf
15. Instituto Nacional de Meteorologia. Tabela de Dados das Estações. [acesso 2022 Dez 12]. Disponível em:
<https://tempo.inmet.gov.br/TabelaEstacoes>
16. Gupta BP, Tuladhar R, Kurmi R, Manandhar KD. Dengue periodic outbreaks and epidemiological trends in Nepal. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2018;17(1):6.
<https://doi.org/10.1186/s12941-018-0258-9>
17. Zanotto PMA, Leite LCC. The Challenges Imposed by Dengue, Zika, and Chikungunya to Brazil. Front Immunol. 2018;9:1964.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01964>
18. Tumioto GL, Gregianini TS, Dambros BP, Cestari BC, Alves Nunes ZM, Veiga ABG. Laboratory Surveillance of Dengue in Rio Grande do Sul, Brazil, from 2007 to 2013. PLoS One. 2014;9(8):e104394.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104394>
19. Chandy S, Ramanathan K, Manoharan A, Mathai D, Baruah K. Assessing effect of climate on the incidence of dengue in Tamil Nadu. Indian J Med Microbiol. 2013;31(3):283-6.
<https://doi.org/10.4103/0255-0857.115640>
20. Reinhold JM, Lazzari CR, Lahondère C. Effects of the Environmental Temperature on *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* Mosquitoes: A Review. Insects. 2018;9(4):158.
<https://doi.org/10.3390/insects9040158>
21. Secretaria Municipal de Saúde (Porto Alegre – RS). Plano Municipal de Contingência – Dengue, Zika Vírus e Chikungunya. Porto Alegre, 2022. Disponível em:
<https://prefeitura.poa.br/sms/onde-esta-o-aedes/prevencao-e-controle-de-arboviroses>
22. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre – RS). Divisão de Promoção da Saúde (DAS/UFRGS). Atenção ao combate à dengue. [acesso 2022 Dez 15]. Disponível em:
<http://www.ufrgs.br/biociencias/divisao-de-promocao-da-saude-das-ufrgs-atencao-ao-combate-a-dengue/>
23. Couret J, Benedict MQ. A meta-analysis of the factors influencing development rate variation in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). BMC Ecol. 2014;14:3.
<https://doi.org/10.1186/1472-6785-14-3>

24. Carbajo AE, Cardo MV, Guimarey PC, Lizuain AA, Buyayisqui MP, Varela T et al. Is autumn the key for dengue epidemics in non endemic regions? The case of Argentina. Peer J. 2018;6:e5196. <https://doi.org/10.7717/peerj.5196>
25. Bavia L, Melanda FN, Arruda TB, Mosimann ALP, Silveira GF, Aoki MN et al. Epidemiological study on dengue in southern Brazil under the perspective of climate and poverty. Sci Rep. 2020;10(1):2127. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58542-1>
26. Ferreira DAC, Degener CM, Marques-Toledo CA, Bendati MM, Fetzer LO, Teixeira CP et al. Meteorological variables and mosquito monitoring are good predictors for infestation trends of *Aedes aegypti*, the vector of dengue, chikungunya and Zika. Parasit Vectors. 2017;10:78. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2025-8>
27. Guzzetta G, Marques-Toledo CA, Rosà R, Teixeira M, Merler S. Quantifying the spatial spread of dengue in a non-endemic Brazilian metropolis via transmission chain reconstruction. Nat Commun. 2018;9(1):2837. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05230-4>
28. Harapan H, Ryan M, Yohan B, Abidin RS, Nainu F, Rakib A et al. Covid-19 and dengue: Double punches for dengue-endemic countries in Asia. Rev Med Virol. 2021;31(2):e2161. <https://doi.org/10.1002/rmv.2161>
29. Prefeitura de Porto Alegre. Onde está o Aedes? [acesso 2023 Fev 14]. Disponível em: <https://prefeitura.poa.br/sms/onde-esta-o-aedes>

Instruments to evaluate the profile of food and enteral formulation handlers

Instrumentos para avaliação do perfil do manipulador de alimentos e de formulações enterais

Julia Fernanda Costa Kozow¹ , Caroline Opolski Medeiros² , Rayane Luizi da Costa³ , Lize Stangarlin-Fiori⁴ 

¹ Degree in Nutrition, Department of Nutrition at the Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil.

² PhD in Food and Nutrition, Postgraduate Program in Food and Nutrition, Department of Nutrition, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil.

³ Master's Degree in Food and Nutrition, Postgraduate Program in Food and Nutrition, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil.

⁴ PhD in Food Science and Technology, Postgraduate Program in Food and Nutrition, Department of Nutrition, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil.

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

Received/Recebido: 13.03.2023

Accepted/Aceito: 16.02.2024

Publication/Publicação: 25.03.2024

Editor-in-chief/Editor Chefe: Adriana Bugno

ABSTRACT

To know the profile of food and enteral formulation handlers is important to promote more effective health education actions for these individuals. This study aimed to develop instruments to evaluate the profile of food handlers in households (PFH) and in food service establishments (PFSE), as well as the profile of handlers of enteral formulations in households (PEFHH). A scoping review was carried out to identify questions about the profile of food and enteral formulation handlers evaluated in studies in their main national and international databases. From 47 selected articles, 66 questions were identified. Of these, 17, 22, and 18 questions were established to assess the PFH, PFSE, and PEFHH, respectively. The instrument questions were subdivided by subject into personal data, sociodemographic and professional characteristics, and general information. Some questions differ between instruments due to segment specificities. The proposed instruments are novel tools. Through a scoping review and expert consultations, a comprehensive set of questions was identified and organized into instruments tailored to each specific segment. These tools will be valuable for nutritionists, researchers, and other professionals involved in assessing and addressing the needs of food handlers.

Keywords. Food Handling, Enteral Nutrition, Food Services, Home Care.

RESUMO

Conhecer o perfil do manipulador de alimentos e de formulações enterais é importante para promover ações de educação sanitária mais efetiva para esses indivíduos. Este estudo teve como objetivo elaborar instrumentos para avaliação do perfil do manipulador de alimentos em domicílios (PFH), em serviço de alimentação (PFSE) e de formulações enterais em domicílios (PEFHH). Realizou-se uma revisão de literatura do tipo *Scoping review* para identificar as questões sobre o perfil do manipulador de alimentos e de formulações enterais avaliadas nos estudos nas principais bases de dados nacionais e internacionais. A partir de 47 artigos selecionados, foram identificadas 66 questões. Destas, foram estabelecidas 17, 22 e 18 questões para avaliar o PFH, PFSE e PEFHH, respectivamente. As questões dos instrumentos foram subdivididas por assunto nas seguintes categorias: dados pessoais; características sociodemográficas e profissionais; e informações gerais. Algumas questões se diferenciam entre os instrumentos devido à particularidade de cada segmento. Os instrumentos propostos são ferramentas inovadoras. Através de uma revisão abrangente e consultas com especialistas, um conjunto abrangente de perguntas foi identificado e organizado em instrumentos adaptados a cada segmento específico. Essas ferramentas serão valiosas para nutricionistas, pesquisadores e outros profissionais envolvidos na avaliação e atendimento das necessidades dos manipuladores de alimentos.

Palavras-chave. Manipulação de Alimentos, Nutrição Enteral, Serviços de Alimentação, Assistência Domiciliar.

INTRODUCTION

A food handler is any person who manipulates food either in food services or at home. In food services, these individuals are involved directly or indirectly in the processes of food preparation, packaging, storage, transportation, distribution, and display or sale¹. The handler of enteral formulations at home is the individual responsible for preparing and/or packaging homemade, industrialized, or mixed enteral formulations for patients on Home Enteral Nutrition (HEN)².

These individuals play a key role in the care and safety of the handled food³, and enteral formulations⁴. In addition, studies show that the food handler can directly interfere in food contamination both at home and in food services when lacking hygiene care during preparation⁵⁻⁷.

It is worth noting that the risk of food contamination at home is even higher because the handler may not have enough knowledge about the hygienic-sanitary procedures that should be applied and/or they could have the misperception that, at home, the risk of food contamination is lower. In the case of HEN, the risk is also high because the enteral formulation handler is mainly a family member of the patient and usually has no experience or guidance on the care required to handle this type of food⁴.

Some studies have shown that variables such as age, sex, education, professional training, experience, and training courses or guidance in the field can also influence attitudes and practices in food handling⁸⁻¹². Thus, knowing the profile of food and enteral formulation handlers is important to help develop more effective actions that meet the reality and specificities of these individuals and, thus, contribute to their qualification^{3,13-15}.

The evaluation of the handler's profile can be performed using standardized instruments that measure and provide reliable data for future research. However, in the scientific literature, no standardized instruments have been found to evaluate the characteristics of such individuals. Thus, this study aims to develop instruments to assess the profile of food handlers in households (PFH), food handlers in food service establishments (PFSE), and enteral formulation handlers in households (PEFHH).

We expect that these instruments will help nutritionists, researchers, and other professionals to know the profile of food handlers, contributing to the decision-making regarding both routine activities and the orientation and training of handlers taking into account the particularities of each segment. Furthermore, we hope to encourage the development of more effective health education actions that meet the reality and specificities of these individuals and contribute to future scientific discussion, promoting the creation of new tools, policies, programs, and educational actions for these segments.

METHODS

This is a qualitative and quantitative methodological study^{16,17}, that resulted in the development of three instruments: PFH, PFSE, and PEFHH.

The study is part of a broader project entitled "Identification of Control Points in the Handling of Enteral Formulations and Proposal of Instruments for Assessment and Guidance of Good Practices in Household". It followed all ethical aspects and was approved by the Research Ethics Committee, under CAAE (Certificate of Presentation for Ethical Consideration) number 13012119.0.0000.0102.

Bibliographic survey on the profile of handlers

A scoping review was conducted to identify the issues evaluated in studies on the profile of food and enteral formulation handlers. The guiding question was initially defined based on the acronym PCC, where P = population, C = concept, and C = context¹⁸, namely, “What is the profile of the food and enteral formulation handler?”

The inclusion criteria for the selection of articles were as follows: indexed articles from January 2014 to May 2021; published in English, Spanish, or Portuguese; descriptive-observational, cross-sectional, and experimental studies, prospective or retrospective; articles with information on the profile of the food and enteral formulation handler. The exclusion criteria for the selection of articles were: studies that did not assess the profile of food handlers and enteral formulations; literature review studies, integrative reviews, systematic reviews, or scoping reviews; studies in languages other than English, Spanish, and Portuguese.

The search for articles was carried out in May 2021 in the following national and international databases: Medical Literature Analysis and Retrieval System Online (MEDLINE), Scopus, Virtual Library Health (BVS), CAPES Journal Portal, Science Direct, and Scientific Electronic Library Online (SciELO). For the database search, the Health Sciences Descriptors (DeCS) and the articles' free titles or keywords were used, resulting in the following combination of keywords: “Profile” AND “Food handlers” AND “Home” OR “Food service” OR “Enteral Nutrition” OR “Food hygiene” OR “Good Manipulation Practices”. For reference management, the initial results were stored in Microsoft Office Excel[®] 2010 software (Microsoft Corporation, Washington, USA) and the articles were independently screened by two reviewers. First, a separate reading of the title, abstract, and full article was performed, and then the study eligibility was checked. At each stage, the data found by the reviewers were compared and, when discordant, analyzed by a third reviewer based on the inclusion and exclusion criteria.

The data from the articles were entered into an extraction sheet in Microsoft Office Excel[®] 2010 software (Microsoft Corporation, Washington, USA). Questions about personal data, professional sociodemographic characteristics, and general information on each type of food handler were compiled from the studies. The systematic process of including the studies followed the guidelines of the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA)¹⁹.

Instrument design

The questions and answer options for each instrument were defined based on meetings with three experts in the field of collective food. Those that appeared more often in the articles were selected in this step. Furthermore, other relevant questions to each segment (foods services, households, and household enteral nutrition) were added. The answer options for the questions were based on the articles and data from the Brazilian Institute of Geography and Statistics^{20,21}. From this stage on, the questions and answer options were rewritten and/or reorganized taking the opinion of the same experts into account.

RESULTS AND DISCUSSION

A total of 209 articles were found in the databases. With the exclusion of duplicates and articles that did not meet the inclusion criteria, a total of 47 articles remained. The workflow for this process is presented in **Figure**, following the model proposed by the Joanna Briggs Institute for scoping reviews¹⁹.

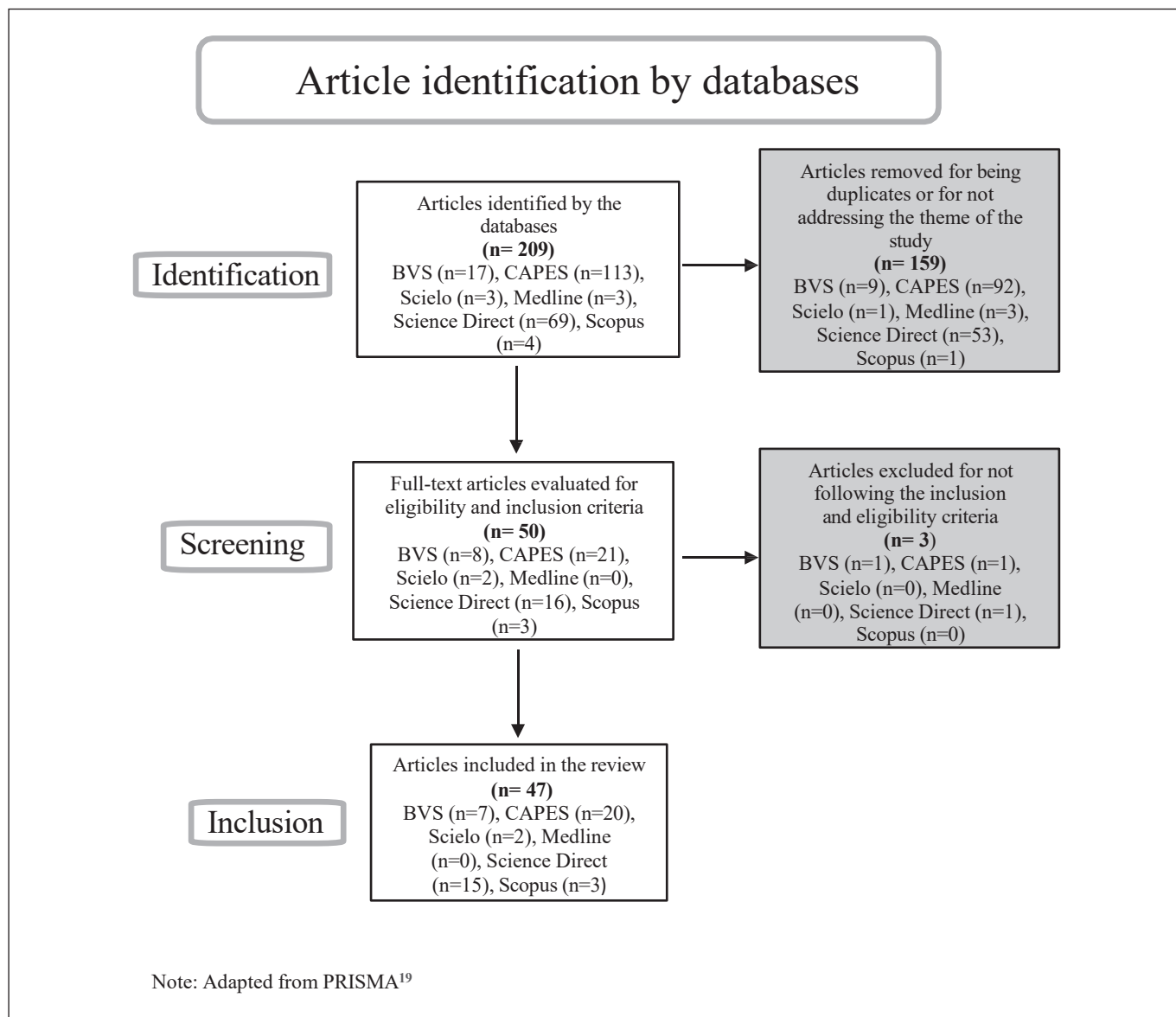


Figure. Flowchart of the study selection process

After data extraction, 66 questions regarding the profile of food and enteral formulation handlers were identified. The questions and answer options that remained in each of the instruments, as well as the categories they fall into, were defined based on the knowledge and experience of experts in the field of collective food, considering particular characteristics and relevance for each segment. The participation of experts contributed to more clear and cohesive instruments in relation to the population to be studied¹⁷.

The instruments to evaluate the PFH, PFSE and PEFHH (**Supplementary Material**) had 17, 22, and 18 questions, respectively. The questions of the instruments presented open and closed response options and were subdivided by theme into the following categories: personal data, sociodemographic characteristics, professional characteristics, and general information.

The instruments presented similar questions, such as: name, phone number, and e-mail address (personal data); gender, age, marital status, and education (sociodemographic characteristics); occupational

status (professional characteristics); means of communication, interest in learning about food handling, level of satisfaction in handling food and/or enteral formulations, and perception of risk of contracting some gastrointestinal problem by consuming the food and/or enteral formulations they handled (general information).

However, some questions differ due to the particularities of each segment (**Table**). In the sociodemographic characteristics category, the distinctions were found in the question referring to income, which in the PFSE instrument refers to the income from where the handler works. In the other instruments, because the food and/or enteral formulation handler at home is usually not paid for the service, the same question relates to the family's monthly income instead. It is worth noting that the preparation of the enteral formulations in the HEN can also be carried out by a hired professional or a paid family member. Therefore, a question on whether or not the person is paid for the service was also included in the PEFHH instrument.

Table. Questions with differences among instruments for the assessment of the handler's profile

Categories/Questions	Instruments		
	PFH	PFSE	PEFHH
Sociodemographic characteristics			
Income	X	X	X
Number of people living in the household and housing conditions	X		
Identification of the person responsible for preparing enteral formulations			X
Professional characteristics			
Handling operating time		X	X
Profession	X		X
Frequency of food and/or enteral formulation handling	X		X
How many people eat at home and which meals are prepared	X		
Name of food service; branch of activity; whether the handler is an owner or employee; which activity(ies) is(are) performed in food handling; how frequent is the work in the food service; work shift; hours worked per day; time of experience in food service; health examinations undertaken by the company; training participation on hygiene care in food handling (subject, certificate, and workload); whether the training brought any habit changes		X	
General information			
Gastrointestinal problem after consumption of food or enteral formulations at home	X		X
Type of enteral formulation handled at home			X
Guidance on handling enteral formulations			X

Subtitle: PFH – Instrument for assessing the profile of food handlers in households; PFSE – Instrument for assessing the profile of food handlers in food service establishments; PEFHH – Instrument for assessing the profile of enteral formulations handlers at households

Other distinct questions regarding the sociodemographic characteristics category were the number of people living in the household, and housing conditions, which were only included in the PFH instrument. These aspects were added because, in this case, the handler lives on site and prepares food for all members of the house. Thus, understanding these particularities is important to evaluate their housing conditions. In addition, it is also relevant to understand if the household has basic sanitation, minimum conditions of hygiene and organization, and an appropriate place for handling and preparing food since the absence of these elements interferes with its quality and safety. A study evaluated the housing conditions of food handlers and identified that individuals using pit latrine toilets were 3 times more likely to be contaminated with *Salmonella*, a notable bacterium when it comes to Foodborne Diseases²². Thus, the lack of toilets and sewage systems, for example, can predispose food handlers to direct contact with pathogenic microorganisms that might contaminate the food. Based on this, we included specific questions regarding that matter in the PFH instrument.

Some specificities were found in the questions of the instruments regarding the professional characteristics category (Table). The PFSE and PEFHH instruments presented a question about experience in food handling, which is relevant since professionals who have worked for longer may practice more appropriate handling procedures due to the continuous exposure and repetition of work-related exercises²³. In the PFH instrument, this question is not relevant since food preparation is an everyday activity for many families.

Another distinction found in this category was that only the PFH and PEFHH instruments presented questions about the handler's job and how often he/she handles the food and/or enteral formulations. The occupation was included because the handler may have other tasks besides handling food and/or enteral formulations. The question about the frequency that food and/or enteral formulations are handled was added because this activity may not be daily, as required in food service.

Other specific questions for the PFSE instrument in the professional characteristics category were about the name of the food service, line of business, role of the food handler in the food service, activities performed in food handling, frequency in which he/she works in the food service, work shift, working hours, working time in the food service, whether the company has given him/her a health examination, participation in training on hygiene care in food handling, and presence of any habit change after the training (Table).

Among the items aforementioned, we highlight the health examinations (periodic and before admission) for food handlers in food services. The handler can be an asymptomatic carrier of pathogenic microorganisms and act as a contamination source for the preparations if proper hygiene procedures during manipulation are not followed²⁴. It is also noteworthy that handlers who undergo health examinations by the company are more likely to follow proper hygiene practices than those who are not examined, as they usually receive recommendations during the examination and understand more clearly the hygiene procedures that must be applied^{23,25}.

Also in the professional characteristics category, the questions about how many people eat at home and which meals are prepared were included in the PFH instrument to know the relationship between the amount of food prepared and the number of people who consume it.

In the general information category, only the PFH and PEFHH instruments presented a question about gastrointestinal problems after consuming food or enteral formulations at home since many home handlers believe that performing this task does not present a risk of Foodborne Diseases. Other distinctions in this category

were observed in the PEFHH instrument, which includes a question about the type of the enteral formulation handled which is relevant to know whether the preparation is industrialized, homemade, or mixed due to the risks during handling and a question about guidance in handling enteral formulations. The last question was included because many HEN handlers lack knowledge about procedures that should be applied during the manipulation of food and/or enteral formulations and are also unaware of their role in ensuring food safety^{4,26}. On the other hand, institutions and/or healthcare professionals can guide and inform patients and families about the proper handling of enteral formulations in the home environment (**Table**).

It is important to note that, in food services or at home, qualification in food and enteral formulation handling promotes changes in habits and practices on the part of the handler. Many studies have addressed the topic, demonstrating that food safety orientation and qualification tend to change the attitudes, beliefs, and behaviors adopted by the handler, resulting in improved knowledge and hygiene in food handling practices²⁷⁻³⁰.

Finally, the general information category considers that satisfaction at work or with the task being performed is also an important factor for productivity. Therefore, it appears on all three instruments. A study found that individuals satisfied with their role/job are more productive³¹. In addition, handlers who are satisfied with their work tend to create a safer environment regarding food handling³².

The knowledge about the perception of the risk of developing some gastrointestinal problem after consuming food or enteral formulation is also important, as studies have shown that the greater the understanding that handling can compromise food safety, the greater the care taken in the process and, consequently, the lower the risk of contamination^{3,33}.

Lastly, it is evident that, although the profile of food and enteral formulation handlers has already been evaluated in some studies^{3,4,14,22}, and most of the characteristics regarding the profile of these individuals are similar, the evaluations were performed using questions that were often different among studies. This shows the absence of standardized instruments that evaluate the profile of food and enteral formulation handlers. Therefore, the PFH, PFSE, and PEFHH instruments are original and proved to be relevant in proposing a compilation of questions that allows us to know the sociodemographic and professional characteristics, as well as general information about the profile of handlers.

While the findings of this research are pertinent, the developed instruments lack validation, potentially limiting their effectiveness. Moreover, there is a concern that these instruments may not adequately capture the diverse and intricate contexts within which food handlers and handlers of enteral formulations operate. Nevertheless, this study contributes valuable insights to the literature by recognizing the significance of understanding the profiles of these individuals, thereby facilitating more targeted and effective health interventions. Furthermore, the integration of a literature review (Scoping review) with expert consultations underscores a growing inclination toward employing multidisciplinary and collaborative methodologies in crafting assessment tools.

The knowledge about the profile of food and enteral formulation handlers is relevant for obtaining a more accurate diagnosis of who handles food in both food services and homes. Once these characteristics are outlined, we can plan more specific health education strategies and actions for this public^{3,4,33}. In food services, this information can also help in the development of intervention proposals and actions related to food safety and in the planning of training programs considering the reality and specificities of these individuals. They may also assist researchers in developing protocols and guidelines that can consistently provide evidence-based guidance to food handlers.

CONCLUSION

The development of instruments to evaluate the PFH, PFSE, and PEFHH is a significant step toward promoting more effective health education actions for these individuals. Through a scoping review and expert consultations, a comprehensive set of questions was identified and organized into instruments tailored to each specific segment.

These instruments cover personal data, sociodemographic and professional characteristics, and general information, providing a holistic view of food and enteral formulation handlers. These tools will be valuable for nutritionists, researchers, and other professionals involved in assessing and addressing the needs of food handlers, ultimately contributing to improved food safety and public health outcomes.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there are no conflicting interests.

FUNDING

The authors did not declare.

ACKNOWLEDGMENTS

The author would like to thank the Academic Publishing Advisory Center (Centro de Assessoria de Publicação Acadêmica, CAPA – www.capa.ufpr.br) of the Federal University of Paraná (UFPR) for assistance with English language translation and developmental editing.

AUTHOR'S CONTRIBUTIONS

Julia Fernanda Costa Kozow: conception and design of the research. Rayane Luizi da Costa, Caroline Opolski Medeiros and Lize Stangarlin-Fiori: design and analysis of research data. All authors critically reviewed and approved the manuscript.

REFERENCES

1. 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.
2. Prefeitura Municipal de Curitiba (Paraná – Brasil). Cartilha do paciente em terapia nutricional enteral domiciliar. 3. ed. Curitiba (PR); 2019. [accessed 2021 Feb 12]. Available from: https://saude.curitiba.pr.gov.br/images/Cartilha_Paciente_Terapia_Nutricional_Enteral_Domiciliar.pdf
3. Deon BC, Medeiros LB, Hecktheuer LH, Saccol ALF. Perfil de manipuladores de alimentos em domicílios. Ciênc Saúde Colet. 2014;19(5):1553-9. <https://doi.org/10.1590/1413-81232014195.04892013>

4. Galindo CO, Beux MR, Costa RL, Uniat KC, Leobet J, Ferreira SMR et al. Home-prepared enteral tube feeding: evaluation of microbiological contamination, hygiene, and the profile of the food handler. *Nutr Clin Pract*. 2021;36(3):704-17.
<https://doi.org/10.1002/ncp.10577>
5. Nasrolahei M, Mirshafiee S, Kholdi S, Salehian M, Nasrolahei M. Bacterial assessment of food handlers in Sari City, Mazandaran Province, north of Iran. *J Infect Public Health*. 2017;10(2):171-6.
<https://doi.org/10.1016/j.jiph.2016.03.006>
6. Mengist A, Mengistu G, Reta A. Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of Salmonella and Shigella among food handlers in catering establishments at Debre Markos University, Northwest Ethiopia. *Int J Infect Dis*. 2018;75:74-9.
<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.08.008>
7. Somura Y, Mizukoshi F, Nagasawa K, Kimoto K, Oda M, Shinkai T et al. A food poisoning outbreak due to food handler-associated contamination with the human norovirus GII.P16-GII.2 Variant strain in Italian cuisine in Tokyo during the 2016/17 winter season. *Jpn J Infect Dis*. 2018;71(2):172-3.
<https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2017.264>
8. McIntyre L, Vallaster L, Wilcott L, Henderson SB, Kosatsky T. Evaluation of food safety knowledge, attitudes and self-reported hand washing practices in FOODSAFE trained and untrained food handlers in British Columbia, Canada. *Food Control*. 2013;30(1):150-6.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.06.034>
9. Pichler J, Ziegler J, Aldrian U, Allerberger F. Evaluating levels of knowledge on food safety among food handlers from restaurants and various catering businesses in Vienna, Austria 2011/2012. *Food Control*. 2014;35(1):33-40.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.06.034>
10. Smigic N, Djekic I, Martins ML, Rocha A, Sidiropoulou N, Kalogianni EP. The level of food safety knowledge in food establishments in three European countries. *Food Control*. 2016;63:187-94.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.11.017>
11. Tegegne HA, Phyto HWW. Food safety knowledge, attitude and practices of meat handler in abattoir and retail meat shops of Jigjiga Town, Ethiopia. *J Prev Med Hyg*. 2017;58(4):E320-E327.
<https://doi.org/10.15167/2421-4248/jpmh2017.58.4.737>
12. Abdi AM, Amano A, Abraham A, Getahun M, Ababor S, Kumie A. Food hygiene practices and associated factors among food handlers working in food establishments in the Bole Sub City, Addis Ababa, Ethiopia. *Risk Manag Healthc Policy*. 2020;13:1861-8.
<https://doi.org/10.2147/RMHP.S266342>







13. Nesbitt A, Thomas MK, Marshall B, Snedeker K, Meleta K, Watson B et al. Baseline for consumer food safety knowledge and behaviour in Canada. Food Control. 2014;38:157-73.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.10.010>
14. Devides GGG, Maffei DF, Catanozi MPLM. Perfil socioeconômico e profissional de manipuladores de alimentos e o impacto positivo de um curso de capacitação em Boas Práticas de Fabricação. Braz J Food Technol. 2014;17(2):166-76.
<https://doi.org/10.1590/bjft.2014.014>
15. Souza APM, Souza FL, Duarte ECPS, Cabral SMR, Santos MM. Perfil socioeconômico de manipuladores de alimentos da rede municipal de ensino de um município Piauiense. Braz Ap Sci Rev. 2019;3(2):908-17.
<https://doi.org/10.34115/basr.v3i2.928>
16. Polit DF, Beck CT. Fundamentos de pesquisa em enfermagem: avaliação de evidências para a prática da enfermagem. 7ª ed. Porto Alegre: Editora Artmed; 2011.
17. Coluci MZO, Alexandre NMC, Milani D. Construção de instrumentos de medida na área da saúde. Ciênc Saúde Colet. 2015;20(3):925-36.
<https://doi.org/10.1590/1413-81232015203.04332013>
18. Joanna Brings Institute – JBI. The Joanna Briggs Institute reviewers’ manual 2015: methodology for JBI scoping reviews. Adelaide: Joanna Briggs Institute; 2015. Available from:
<https://reben.com.br/revista/wp-content/uploads/2020/10/Scoping.pdf>
19. PRISMA. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses 2020. [accessed 2021 Apr 21]. Available from:
<http://www.prismastatement.org/PRISMAStatement/FlowDiagram>
20. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Pesquisa de orçamentos familiares: 2017-2018. Primeiros resultados. [accessed 2021 Apr 11]. Available from:
<https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv101670.pdf>
21. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. PNAD – Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios. [accessed 2021 Apr 11]. Available from:
<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/sociais/rendimento-despesa-e-consumo/9127-pesquisa-nacional-por-amostra-de-domicilios.html?=&t=destaques>

22. Olalekan AW, Oluwaseun FA, Oladele HA. Prevalence and knowledge of *Salmonella* infections among food handlers: implications for school health in Southwestern Nigeria. Sahel Med J. 2018;21(2):99-103. https://doi.org/10.4103/smj.smj_27_16
23. Legesse D, Tilahun M, Agedew E, Haftu D. Food handling practices and associated factors among food handlers in Arba Minch Town public food establishments in Gamo Gofa Zone, Southern Ethiopia. Epidemiology (Sunnyvale). 2017;7:302. <https://doi.org/10.4172/2161-1165.1000302>
24. Kumar R, Dudeja P, Maurya A, Singh DK. Medical examination of food handlers: a missing link in food safety. Int J Med Sci Public Health. 2019;8(9):728-32. <http://doi:10.5455/ijmsph.2019.061662106201>
25. Azanaw J, Gebrehiwot M, Dagne H. Factors associated with food safety practices among food handlers: facility-based cross-sectional study. BMC Res Notes. 2019;12(1):683. <http://doi.org/10.1186/s13104-019-4702-5>
26. Liu S, Liu Z, Zhang H, Lu L, Liang J, Huang Q. Knowledge, attitude and practices of food safety amongst food handlers in the coastal resort of Guangdong, China. Food Control. 2015;47:457-61. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.048>
27. Al-Shabib NA, Mosilhey SH, Husain FM. Cross-sectional study on food safety knowledge, attitude and practices of male food handlers employed in restaurants of King Saud University, Saudi Arabia. Food Control. 2016;59:212-7. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.05.002>
28. Tiozzo B, Mari S, Ruzza M, Crovato S, Ravarotto L. Consumer's perceptions of food risks: a snapshot of the Italian Triveneto area. Appetite. 2017;111:105-15. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2016.12.028>
29. Woh PY, Thong KL, Behnke JM, Lewis JW, Zain SNM. Evaluation of basic knowledge on food safety and food handling practices amongst migrant food handlers in Peninsular Malaysia. Food Control. 2016;70:64-73. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.05.033>
30. Husain NRN, Muda WMW, Jamil NIN, Hanafi NNN, Rahman RA. Effect of food safety training on food handlers' knowledge and practices: A randomized controlled trial. Br Food J. 2016;118(4):795-808. <https://doi.org/10.1108/BFJ-08-2015-0294>

31. Oswald AJ, Proto E, Sgroi D. Happiness and productivity. J Labor Econ. 2015;33(4):789-822.
<https://doi.org/10.1086/681096>
32. Daskin M. The role of job satisfaction and intrinsic motivation on hygienic attitudes and behaviours in fast-food restaurants. Tourism: An International Interdisciplinary Journal. 2019;67(1):59-72.
<https://hrcak.srce.hr/en/218773>
33. Byrd-Bredbenner C, Berning J, Martin-Biggers J, Quick V. Food safety in home kitchens: a synthesis of the literature. Int J Environ Res Public Health. 2013; 10(9): 4060-85.
<http://doi.org/10.3390/ijerph10094060>

Endotoxin test by recombinant Factor C for 0.9% sodium chloride injection

Teste de endotoxina por Fator C recombinante para solução injetável de cloreto de sódio 0,9%

Ellen Gameiro Hilinski^{1,2*} , Daniela Dal Molim Ghisleni¹ , Carla Lilian de Agostini Utescher³ , Wagner Quintilio⁴ , Adriana Aparecida Buzzo Almodovar² , Adriana Bugno⁵ , Terezinha de Jesus Andreoli Pinto¹ 

¹ Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Brasil.

² Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes, Instituto Adolfo Lutz, Brasil.

³ Laboratório de Virologia, Instituto Butantan, Brasil.

⁴ Laboratório de Biotecnologia Viral, Instituto Butantan, Brasil.

⁵ Diretoria Geral, Instituto Adolfo Lutz, Brasil.

*Corresponding author/Autor de correspondência: ellen.hilinski@ial.sp.gov.br

Received/Recebido: 01.04.2024

Accepted/Aceito: 03.06.2024

Publication/Publicação: 13.06.2024

Editor-in-chief/Editor Chefe: Adriana Bugno

ABSTRACT

Endotoxin contamination is a threat to the safety of pharmaceutical products, especially parenteral drugs. Any sterile and/or pyrogen-free pharmaceutical product requires regulatory specifications to ensure safe patient use. This study covers the performance evaluation study of an endotoxin quantitation commercial kit by recombinant Factor C (rFC), Endozyme II[®] Go, for 0.9% sodium chloride injection. The samples were spiked with endotoxin solutions between 0.0005 and 10 EU/mL and tested by the rFC kit to evaluate precision, accuracy, detection and quantification limits, linearity, and robustness. Each of the six points was assayed at least five times. The relative standard deviation for precision testing ranged from 1.9 to 8.3%. The recovery accuracy values of endotoxin were between 61% and 125% for the range from 0.005 to 10 EU/mL. The results demonstrated that the rFC method allows endotoxin quantification with accuracy, precision, specificity, and linearity for the range of 0.005 and 10 EU/mL for 0.9% sodium chloride injection.

Keywords. Recombinant Factor C, Endotoxins, In Vitro Test, Saline Solution.

RESUMO

A contaminação por endotoxinas é uma ameaça à segurança dos produtos farmacêuticos, especialmente dos medicamentos parenterais. Qualquer produto farmacêutico estéril e/ou livre de pirogênios requer especificações regulatórias para garantir a segurança de uso para o paciente. Este estudo abrange o estudo de avaliação de desempenho empregando o kit comercial Endozyme II[®] Go para quantificação de endotoxina, por Fator C recombinante (FCr), em amostras de cloreto de sódio 0,9% para uso parenteral. As amostras foram fortificadas com cinco concentrações distintas de soluções de endotoxina na faixa entre 0,0005 e 10 UE/mL. Cada um dos cinco níveis foi testado pelo menos cinco vezes para avaliação dos critérios de precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação, linearidade e robustez. O desvio padrão relativo para os testes de precisão variou de 1,9 a 8,3%. Os valores de recuperação de endotoxina para o parâmetro exatidão estiveram compreendidos entre 61% e 125%. Os resultados demonstraram que o método por FCr permite a quantificação de endotoxinas com exatidão, precisão, especificidade e linearidade para a faixa de 0,005 e 10 UE/mL em amostras de cloreto de sódio 0,9% para uso parenteral.

Palavras-chave. Fator C Recombinante, Endotoxinas, Técnicas In Vitro, Solução Salina.

INTRODUCTION

Endotoxin contamination is a threat to the safety of pharmaceutical products, especially parenteral drugs. To ensure the safety of patients, any sterile and/or pyrogen-free pharmaceutical product should be evaluated to verify compliance with regulatory specifications¹. The presence of substantial amounts of endotoxin in the bloodstream can cause fever, chills, hypotension, breathing difficulties in adults, diffuse intravascular coagulation, and multiple organ failure². In the human bloodstream, the presence of low endotoxin levels, between 0.4 and 0.8 ng/kg, may cause slight depression in the immune system and a mild increase in tumor necrosis factor (TNF) and interleukins (IL-6) levels in the blood. In contrast, a dose range of 2 to 4 ng/kg body weight can cause flu-like symptoms (fever, myalgia, headaches, nausea) and an increase of TNF and IL-6 in the blood, in a similar mechanism observed in sepsis frames³.

Microorganisms related to water treatment systems are generally Gram-negative bacteria, such as *Pseudomonas* spp, and can grow in nutrient-poor environments, such as water or saline solutions. In these environments, endotoxins can be found at elevated levels, except in highly purified water forms, as the water for injection⁴.

Therefore, to ensure that all parenteral products for human use are endotoxin-free, quality control testing is mandatory⁵. The pyrogen test in rabbits (Rabbit Pyrogen Test – RPT), developed at the beginning of the 20th century, has proven its utility in establishing drug safety for many years⁶.

However, this *in vivo* test is expensive, ethically questionable, and not suitable for some pharmaceutical products⁷. An alternative test, based on the observation that horseshoe crab hemolymph (*Limulus polyphemus*) clots in the presence of endotoxins, was later developed. The called *Limulus* amoebocyte lysate test (LAL) replaced RPT when the potential contaminants are endotoxins. The transition to using the LAL test instead of rabbits represented an incremental step away from laboratory animal-based assays to endotoxin quantification in pharmaceutical products. However, some biologicals, such as plasma fractions or plasma-derived medicinal products, may contain components that interfere with the detection of endotoxins in different LAL testing methods⁸⁻¹⁰. Besides, the LAL test depends on an animal population and can contribute as a significant source of injury and potential mortality for the horseshoe crab population¹¹, making it difficult to comply with the commitment to replace and reduce animal use when possible¹².

There are alternatives to RPT and LAL tests, considering the importance of reducing animal testing for pharmaceutical products' quality control. A kit for pyrogen testing based on the Monocyte activation test (MAT), which detects IL-6 induced in human blood monocytes stimulated *in vitro* by pyrogens, was developed^{13,14}, validated in an international collaborative study¹⁵, and evaluated for the quality control routine of biological products. However, its drawbacks did not make it the ultimate alternative test for pyrogens¹⁶. Another alternative is the use of the recombinant factor C (rFC). Factor C is a zymogen, part of the horseshoe crab clotting cascade cloned and expressed in cell cultures first in 1997¹⁷. In the traditional LAL test, the endotoxin is detected by a visible gel clot formation as a result of a cascade of serine protease reactions started by Factor C activation¹⁸. Some limitations of this method include false-positive results obtained by cross-reaction of LAL with β -glucans interference. In fact, in the presence of endotoxin, the enzyme is activated, and the active enzyme cleaves a synthetic substrate, resulting in a fluorogenic compound.

Although the reagent (rFC) has been commercialized for almost 15 years, its wide use in the pharmaceutical industry is lagging, most likely due to historical concerns related to the few suppliers and the lack of inclusion in most of the global pharmacopeias¹⁹.

According to the results obtained by an industry consortium of biopharmaceutical manufacturers, the ability to rFC detect naturally occurring endotoxins in the presence of the test inhibitors, such as sodium citrate buffers, with a high limit of detection is one of the advantages of using this alternative method²⁰. However, limitations to test samples containing proteases that can release fluorophore in the absence of endotoxin were identified by Marius and colleagues²¹.

Two suppliers for detection systems based on rFC are available in most global markets, and both reagents rely on the binding of the endotoxins to the rFC and a fluorescent substrate. Pyrogene™ (from Lonza) and Endonext platform (from bioMérieux) detect the endotoxin in the liquid phase by its binding to a fluorescent substrate. For samples with simple matrices, such as WFI or parenteral saline solution, Pyrogene™ or Endozyme II Go® (from the Endonext platform) are the recommended choices.

To evaluate whether the commercial kit Endozyme II Go® can be an option for endotoxin quantitation in 0.9% sodium chloride injection, the study considered all the parameters described by The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH)²² and by the United States Pharmacopeia⁵ for quantitative method validation.

MATERIAL AND METHODS

Kits, reagents, and samples

The 0.9% sodium chloride injection manufactured by Braun (Rio de Janeiro, Brazil – 0.9% Normal saline Ecoflac Plus 1000 mL) was used as a sample to be tested by Endozyme II® Go kit (bioMérieux, Germany). The kit consists of rFC, fluorometric substrate, nonpyrogenic water, substrate buffer, and a pre-coated plate with a standard LPS curve from 0.005 to 50 EU/mL. All the experiments were performed with the same batches of samples and kits. Endotoxin standard 500 EU/mL (bioMérieux, Germany), from *E. coli* O55:B5, was used for spiking the samples. Solutions were prepared in endotoxin-free borosilicate glass tubes (bioMérieux, Germany) with nonpyrogenic water followed by vigorous mixing for at least 3 minutes between each dilution.

Equipments

The equipment Synergy™ HTX Multi-Mode microplate reader for fluorescence (Biotek, United States of America) and MS2 Minishaker 2500 rpm (IKA, Germany) were used.

Study design

This study was performed according to ICH Guidelines for Validation of Analytical Procedures (Q2(R1))²² and the United States Pharmacopeia⁵. Precision, Accuracy, Detection and Quantification Limits, Linearity, Specificity, and Robustness were evaluated considering the acceptance criteria established in the guidelines^{5,22}. For precision and accuracy, the samples were spiked with endotoxin (*E. coli* O55:B5)

solutions at 0.0005 EU/mL, 0.005 EU/mL, 0.05 EU/mL, 0.5 EU/mL, 5 EU/mL and 10 EU/mL. Each point was repeated at least five times, except for 0.005 EU/mL and 0.5 EU/mL points, performed at least ten times by two different analysts on two separate days. For robustness, small changes in the time of enzyme-substrate dispensing were made to check the effect of this change on the results. Each condition (time zero and five minutes) was repeated ten times using the 0.5 EU/mL spiked sample. The test is software auto-validated, i.e., for each dilution, there must be a spiked duplicate with endotoxin at 0.5 EU/mL. The software validates the results according to this spike.

Endotoxin determination

Endotoxin quantification was carried out with the Endozyme II[®] Go kit according to the supplier's instructions in a BioTek Synergy[™] HTX fluorescence microplate reader (380 nm excitation and 445 nm emission). Briefly, samples (spiked or not) were placed on the plate in four replicates. After incubation (5 minutes, 37 °C), the solution containing the rFC and the fluorogenic substrate was added, and the fluorescence was recorded every 5 minutes until 60 minutes of incubation (37 °C). The software (Gen5[™] v. 3.05 software for MS Windows[™]) calculated the curves and estimated the endotoxin concentration based on the standard curve in each pre-filled microplate. The test is valid if the recovery of endotoxin in the positive product control in each test is between 50-200% of the nominal value and if the coefficient of variation between the sample and positive product control replicates is less than 25%^{5,22}.

Statistical analysis

The statistical analyses were conducted using the Minitab[®] v.18 software (Minitab Inc., USA) to calculate the RSD for precision and robustness, and the percentage of control endotoxin recovery for accuracy. Whenever needed, the comparisons were made by non-parametric ANOVA considering $p < 0.05$. The linear regression analysis was performed to assess linearity.

RESULTS AND DISCUSSION

With increasingly strict specification limits for bacterial endotoxins in parenteral products, developing and implementing alternative analytical methods that allow the release of reliable results can be a challenge, as before any routine use, whether in quality control or the development of medicines, every assay should be validated. Recombinant Factor C assay is an alternative to BET (Bacterial endotoxin test) enlightened by the 3R's concept¹². The test requires validation before considering its use for quality control of parenteral products.

As a pioneering approach, in 2021, the European Pharmacopoeia published a specific chapter referring to the endotoxin assay using rFC²³, which guided the inclusion of this methodology as one of the compendial methods listed in the chapter on bacterial endotoxins²⁴. With the introduction of this new chapter, the bacterial endotoxin test using rFC can be extended after demonstrating suitability for the intended use, eliminating the need for a full performance assessment. It should be noted, however, that despite the publication of this new chapter, the replacement of an LAL-based method prescribed in the

European monograph with an rFC-based method is considered to be the use of an alternative method. Therefore, until now, only two monographs have been revised and updated to include the rFC-based method as a compendial: water for injections²⁵ and purified water monographs²⁶.

Based on this regulatory scenario, the commercial kit Endozyme II[®] Go was evaluated considering the parameters precision, accuracy, linearity, specificity, and robustness.

The RSD from precision results between 0.0005 and 10 EU/mL were lower than 30%, in compliance with the guidelines^{5,22} (Table 1). As expected, the highest value of RSD was obtained for the lowest level of the endotoxin sample.

Table 1. Precision and intermediate precision results

Spike (EU/mL)	Replicate number (n)	Spiked sample			Positive Product Control (0.5 EU/mL)		
		Calculated mean (EU/mL)	Standard deviation (EU/mL)	RSD (%)	Calculated mean (EU/mL)	Standard Deviation (EU/mL)	RSD (%)
0.0005	5	0.009	0.002	18.6	0.406	0.086	21.2
0.005	10	0.006	0.001	8.3	0.363	0.023	6.3
0.05	5	0.042	0.001	3.3	0.424	0.027	6.3
0.5	10	0.381	0.007	1.9	0.739	0.024	3.2
5	5	3.505	0.226	6.4	3.940	0.189	4.8
10	5	6.146	0.242	3.9	6.611	0.382	5.8

Spike (EU/mL)	Replicate number (n)	Spiked sample			Positive Product Control (0.5 EU/mL)		
		Calculated mean (EU/mL)	Standard deviation (EU/mL)	RSD (%)	Calculated mean (EU/mL)	Standard Deviation (EU/mL)	RSD (%)
0.005	20	0.006	0.001	13.3	0.517	0.214	21.3
0.5	20	0.388	0.018	4.7	0.7251	0.038	5.3

As the analyst differences may explain the variability of measurements, the repeatability and reproducibility (R&R) study was carried out. The detected fluorescence values obtained by analysts A and B for samples spiked with 0.005 EU/mL and 0.5 EU/mL were used for conducting the statistical analysis (Table 1). The ANOVA test results were more significant than 0.05 for the *p*-values related to each endotoxin concentration evaluated ($p_{0.005 \text{ EU/mL}} = 0.75$; $p_{0.5 \text{ EU/mL}} = 0.07$), indicating that the interaction between day and analyst was not significant at the level of significance of 5%. The RSD from intermediate precision results were 13.3% (n = 20) and 4.7% (n = 20) for 0.005 EU/mL and 0.5 EU/mL, respectively, in compliance with the acceptance criteria^{5,22}.

Considering the lowest endotoxin concentration evaluated (0.0005 EU/mL), the average recovery value for accuracy was higher than the established acceptance criteria^{5,22}, namely between 50 and 200% (Figure 1). This endotoxin concentration is one order of magnitude (1/10) lower than the detection limit test reported by the kit manufacturer. Therefore, the results obtained were above the detection limit.

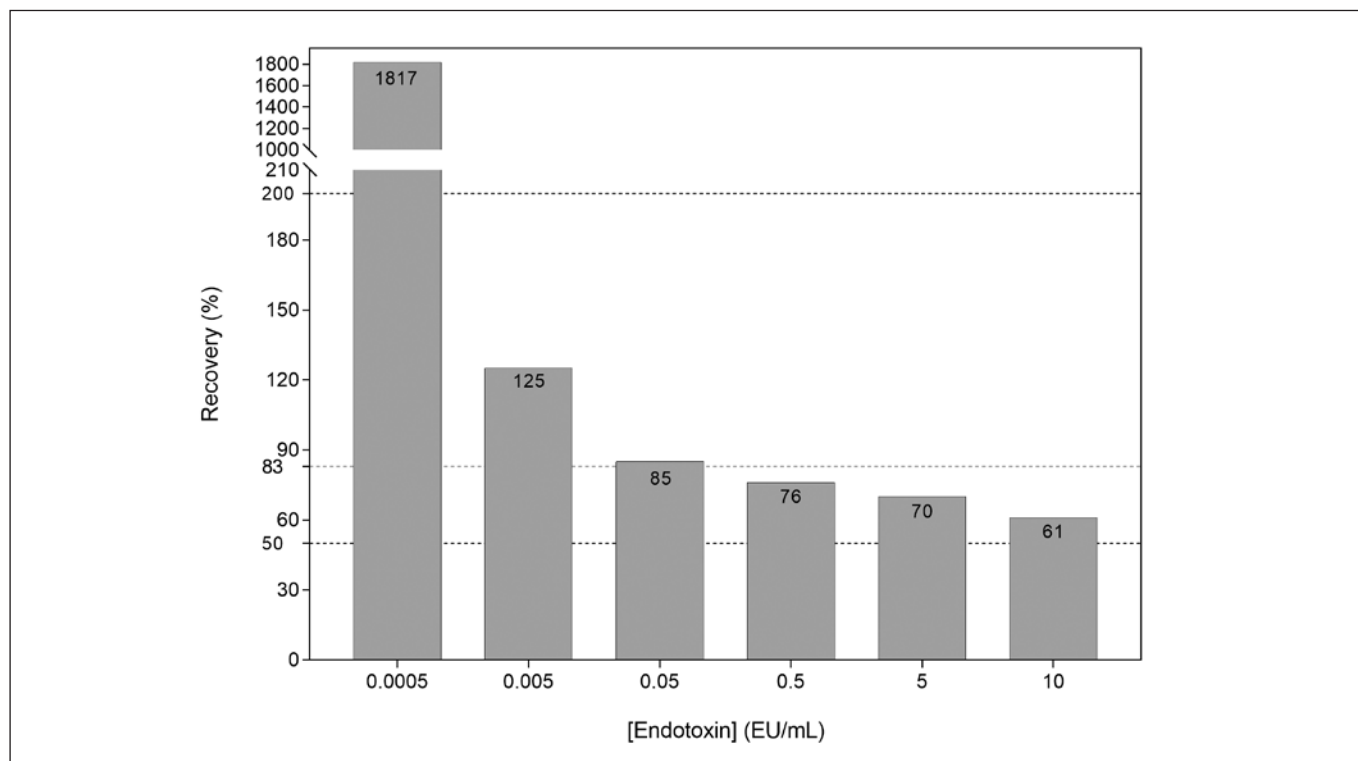


Figure 1. Average endotoxin recovery from spiked samples. Numbers on the column indicate the recovery for each endotoxin spike. The dotted line at 83% represents the overall average for endotoxin recovery (disregarding 0.0005 EU/mL). Limits between 50% and 200% are considered valid

For the concentration levels between 0.005 and 10 EU/mL, the recovery values of endotoxin were greater than 61% and lower than 125% (**Figure 1**). The average was 83% of endotoxin recovery (0.0005 EU/mL was not considered).

The concentration of 0.0005 EU/mL was used to show that concentrations below the minimum of the standard curve tend to give incorrect results, as demonstrated by the high recovery value obtained (**Figure 1**), i.e. below 0.0005 EU/mL the response is not linear, and the results may not be considered. The assay includes quadruplicate negative controls and calculations are only performed if the controls fluoresce below the most dilute point on the standard curve, as per the manufacturer’s recommendations.

Based on the standard deviation of the blank, the detection and quantification limits of the method were calculated (**Table 2**). Although the concentration level of 0.0005 EU/mL presented positive detection in all replicates, the lowest endotoxin concentration assessed that met the precision, accuracy, and linearity criteria was 0.005 EU/mL. For all these reasons, the detection and quantification limits were established at 0.005 EU/mL.

Table 2. Detection and quantification limit results

	Replicate number (n)	dRFU Mean	SD
Blank	4	2.2	5.3
0.0005 EU/mL	5	5.9	1.7
0.005 EU/mL	10	23.1	4.4

Notes: dRFU = relative fluorescence unit (RFU) difference between first and last assay read. SD = standard deviation. Limit of detection = $dRFU\ Mean(0.005\ EU/mL) - dRFU\ Mean(Blank) \geq 3.3 \times SD(Blank)$. Limit of quantification = $dRFU\ Mean(0.005\ EU/mL) - dRFU\ Mean(Blank) \geq 1.6 \times (SD(Blank) + SD(0.005\ EU/mL))$

The regression analysis has shown a linear correlation ($R^2 = 1.00$) between the detected fluorescence values and the endotoxin concentration for the range from 0.005 to 10 EU/mL, as shown in **Figure 2**.

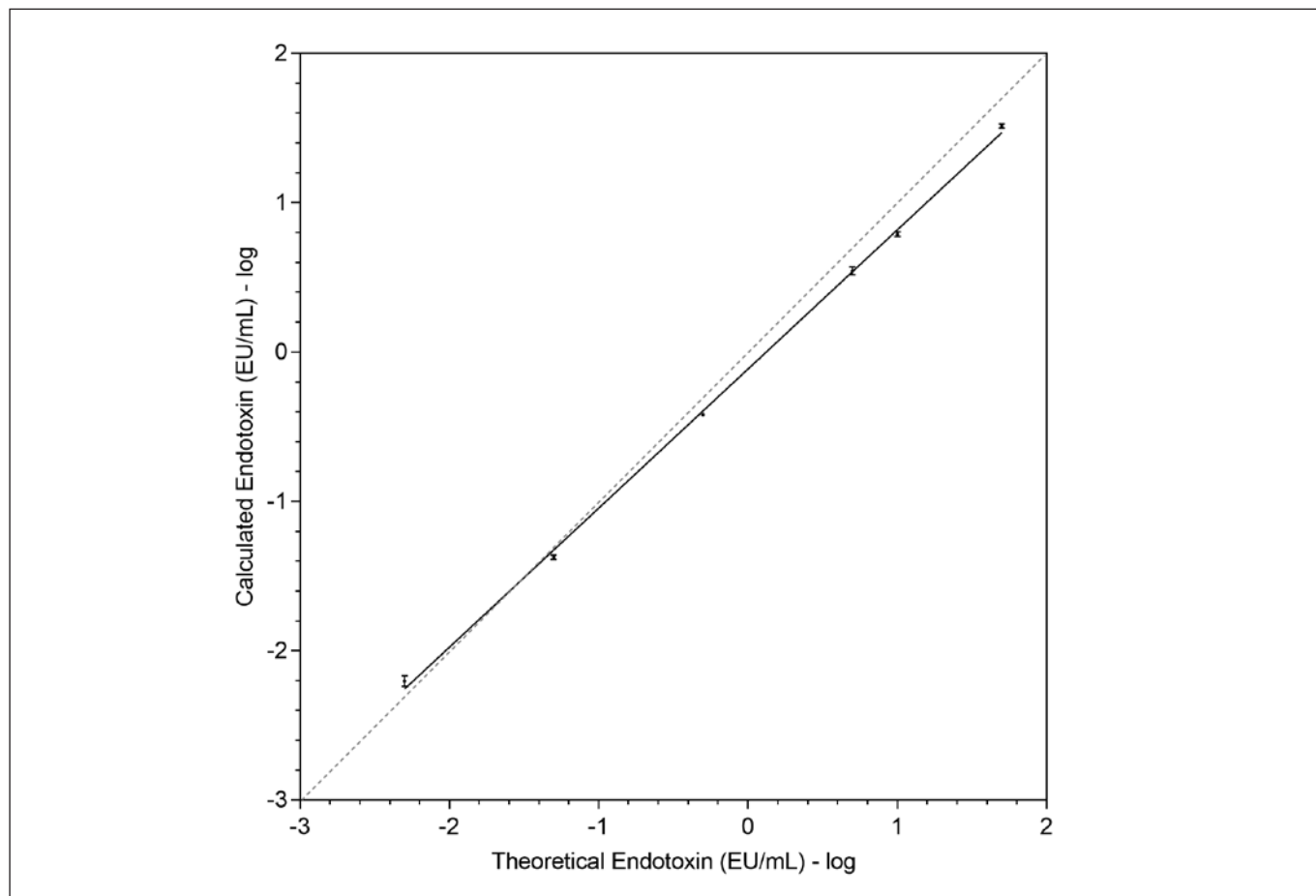


Figure 2. Linear regression analysis from 0.005 to 10 EU/mL: measured vs. nominal endotoxin concentration. $Y = 0.9316x - 0.1134$. Where $Y = \text{Calculated Endotoxin (EU/mL) log}$ and $x = \text{Theoretical Endotoxin (EU/mL) log}$. $R^2 = 0.9991$

To understand the limits of the operating parameters of the method, the time for the addition of the enzyme-substrate was chosen to be evaluated as a robustness parameter because it is a critical point mentioned in the Endozyme II® Go manufacturer’s instructions for use. The ANOVA test, used to assess the statistical differences ($p\text{-value} \geq 0.05$) between the results obtained in two different conditions on enzymatic reagent dispensing (**Table 3**), showed that the differences observed between conditions were not significant ($p = 0.61$).

Table 3. Robustness results: changes in time of enzyme-substrate dispensing

Condition	0.5 EU/mL Spiked sample			Positive Product Control (0.5 EU/mL)		
	Endotoxin (EU/mL)	Standard deviation (EU/mL)	RSD (%)	Endotoxin (EU/mL)	Standard deviation (EU/mL)	RSD (%)
Time zero	0.377	0.037	9.7	0.744	0.070	9.4
After five minutes	0.385	0.023	6.1	0.750	0.036	4.9

According to the kit's validity criteria, a critical issue considering endotoxin assays is the rate of invalid results. Results were considered invalid when Positive Product Control (PPC) recoveries were less than 50% or more than 200%, or if the RSD for sample/PPC replicates were more than 25%²⁷. There was 8.0% (n = 7) of invalid data in this validation study: 4.6% (n = 4) related to sample/PPC recovery and 3.4% (n = 3) related to sample/PPC RSD, a higher value than that observed by Marius et al²⁸.

Large-volume parenteral solutions do not have a specific dosage, as they are diluents or irrigation solutions. The administration of large volumes of this category of products combined with the levels of endotoxins in medications administered together can expose patients to a high risk of poisoning. Therefore, implementing alternative methods that allow low-level quantification of bacterial endotoxins, such as rFC methods, has great relevance in ensuring the safety and quality of large-volume parenteral pharmaceutical products.

According to recent European Pharmacopoeia publications²³⁻²⁶ establishing endotoxin testing employing rFC as a compendial method and including this methodology in updated monographs, along with moves by the American Pharmacopoeia²⁹ in the same direction, the use of recombinant reagents for endotoxin detection offers an opportunity to the pharmaceutical area to modernize procedures and significantly contribute to the conservation of horseshoe crabs and reducing the use of rabbits in testing.

CONCLUSION

The commercial rFC alternative method, Endozyme II® Go, met the accuracy, precision, and linearity criteria from 0.005 to 10 EU/mL for 0.9% sodium chloride injection samples. Limits of detection and quantification were set at the lowest concentration (0.005 EU/mL). Robustness tests showed that deviations in enzyme-substrate addition times and the binding times did not affect the results.

Despite its advantages, such as improved sensitivity, reduced occurrence of false-positive results for glucans, the benefits linked to the conservation of horseshoe crabs, and adherence to the 3Rs, additional studies need to be developed to assist the sector in the face of reliability and risk assessment, to ensure patient safety.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there are no conflicts of interest.

FUNDING

This work was supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP) grant number n° 2018/19237-4.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

Ellen Gameiro Hilinski, Daniela Dal Molim Ghisleni, Carla Lilian de Agostini Utescher, Wagner Quintilio: design, planning, analysis, and interpretation of data, drafted a version of the article, critical revision of the text. Adriana Aparecida Buzzo Almodovar: critical revision of the text. Adriana Bugno: design, and critical revision of the text. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto: project coordination, design, planning, interpretation of data, critical revision of the text. All authors read and approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGEMENTS

CLAU and WQ receive a productivity fellowship from Fundação Butantan.

PRESENTATION NOTE

The results of this article are part of Ellen Gameiro Hilinski's doctoral thesis, entitled "Alternative methods for evaluating endotoxins: challenges and international trends for patient safety", which will be defended in 2024 by the Postgraduate Program in Pharmaceuticals and Medicines from the Faculty of Pharmaceutical Sciences of the University of São Paulo.

REFERENCES








1. Bolden JS, Warburton RE, Phelan R, Murphy M, Smith KR, Felippis MR et al. Endotoxin recovery using *limulus* amoebocyte lysate (LAL) assay. *Biologicals*. 2016;44:434-40. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2016.04.009>
2. Schletter J, Heine H, Ulmer AJ, Rietschel ET. Molecular mechanisms of endotoxin activity. *Arch Microbiol*. 1995;164:383-89. <https://doi.org/10.1007/BF02529735>
3. DellaGioia N, Hannestad J. A critical review of human endotoxin administration as an experimental paradigm of depression. *Neurosci Biobehav*. 2010;34(1):130-43. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2009.07.014>
4. Sandle T. Characterizing the microbiota of a pharmaceutical water system – A metadata study. *SOJ Microbiol Infect Dis*. 2015;3(2):1-8. <https://doi.org/10.15226/sojmid/3/2/00133>
5. United States Pharmacopeia – USP. <1223> Validation of alternative microbiological methods. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2023. https://doi.org/10.31003/USPNF_M99943_03_01
6. Hasiwa N, Daneshian M, Bruegger P, Fennrich S, Hochadel A, Hoffmann S et al. Evidence for the detection of non-endotoxin pyrogens by the whole blood monocyte activation test. *ALTEX*. 2013;30:169-208. <https://doi.org/10.14573/altex.2013.2.169>
7. Greenhough J. Life cycle of an analytical method – A case study on the monocyte activation test. [publisher unknown]. 1-6. Available from: <https://wickhammicro.co.uk/Content/Downloads/Wickham-Laboratories-Case-Study-on-the-Monocyte-Activation-Test.pdf>
8. European Medicines Agency – EMA. Guideline on the replacement of rabbit pyrogen testing by an alternative test for plasma derived medicinal products. 2009. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-replacement-rabbit-pyrogen-testing-alternative-test-plasma-derived-medicinal-products_en.pdf

9. Potu A, Burra S, Patil AK. Monocyte activation test: A new pharmacoepial quality control test for pyrogens – A Review. J Adv Pharm Sci. 2011;1:122-31.
10. Bolden JS, Claerbout ME, Miner MK, Murphy MA, Smith KR, Warburton RE. Evidence against a bacterial endotoxin masking effect in biologic drug products by *Limulus* ameobocyte lysate detection. PDA J Pharm Sci Technol. 2014;68:472-77.
<https://doi.org/10.5731/pdajpst.2014.00999>
11. Maloney T, Phelan R, Simmons N. Saving the horseshoe crab: A synthetic alternative to horseshoe crab blood for endotoxin detection. PLoS Biol. 2018;16:1-10.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2006607>
12. Russel WMS, Burch RL. The principles of humane experimental technique. Med J Aust. 1960;1:500.
<https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.1960.tb73127.x>
13. Peterbauer A, Werner ER, Werner-Fermayer G. Further development of a cell culture model for the detection of bacterial pyrogens. ALTEX. 1999;16:3-8.
14. Peterbauer A, Eperon S, Jungi TW, Werner ER, Werner-Felmayer G. Interferon- γ -primed monocytoïd cell lines: optimizing their use for in vitro detection of bacterial pyrogens. J Immunol Methods. 2000;233:67-76.
[https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(99\)00189-1](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(99)00189-1)
15. Schindler S, Spreitzer I, Löschner B, Hoffmann S, Hennes K, Halder M et al. International validation of pyrogen tests based on cryopreserved human primary blood cells. J Immunol Methods. 2006;316:42-51.
<https://doi.org/10.1016/j.jim.2006.07.023>
16. Utescher CLA, Buosi KL, Botosso VF, Quintilio W. Monocyte activation test (MAT) as a possibility of replacement for the rabbit pyrogen test in hyperimmune sera. Brazilian J Pharm Sci. 2018;54:3-8.
<https://doi.org/10.1590/s2175-97902018000217530>
17. Ding JL, Chai C, Pui AWM, Ho B. Expression of full length and deletion homologues of *Carcinoscorpius rotundicauda* Factor C in *Saccharomyces cerevisiae*: Immunoreactivity and endotoxin binding. Innate Immun. 1997;4(1):33-43.
<https://doi.org/10.1177/096805199700400105>
18. Ding JL, Ho B. Endotoxin detection – From *Limulus* ameobocyte lysate to recombinant factor C. In: Quinn PJ, Xiaoyuan W (Eds.). Endotoxins Struct. Funct. Recognit. Netherlands: Springer; 2010. p. 187-208.
https://doi.org/10.1007/978-90-481-9078-2_9

19. Bolden J, Smith K. Application of recombinant Factor C reagent for the detection of bacterial endotoxins in pharmaceutical products. PDA J Pharm Sci Technol. 2017;71:405-12.
<https://doi.org/10.5731/pdajpst.2017.007849>
20. Bolden J, Knight M, Stockman S, Omokoko B. Results of a harmonized endotoxin recovery study protocol evaluation by 14 BioPhorum Operations Group (BPOG) member companies. Biologicals. 2017;48:74-81.
<https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2017.05.003>
21. Marius M, Vacher F, Bonnevey T. Comparison of *Limulus* amoebocyte lysate and recombinant factor C assays for endotoxin detection in four human vaccines with complex matrices. PDA J Pharm Sci Technol. 2020;74:394-407.
<https://doi.org/10.5731/pdajpst.2019.010389>
22. The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). [place unknown]; [publisher unknown]; 2005. Available from:
[https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29 Guideline.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf)
23. European Pharmacopoeia. 2.6.32 Test for bacterial endotoxins using recombinant factor C. 10.3 ed. Strasbourg: Council of Europe, 2021.
24. European Pharmacopoeia. 2.6.14 Bacterial endotoxins. 11.0 ed. Strasbourg: Council of Europe, 2022.
25. European Pharmacopoeia. Monographs: Water for injections (0169). 11.4 ed. Strasbourg: Council of Europe, 2023.
26. European Pharmacopoeia. Monographs: Purified Water (0008). 11.4 ed. Strasbourg: Council of Europe, 2023.
27. bioMérieux. Endozyme II Go™: rapid detection of endotoxins by recombinant factor. C049458-01. Munchen: bioMérieux; 2018.
28. Marius M, Vacher F, Bonnevey T. Comparison of bacterial endotoxin testing methods in purified pharmaceutical water matrices. Biologicals. 2020;67:49-55.
<https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2020.07.001>
29. United States Pharmacopeia – USP. <86> Bacterial endotoxins test using recombinant reagents. In: Pharmacopeial Forum 49(6). Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2023. Available from:
https://www.uspnf.com/sites/default/files/uspnf_pdf/EN/USPNF/uspnf-uspnf-notices/86-bacterial-endotoxins-tests-using-recombinant-reagents.pdf

Aplicação de farinhas de coprodutos de frutas em bolos sem glúten

Application of fruit co-product flours in gluten-free cakes

Sabrina Alves Ramos¹ , Daniela Gomes de Moura¹ , Bárbara Eduarda de Laia Queiroz¹ , Rafaela das Dores Pereira¹ ,
Michely Capobiango¹ , Marcio Schmiele² , Tatiana Nunes Amaral^{2*} 

¹ Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.

² Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, MG, Brasil.

*Autor de correspondência/Corresponding author: tatiana.amaral@ict.ufvjm.edu.br

Recebido/Received: 15.10.2023

Aceito/Accepted: 21.04.2024

Publicação/Publication: 11.07.2024

Editor Chefe/Editor-in-chief: Adriana Bugno

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo empregar farinhas de coprodutos de frutas em bolos sem glúten e analisar a qualidade sensorial e tecnológica das receitas. Foi desenvolvido um bolo padrão e seis com adição de 14% de cada farinha de coproduto. Foi realizada avaliação de volume, dureza instrumental e análise sensorial de aceitação. O bolo com farinha da casca de banana apresentou os melhores resultados de volume e dureza, enquanto o bolo com farinha da casca de abacaxi os piores resultados, menor volume e maior dureza. As diferenças de cor dos bolos foram refletidas pela característica de cada farinha adicionada. Todos os bolos atingiram mais de 70% de aceitabilidade sensorial, demonstrando a viabilidade das aplicações. Conclui-se que a utilização de farinhas produzidas com coprodutos de frutas em bolos é uma opção para uma alimentação saudável e sustentável, em especial, para indivíduos celíacos.

Palavras-chave. Farinha de Fruta, Nutrição, Panificação, Sustentabilidade.

ABSTRACT

The present study aimed to use fruit co-product flours in gluten-free cakes and analyze the sensorial and technological quality of the recipes. One standard and six cakes were developed by the addition of 14% of each co-product flour. Volume, instrumental hardness and sensory acceptance analysis were performed. The cake with banana peel flour showed the best results for volume and hardness, while the cake with pineapple peel flour had the worst results, lower volume and higher hardness. The differences in cake colors were reflected by the characteristics of each flour added. All cakes reached more than 70% of sensorial acceptability, demonstrating the viability of the applications. The use of flours produced with fruit co-products in cakes is therefore an option for a healthy and sustainable diet, especially for individuals with celiac disease.

Keywords. Baking, Fruit Flour, Nutrition, Sustainability.

INTRODUÇÃO

Pesquisas realizadas pela Organização das Nações Unidas (ONU) apontam que aproximadamente 17% dos alimentos destinados ao consumo humano são desperdiçados. Em contrapartida, em vários locais do mundo, incluindo o Brasil, a falta de acesso aos alimentos saudáveis é um problema real enfrentado. Portanto, os incentivos para a alimentação adequada em conjunto com o aproveitamento integral dos alimentos são iniciativas viáveis para a melhoria da qualidade nutricional e redução do desperdício¹⁻³.

A produção de farinhas com partes usualmente não consumidas dos alimentos pode contribuir com a redução da geração de resíduos agroindustriais⁴ e aportar componentes nutricionais às preparações alimentícias^{1,2}. Estudos realizados com coprodutos de frutas mostram que estes possuem alto teor de fibras, carboidratos, minerais e presença de compostos bioativos, tornando-os benéficos à saúde⁵⁻¹⁰.

A aplicação de coprodutos de frutas e hortaliças como cascas, sementes, amêndoas e talos em preparações, em especial, de panificação, como bolos e biscoitos, tem sido estudado por pesquisadores como Panwar et al¹¹ e Santos et al⁸. Esta utilização se torna importante por contribuir para a sustentabilidade global viabilizando a redução do desperdício de alimentos, além dos impactos causados ao meio ambiente^{5,12,13}.

Os coprodutos provenientes das frutas se destacam pelas altas concentrações de fibras⁶⁻¹⁰. Estudos comprovam que as fibras têm sido utilizadas para fornecer propriedades aos alimentos, agregando valor nutricional e por sua ampla possibilidade de utilização tecnológica nas indústrias, em especial na panificação^{1,4,14-17}.

Bolos são populares na alimentação nacional, sendo matrizes alimentares importantes para a difusão do enriquecimento nutricional dos alimentos. Estudos demonstram que, além do exposto, os bolos apresentam estruturas que se comportam bem tecnologicamente com a inclusão de farinhas de cascas e sementes¹⁸⁻²⁰. Em contrapartida, os bolos, geralmente, são produzidos com farinha de trigo, onde está presente o glúten que deve ser evitado por pessoas com doença celíaca ou outros distúrbios relacionados a essa proteína de origem vegetal^{21,22}.

A doença celíaca é um problema de saúde pública devido à alta prevalência e, atualmente, observa-se o aumento de sua incidência, sendo diagnosticada em 1% da população mundial²³⁻²⁵. A patologia é um problema autoimune e ocorre devido à ingestão de glúten, uma proteína presente no trigo, cevada e centeio. Portanto, a melhor alternativa e conduta terapêutica é uma dieta sem glúten ao longo da vida²⁶. Atualmente, o acesso a produtos isentos em glúten é mais fácil, no entanto, geralmente esses produtos apresentam baixo teor de compostos benéficos à saúde, como fibras alimentares²⁷⁻²⁹. Desta forma, o desenvolvimento de preparações sem glúten, mas com valor nutricional agregado, se faz necessário.

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo empregar farinhas elaboradas com coprodutos de frutas em bolos sem glúten e analisar a qualidade sensorial e tecnológica das receitas, além de agregar valor nutricional às preparações e contribuir com a redução do desperdício.

MATERIAL E MÉTODOS

As frutas e ingredientes foram adquiridos em um mercado local de Belo Horizonte (MG). As amostras das farinhas de coprodutos de frutas e dos bolos foram desenvolvidas e analisadas sensorialmente no laboratório de Técnica Dietética da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC Minas). As análises físico-químicas das amostras foram realizadas no Laboratório de Macroscopia da PUC Minas e no Laboratório de Matérias-primas Alimentares do curso de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

Elaboração das farinhas de coprodutos de frutas

O desenvolvimento das farinhas de coprodutos de frutas foi realizado conforme procedimento descrito por Ramos et al³⁰. Foram elaboradas seis farinhas, sendo: farinha da casca de abacaxi Pérola (*Ananas comosus* L.) – FCA; farinha da casca de manga Palmer (*Mangifera indica* L.) – FCM; farinha da casca de banana Prata (*Musa ssp.*) – FCB; farinha da casca de laranja Pêra Rio (*Citrus sinensis* L.) – FCL; farinha da amêndoa de manga Palmer (*Mangifera indica* L.) – FAM e farinha da entrecasca de melancia (*Citrullus lanatus*) – FEM.

As frutas utilizadas para obtenção das farinhas foram lavadas, sanitizadas e descascadas manualmente. Para as cascas, entrecasca e amêndoas, o processo de desidratação foi realizado em estufa com circulação de ar forçado e temperatura de 65 ± 1 °C por 12 horas, já a entrecasca de melancia e a casca do abacaxi passaram pelo processo de secagem por 26 horas. Posteriormente, os coprodutos foram triturados em liquidificador, peneirados, armazenados em potes de polietileno com tampa e mantidos à temperatura de 25 ± 2 °C em local seco até a realização dos experimentos.

Preparação dos bolos

Foram realizados pré-testes para definir o percentual de adição das farinhas. Em seguida foram estabelecidas as formulações dos bolos, sendo um padrão e seis com adição de 14% de cada farinha de coprodutos de fruta produzida (Tabela 1). Cada batelada de bolo padrão foi produzida com 535,6 g de massa e os demais bolos com 562,6 g.

Tabela 1. Formulações das amostras de bolos

Ingredientes	Bolo Padrão (%)	Bolo com as farinhas de coprodutos de frutas (%)
Farinha de aveia	33,6	32,0
Farinha de coproduto de fruta	–	4,8
Ovos	42,0	40,0
Açúcar mascavo	20,4	19,6
Óleo de soja	3,0	2,8
Fermento em pó	1,0	0,8

Os bolos foram preparados pela mistura dos ingredientes, com exceção do fermento e claras. Após a homogeneização, as claras em neve foram incorporadas e, por fim, o fermento. A massa foi disposta em forma untada e assada em forno a 180 °C. Os bolos padrão e com o acréscimo de FAM e FEM foram assados por 20 minutos, os bolos com FCB e FCM por 25 minutos e aqueles que utilizaram FCA e FCL por 30 minutos.

Análises físico-químicas

Os bolos foram caracterizados pela determinação da cor (espectrofotômetro Konica Minolta CM-5) explorando os parâmetros luminosidade (L^*), a^* (atributo de cor vermelho (+) / verde (-)), b^* (atributo de cor amarelo (+) / azul (-)) e Delta E (Equação 1) segundo Pathare et al³¹. O volume específico das amostras foi determinado através do deslocamento de painço conforme o método nº 10-05.01 da American Association of Cereal Chemists (AACC)³² e os resultados expressos em g mL^{-1} .

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (1)$$

Onde: ΔE = magnitude da diferença total da cor; ΔL^* = diferença entre mais claro e mais escuro; Δa^* = diferença entre vermelho e verde; e Δb^* = diferença entre amarelo e azul.

A textura instrumental dos bolos, avaliando-se a dureza, foi realizada em texturômetro TA.XT Plus (Stable Micro Systems, Haslemere, Inglaterra), utilizando probe P/36 e plataforma HDP/90, conforme método nº 74-09.01 da AACC³². Os parâmetros utilizados foram: velocidade de pré-teste, teste e pós-teste de 1,00, 1,00 e 10,0 mm/s, limiar de detecção de 0,049 N, no modo força de compressão, comprimindo 40% da parte central de uma amostra composta por 2 fatias de 12 mm de espessura cada, e os resultados expressos em N.

As determinações de umidade, lipídios e fibras da farinha de abacaxi foram realizadas segundo metodologias propostas pela Association of Official Analytical Chemistry (AOAC)³³, em triplicatas. A umidade foi determinada pelo método de secagem em estufa a 105 °C até peso constante. Os lipídios foram determinados por extração a quente com solvente utilizando aparelho tipo Soxhlet. A fibra alimentar solúvel e insolúvel pelo método enzimático-gravimétrico (991.43) e a fibra alimentar total pelo somatório de suas frações. Os resultados da composição centesimal das demais farinhas foram apresentados em estudos anteriores^{6,7}.

Análise sensorial

Análise sensorial de aceitação dos atributos aparência e sabor foi realizada pelo uso de escala hedônica estruturada de nove pontos, entre 9 (gostei extremamente) e 1 (desgostei extremamente). O teste foi realizado com 100 provadores não treinados, com idades entre 18 e 60 anos, de ambos os sexos e consumidores de bolos³⁴. As amostras foram avaliadas em cabines individuais, em pratos brancos descartáveis codificados, contendo 25 gramas de cada amostra apresentada, em temperatura ambiente e em ordem aleatória e balanceada. O Índice de Aceitabilidade (IA) dos produtos para cada atributo foi calculado considerando a Equação 2.

$$IA (\%) = Ax100/B \quad (2)$$

Onde: A = nota média obtida para o produto, e B = nota máxima dada ao produto.

Notas iguais ou superiores a 70% para o IA foram consideradas como preparações bem aceitas pelos julgadores³⁵. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUC Minas sob o parecer de número 36556214.4.0000.5137.

Análises estatísticas

Os resultados das análises físico-químicas e dos testes sensoriais foram submetidos à análise de variância (ANOVA) ($p < 0,05$) com teste de média Scott-Knott ($p < 0,05$) quando pertinente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Características físico-químicas dos bolos

Os resultados de umidade, lipídios e teor de fibras alimentares das farinhas, volume e dureza dos bolos estão apresentados na **Tabela 2** e na **Figura 1**, respectivamente.

Tabela 2. Teor de umidade, lipídios e fibras alimentares das farinhas de coprodutos de frutas

Farinhas	Umidade	Lipídios	FA total	FA Insolúvel	FA Solúvel
FCA	11,12 ± 0,55 ^b	2,14 + 0,25 ^c	37,70 ± 0,75 ^d	32,61 ± 1,16 ^b	5,09 ± 0,33 ^d
FCM*	10,25 ± 0,11 ^b	6,88 + 0,55 ^b	36,67 ± 0,44 ^d	17,25 ± 0,28 ^d	19,42 ± 0,60 ^a
FCB**	8,15 ± 0,08 ^c	7,73 ± 0,89 ^a	54,84 ± 0,49 ^a	50,68 ± 0,83 ^a	4,16 ± 0,17 ^d
FCL**	11,85 ± 0,46 ^a	2,71 ± 0,06 ^d	42,27 ± 0,28 ^c	35,31 ± 0,38 ^b	6,95 ± 0,18 ^c
FAM*	7,97 ± 0,18 ^c	6,34 + 0,34 ^c	37,44 ± 0,73 ^d	25,83 ± 0,88 ^c	11,61 ± 0,58 ^b
FEM**	11,83 ± 0,08 ^a	2,71 ± 0,06 ^d	47,26 ± 0,30 ^b	28,15 ± 0,30 ^c	19,11 ± 0,03 ^a

FCA – Farinha da Casca de Abacaxi; FCM – Farinha da Casca de Manga; FCB – Farinha da Casca de Banana; FCL – Farinha da Casca de Laranja; FEM – Farinha da Entrecasca de Melancia; FAM – Farinha da Amêndoa de Manga; FA – Fibra Alimentar. Os dados são apresentados por média ± desvio padrão. Médias indicadas por letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente pela análise de variância, ANOVA *one way* e *post hoc* teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro

*Ramos et al⁷

**Ramos et al⁶

O bolo com farinha da casca de banana (BFCB) foi o que apresentou o melhor resultado tecnológico, com maior volume e menor dureza quando comparado ao padrão (**Figuras 1A e 1B**). A FCB é a que possui menor teor umidade e maior de fibras totais, sendo composta principalmente por fibras insolúveis (**Tabela 2**), fração esta que não interfere na absorção de água. Além disso, essa farinha possui maior teor de lipídios (7,73 g.100 g⁻¹) que as demais (**Tabela 2**) e sabe-se que o teor de gordura presente nos bolos é capaz de alterar o volume específico e a dureza de forma inversa ao acréscimo de fibras, quanto maior a quantidade de lipídios maior o volume e menor a dureza³⁶.

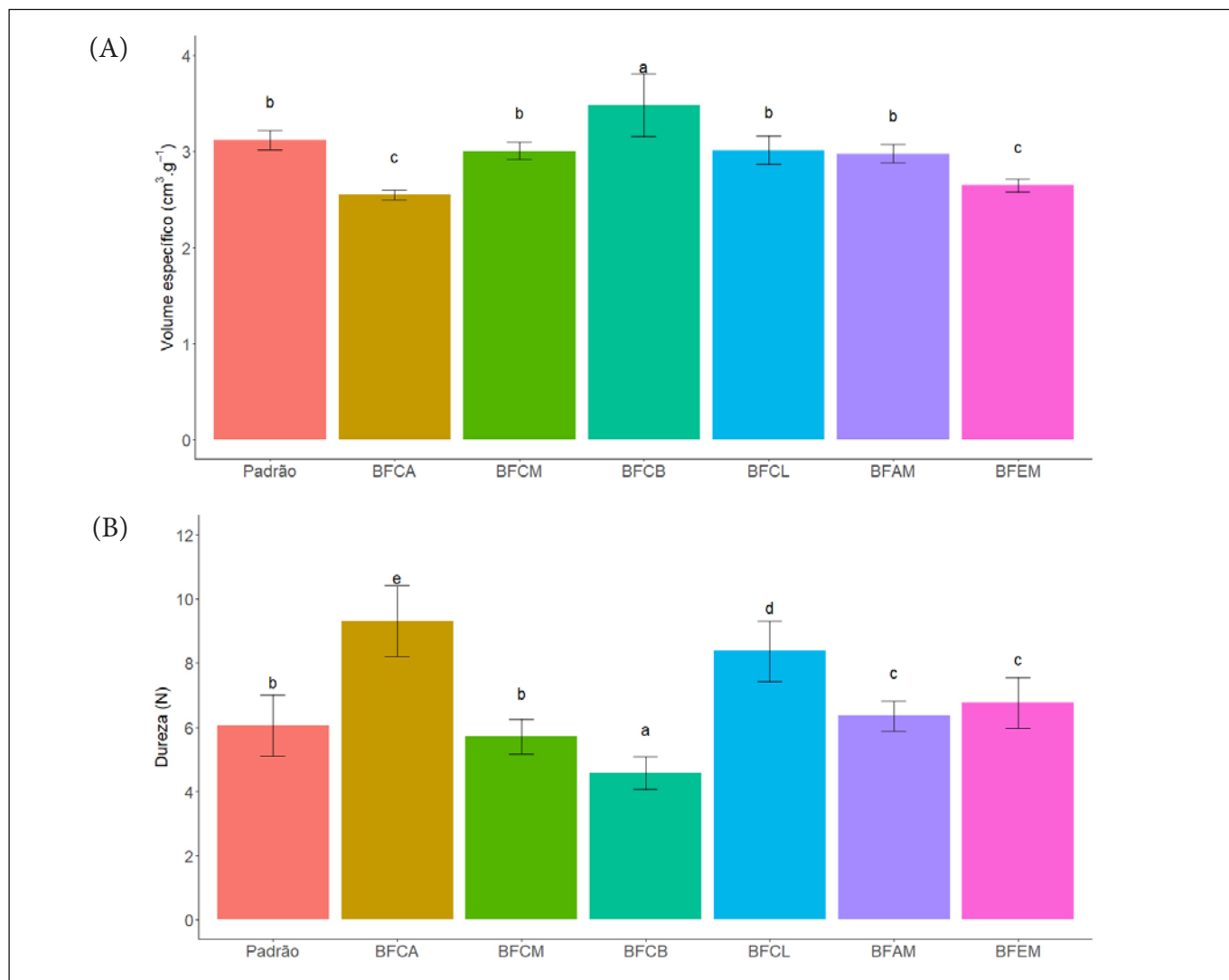


Figura 1. Volume específico (A) e dureza (B) dos bolos padrão e produzidos com as farinhas de coprodutos de frutas. BFCA – Bolo com Farinha da Casca de Abacaxi; BFCM – Bolo com Farinha da Casca de Manga; BFCB – Bolo com Farinha da Casca de Banana; BFCL – Bolo com Farinha da Casca de Laranja; BFEM – Bolo com Farinha da Entrecasca de Melancia; BFAM – Bolo com Farinha da Amêndoa de Manga. Os dados são apresentados por média \pm desvio padrão. Médias nas barras seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro

O bolo com farinha da casca de manga (BFCM) foi o único que apresentou o mesmo comportamento da amostra padrão em relação ao volume e a dureza simultaneamente (**Figuras 1A e 1B**), demonstrando que a aplicação desta farinha não interferiu tecnologicamente no desenvolvimento do bolo. Apesar da FCM apresentar os menores teores de fibra alimentar total ($36,88 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$) e insolúvel ($17,06 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$) é a farinha que apresentou o maior teor de fibra solúvel ($19,82 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$), como disposto na **Tabela 2**. Porém, de forma semelhante à FCB, a FCM possui mais lipídios ($6,88 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$) que as outras quatro farinhas, o que pode ter interferido positivamente no volume e na dureza do bolo.

O bolo com farinha da casca de abacaxi (BFCA) foi o que apresentou menor volume e maior dureza entre todos os bolos (**Figuras 1A e 1B**), apesar de o teor de umidade e fibra alimentar total da FCA ser semelhante à FCM (**Tabela 2**), demonstrando que a fração da fibra também interfere no resultado, pois

a FCA apresenta mais fibra insolúvel e menos solúvel. Além disso, a FCA apresenta baixo teor de lipídios ($2,14 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$) que interfere diretamente no volume e na dureza da massa. Erkel et al³⁷ produziram biscoitos substituindo farinha de trigo por 8%, 16% e 24% de FCA e observaram que maiores porcentagens de FCA (16% e 24%) promoveram maior dureza às formulações devido ao maior teor de fibras.

O bolo com farinha da entrecasca de melancia (BFEM) também apresentou menor volume e maior dureza comparado ao padrão (**Figuras 1A e 1B**). A FEM possui mais umidade e fibra solúvel que a maioria das outras farinhas (**Tabela 2**), demonstrando que a fibra solúvel ao absorver água interfere no resultado tecnológico do bolo. Além disso, essa farinha tem pouco lipídios ($2,71 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$), nutriente que tem ação positiva no volume e na dureza. Outros autores também observaram que o aumento da quantidade de FEM no preparo de biscoitos proporcionou maior dureza, devido ao alto teor de fibras, o que propicia maior grau de adesão dos ingredientes³⁸.

O bolo com farinha da casca de laranja (BFCL) apresentou volume semelhante ao padrão, mas maior dureza (**Figuras 1A e 1B**). A FCL é a que possui maior umidade, teor semelhante à FEM (**Tabela 2**), devido às cascas *in natura* destas frutas possuírem mais umidade. O teor de fibra alimentar total e insolúvel da FCL é razoável, mas de solúvel é baixo ($6,95 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$) comparado às FCM, FEM e FAM, no entanto, o teor de lipídios também é baixo ($2,71 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$), como disposto na **Tabela 2**. Esses resultados demonstram que a interação entre os nutrientes interfere diretamente nos resultados tecnológicos.

O bolo com farinha da amêndoa de manga (BFAM) apresentou volume semelhante ao padrão, mas menor dureza (**Figuras 1A e 1B**). A FAM possui baixa umidade, mas teor razoável de fibra alimentar solúvel ($11,61 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$) e lipídios ($6,34 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$), demonstrando que o teor de lipídio e a baixa umidade tiveram efeito positivo na maciez do bolo.

Como observado, os bolos sofreram alteração de volume e/ou dureza provavelmente devido à associação do teor de umidade, lipídios e fibras, bem como a proporção de suas frações, solúveis e insolúveis^{36,39,40}. A incorporação de fibras alimentares na formulação de bolos relaciona-se a alterações das características físico-químicas, visto que esses compostos têm a capacidade de absorção/retenção de água. Portanto, com a diminuição da disponibilidade de água, devido ao acréscimo de fibras, há diminuição do volume específico e aumento da dureza³⁹.

Ainda, estudos mostram que ao acrescentar maiores quantidades de fibras insolúveis do que solúveis em preparações, há menor propriedade de hidratação e menor volume específico^{19,41}. Por outro lado, ao preparar pães com adição de fibras solúveis, ocorreu também diminuição do volume específico devido ao menor teor de glúten e o acréscimo de fibras⁴². Desse modo, ambas as frações podem influenciar nas características dos bolos.

Namir et al²⁹ observaram que ao preparar *donuts* sem glúten com farinha de casca e semente de melão com alto teor de fibras, ocorreu a diminuição do volume específico e aumento da dureza ao aumentar a adição da farinha de coproduto, corroborando para os achados do presente estudo.

A dureza é um aspecto indesejável em bolos, assim como o volume específico é umas das características mais importantes para se analisar fisicamente os produtos de panificação^{43,44}, visto que quanto maior o volume e menor a dureza obtidos nas amostras, pode se considerar que a preparação obteve maior desenvolvimento e potencial de maciez.

Além disso, a gordura pode agir como emulsificante, contribuindo para emulsão e espumas estáveis em uma massa⁴⁰. Estudos demonstram que os emulsificantes possuem a propriedade de fornecer aeração estável para preparações na indústria de panificação. Assim como, também contribuem para maior resistência e elasticidade, melhorando a textura, aparência, sabor e aceitabilidade de um produto⁴⁵. Com

isso, observa-se que a quantidade de gordura presente em uma preparação influencia nas características apresentadas; portanto, o teor lipídico das farinhas de coproduto de frutas interfere no produto final obtido.

Na **Figura 2** estão representados os resultados dos parâmetros de cor e aspecto dos bolos e farinhas estudadas.

O BFCB apresentou o menor valor de luminosidade (“L”), enquanto os BFEM e BFAM apresentaram os maiores valores. Este resultado é semelhante ao observado nas farinhas produzidas que foram previamente analisadas quanto a estes parâmetros³⁰, tendo a FAM a maior luminosidade, seguida pela FEM, enquanto a FCB apresentou o menor valor devido a sua cor marrom escura, o que resulta na atenuação do brilho (**Figura 2**).

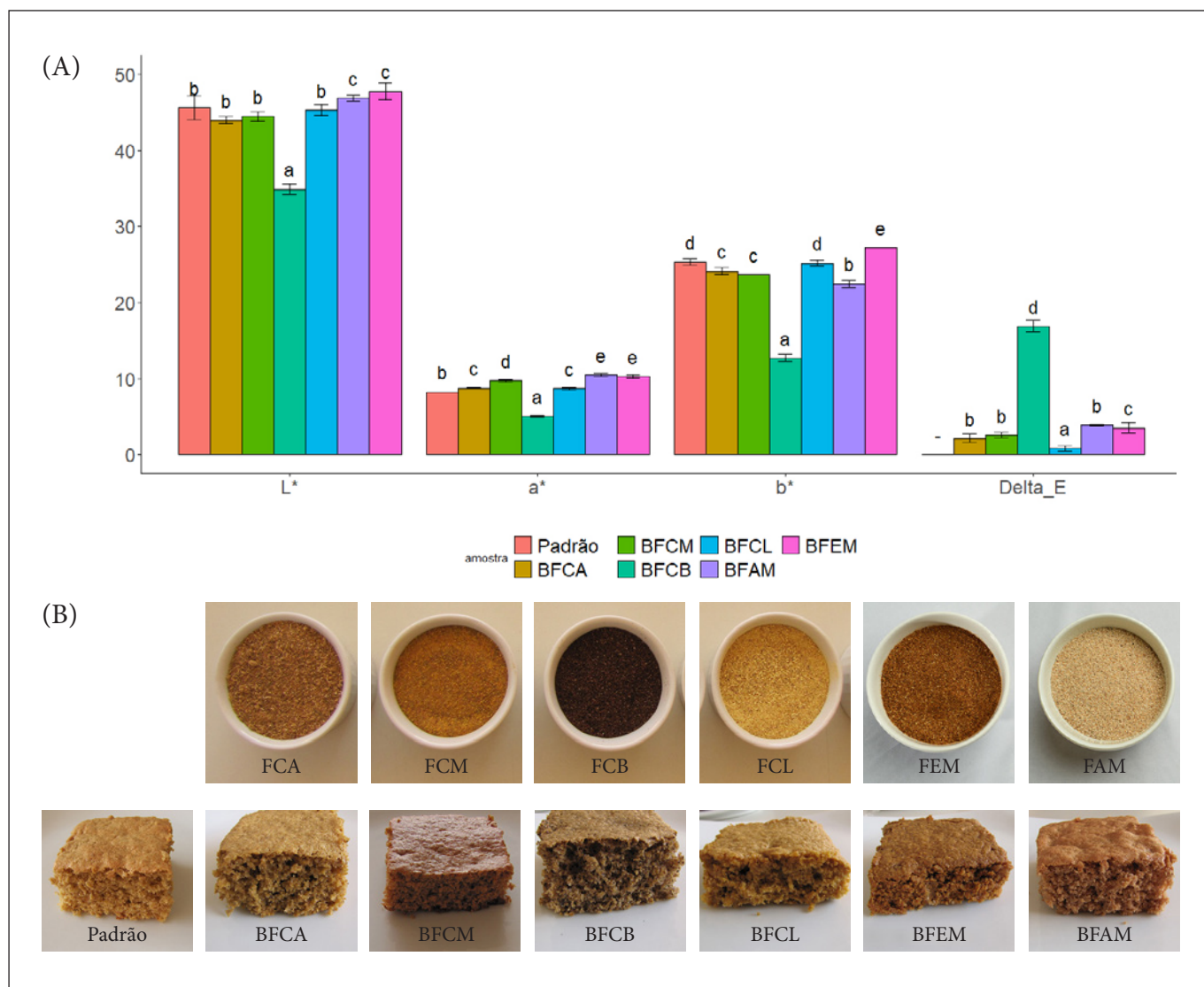


Figura 2. Características de cor dos bolos produzidos com as farinhas de coprodutos de frutas (A) e imagens das farinhas produzidas com coprodutos de frutas e respectivos bolos (B). Farinhas: FCA – Farinha da Casca de Abacaxi; FCM – Farinha da Casca de Manga; FCB – Farinha da Casca de Banana; FCL – Farinha da Casca de Laranja; FAM – Farinha da Amêndoa de Manga; FEM – Farinha da Entrecasca de Melancia. Bolos: BFCA – Bolo com Farinha da Casca de Abacaxi; BFCM – Bolo com Farinha da Casca de Manga; BFCB – Bolo com Farinha da Casca de Banana; BFCL – Bolo com Farinha da Casca de Laranja; BFEM – Bolo com Farinha da Entrecasca de Melancia; BFAM – Bolo com Farinha da Amêndoa de Manga. Os dados são apresentados por média ± desvio padrão. Médias nas barras seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro

A adição de 14% das farinhas de coprodutos de frutas interferiu na cor dos bolos produzidos. Todos os valores de a^* e b^* dos bolos foram positivos, prevalecendo o tom amarelo avermelhado nas preparações. O BFEM apresentou os maiores valores de a^* e b^* , sendo o bolo mais avermelhado (**Figura 2B**). O BFCB foi o que apresentou os menores valores de a^* e b^* confirmando a cor mais escura desse bolo devido à cor da farinha de banana (**Figura 2B**).

A alteração da coloração dos bolos pode estar relacionada a fatores como cor de cada farinha devido aos pigmentos e teores de polifenóis presentes em cada tipo de fruta, escurecimento que ocorre durante o processo de secagem dos coprodutos de frutas, temperatura, pH, atividade de água e a relação entre aminoácidos e carboidratos simples que podem acarretar reações de escurecimento não enzimático. Essas reações agregam cor, sabor e aroma em preparações assadas favorecendo as características sensoriais esperadas em produtos de panificação^{15,46-48}.

O BFCB foi o que apresentou o maior valor de Delta E (16,89), **Figura 2A**, confirmando a maior diferença de cor em relação ao bolo padrão, pois esse bolo foi o mais escuro devido a cor da FCB (**Figura 2B**). Esse resultado indica que o consumidor consegue visualizar a cor do BFCB totalmente distinta quando comparada ao padrão⁴⁹. A cor do BFEM também foi diferente do padrão, mas com menor valor de Delta E (3,54). O BFCL foi o que apresentou o menor Delta E (0,87), ou seja, foi o que mais se aproximou à cor do bolo padrão. Mesmo com diferença estatística significativa, as demais receitas se apresentaram muito semelhantes em relação à cor da formulação padrão como colocado na **Figura 2A**.

Características sensoriais dos bolos

Os resultados da análise sensorial de aceitação dos atributos de aparência e sabor dos bolos estudados, além do índice de aceitabilidade, estão representados na **Figura 3**. As médias das preparações avaliadas sensorialmente ficaram situadas entre os termos hedônicos “gostei muito” (8) e “gostei ligeiramente” (6). Apesar da diferença significativa de alguns bolos, os resultados encontrados demonstram que a maioria dos bolos foi aceita, visto que segundo Dutcosky³⁵ para que um produto seja aceito sensorialmente esse deve possuir média maior ou igual a 7,0.

Os bolos produzidos com as FCA, FCM, FCB e FCL apresentaram diferença significativa em relação ao atributo sabor (**Figura 3**). O bolo com a FCA apresentou odor leve e adocicado, sabor mais doce que o bolo padrão; o bolo com FCM apresentou sabor frutado e levemente cítrico, no entanto estes dois bolos apresentaram sabor residual de fibra. O bolo produzido com a FCB apresentou sabor mais doce que todos os outros bolos e sabor residual adstringente e fibroso. O bolo elaborado com a FCL apresentou sabor residual amargo. Estas características podem explicar a diferença observada na aceitação do sabor destes quatro bolos.

Todos os seis bolos tiveram resultados estatisticamente semelhantes ao padrão para o atributo aparência, embora tenham sido observadas diferenças de volume e cor nas análises físico-químicas.

Todos os bolos apresentaram índice de aceitabilidade superior a 70%, reforçando a boa aceitabilidade (**Figura 3**). O bolo elaborado com FAM apresentou índice de aceitabilidade maior que o bolo padrão, este bolo apresentou coloração avermelhada, odor e sabor suave de amêndoas.

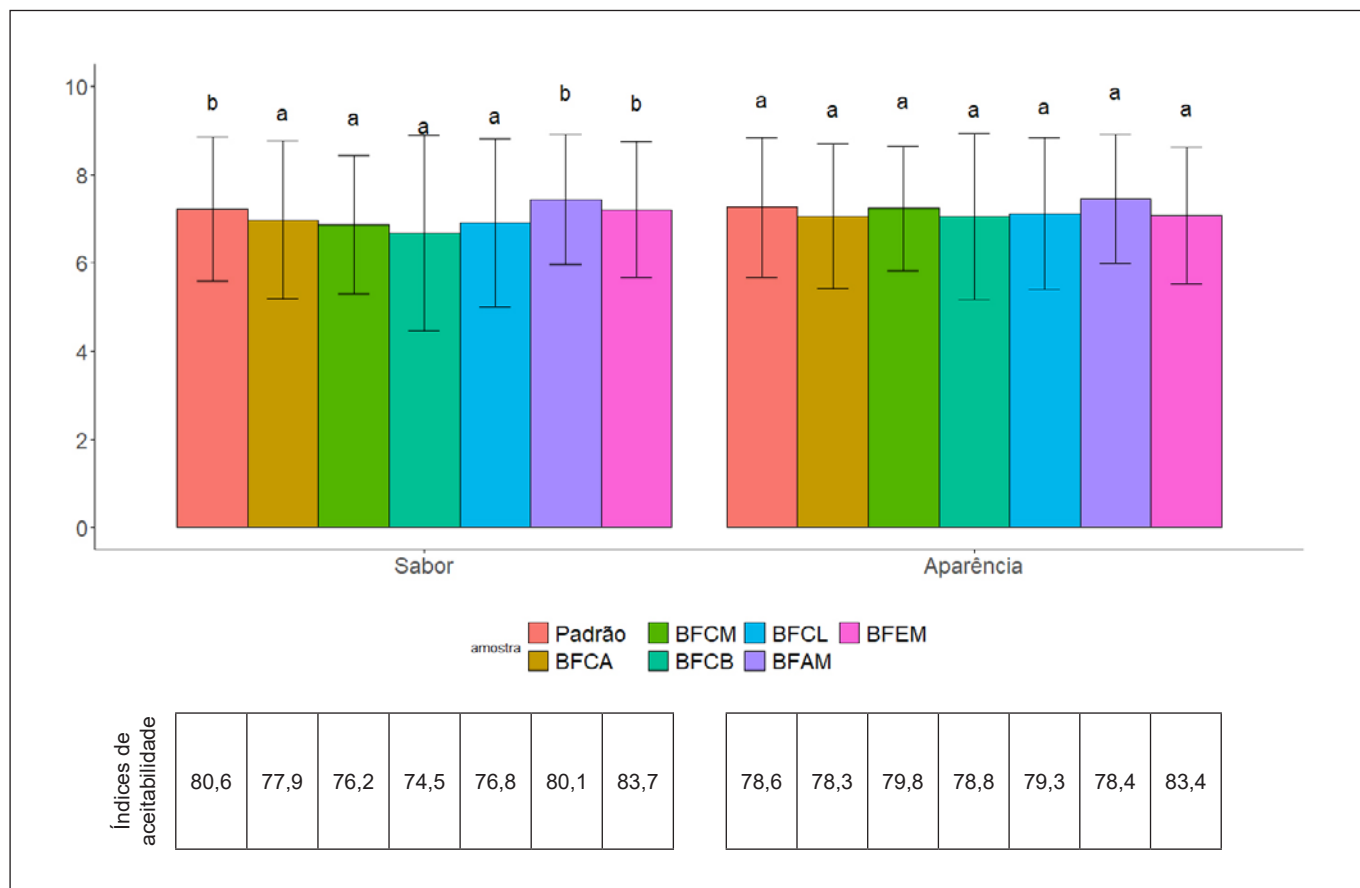


Figura 3. Resultados da análise sensorial de aceitação por escala hedônica realizada com os bolos produzidos com as farinhas de coprodutos de frutas. BFCA – Bolo com Farinha da Casca de Abacaxi; BFCM – Bolo com Farinha da Casca de Manga; BFCB – Bolo com Farinha da Casca de Banana; BFCL – Bolo com Farinha da Casca de Laranja; BFEM – Bolo com Farinha da Entrecasca de Melancia; BFAM – Bolo com Farinha da Amêndoa de Manga. Os dados são apresentados por média \pm desvio padrão. Médias nas barras seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. Indicação dos índices de aceitabilidade relacionados ao sabor e à aparência

Diante dos resultados expostos, observa-se que a adição de 14% de farinhas produzidas com coprodutos de frutas na formulação de bolos obteve bons resultados tecnológicos, com produtos com boa aceitabilidade em relação ao sabor e à aparência.

Em estudo com a aplicação de farinha de buriti em bolo de chocolate, a aceitação dos atributos sabor e aparência variaram de acordo com a porcentagem adicionada de farinha (10%, 20% e 30%)¹⁹. O bolo com farinha de buriti (10%) apresentou para a aparência e sabor 82% e 76% de aceitação, respectivamente; sendo valores similares aos encontrados nos bolos estudados. Por outro lado, quando se utilizou 30%, a aceitação para aparência foi de 79% e para sabor de 68%¹⁹. Desse modo, observa-se que com o aumento da quantidade de farinha utilizada, reduz-se os valores de aceitação^{19,43,50}. Esses dados reforçam a importância de pré-testes para a padronização das receitas que possam ter melhor aceitação pelos consumidores e melhor qualidade tecnológica.

Ainda que a adição de menores percentuais de farinha de coproduto nas receitas tenha maior aceitação, agrega-se valor nutricional às preparações, tornando-as uma boa alternativa, em especial, para indivíduos celíacos.

A utilização dos coprodutos de frutas impacta positivamente no meio ambiente, sendo uma ação sustentável, pois o descarte de coprodutos pelas indústrias gera poluição da água e da vegetação. Portanto, ao se utilizar as partes desprezadas, ameniza-se os impactos ambientais negativos, contribuindo também para a redução de custos com a destinação dos resíduos industriais. Ademais, os coprodutos também agregam nutrientes nas preparações e à dieta, fornecendo vitaminas, sais minerais, compostos bioativos, antioxidantes, e em especial, fibras.

CONCLUSÃO

A utilização de coprodutos de frutas é uma boa opção para uma alimentação saudável e sustentável. O presente estudo demonstrou que a utilização de farinhas isentas de glúten elaboradas com as partes convencionalmente descartadas de frutas é viável na produção de bolos sem glúten, contribuindo nos âmbitos nutricional, econômico e sustentável.

De acordo com os achados, as preparações elaboradas com coproduto de frutas têm grande potencial, uma vez que alcançaram boa aceitação sensorial e têm o teor de fibras aumentado, com características de volume e dureza variáveis de acordo com o tipo de fruta. Portanto, torna-se uma alternativa para indivíduos com doença celíaca, sendo também um bolo com valor agregado, adicionando nutrientes à dieta. Dessa maneira, tornam-se necessários mais estudos e incentivos nessa área que corroborem para a utilização integral das frutas e no desenvolvimento de novos produtos com valor nutricional agregado.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não existir conflitos de interesse.

FINANCIAMENTO

À FAPEMIG concedeu bolsa de iniciação científica para a aluna de graduação Rafaela das Dores Pereira.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem à FAPEMIG pela bolsa de iniciação científica de Rafaela das Dores Pereira, à Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, ao Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri e à funcionária Krisna Túlia de Lima pelo apoio no desenvolvimento das pesquisas.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Sabrina Alves Ramos: concepção, delineamento do estudo, análise e interpretação dos dados, redação do manuscrito. Daniela Gomes Moura e Bárbara Eduarda de Laia Queiroz: redação do manuscrito. Rafaela das Dores Pereira: concepção e coleta de dados. Michely Capobiango: análise centesimal das farinhas. Marcio Schmiele: análises físico-químicas. Tatiana Nunes Amaral: análises físico-químicas, interpretação dos dados e redação do manuscrito.

NOTA DE APRESENTAÇÃO

Não declarado pelos autores.

REFERÊNCIAS

1. Laganà V, Giuffrè AM, Bruno A, Poiana M. Formulation of biscuits fortified with a flour obtained from bergamot by-products (*Citrus bergamia*, Risso). Foods. 2022;11(8):1137. <https://doi.org/10.3390/foods11081137>
2. Larrosa APQ, Otero DM. Flour made from fruit by-products: characteristics, processing conditions, and applications. J Food Process Preserv. 2021;45(1):e15398. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15398>
3. Organização das Nações Unidas – ONU. ONU: 17% de todos os alimentos disponíveis para consumo são desperdiçados. 2021. [acesso 2023 Jun 20]. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/114718-onu-17-de-todos-os-alimentos-disponiveis-para-consumo-sao-desperdicados>
4. Brito TBN, Pereira APA, Pastore GM, Moreira RFA, Ferreira MSL, Fai AEC. Chemical composition and physicochemical characterization for cabbage and pineapple by-products flour valorization. Lwt. 2020;124:109028. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109028>
5. Kowalska H, Czajkowska K, Cichowska J, Lenart A. What's new in biopotential of fruit and vegetable by-products applied in the food processing industry. Trends Food Sci Technol. 2017;67(1):150-9. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.016>
6. Ramos SA, Lacerda IR, Silva MR, Capobianco M. Physical and chemical characterization and antioxidant activity of flours developed with fruit by-products and sensory analysis of elaborated products. J Culin Sci Technol. 2023;1-15. <https://doi.org/10.1080/15428052.2023.2272637>
7. Ramos SA, Silva MR, Jacobino AR, Damasceno IAN, Rodrigues SM, Carlos GA et al. Caracterização físico-química, microbiológica e da atividade antioxidante de farinhas de casca e amêndoa de manga (*Mangifera indica*) e sua aplicação em brownie. Res Soc Dev. 2021;10(2):e22310212436. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i2.12436>
8. Santos D, Silva JAL, Pintado M. Fruit and vegetable by-products' flours as ingredients: A review on production process, health benefits and technological functionalities. LWT. 2022;154:112707. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112707>
9. Schneider VS, Bark JM, Winnischofer SMB, Santos EF, Iacomini M, Cordeiro LMC. Dietary fibres from guavira pomace, a co-product from fruit pulp industry: Characterization and cellular antioxidant activity. Food Res Int. 2020;132. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109065>

10. Tozzi F, Núñez-Gómez D, Legua P, Del Bubba M, Giordani E, Melgarejo P. Qualitative and varietal characterization of pomegranate peel: High-value co-product or waste of production? Sci Hortic. 2022;291:110601.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110601>
11. Panwar D, Panesar PS, Chopra HK. Recent trends on the valorization strategies for the management of citrus by-products. Food Rev Int. 2021;37(1):91-120.
<https://doi.org/10.1080/87559129.2019.1695834>
12. Jungowska J, Kulczyński B, Sidor A, Gramza-Michałowska A. Assessment of factors affecting the amount of food waste in households run by polish women aware of well-being. Sustainability. 2021;13(2):976.
<https://doi.org/10.3390/su13020976>
13. Muntean MV, Fărcaș AC, Medeleanu M, Salanță LC, Borșa A. A sustainable approach for the development of innovative products from fruit and vegetable by-products. Sustainability. 2022;14(17):10862.
<https://doi.org/10.3390/su141710862>
14. Cunha JA, Rolim PM, KSFC, Sousa Júnior FC, Nabas RC, Seabra LMAJ. From seed to flour: Sowing sustainability in the use of cantaloupe melon residue (*Cucumis melo* L. var. *Reticulatus*). PLoS One. 2020;15(1):e0219229.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219229>
15. Toledo NMV, Nunes LP, Silva PPM, Spoto MHF, Canniatti-Brazaca SG. Influence of pineapple, apple and melon by-products on cookies: Physicochemical and sensory aspects. Int J Food Sci Technol. 2017;52(5):1185-92.
<https://doi.org/10.1111/ijfs.13383>
16. Santos CM, Rocha DA, Madeira RAV, Queiroz ER, Mendonça MM, Pereira J et al. Preparation, characterization and sensory analysis of whole bread enriched with papaya byproducts flour. J Food Technol. 2018;21:e20171209.
<https://doi.org/10.1590/1981-6723.12017>
17. Soquetta MB, Stefanello FS, Huerta KM, Monteiro FS, Rosa CS, Terra NN. Characterization of physiochemical and microbiological properties, and bioactive compounds, of flour made from the skin and bagasse of kiwi fruit (*Actinidia deliciosa*). Food Chem. 2016;199:471-8.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.022>
18. Ağırbaş HET, Yavuz-Düzgün M, Özçelik B. The effect of fruit seed flours on Farinograph characteristics of composite dough and shelf life of cake products. J Food Measure. 2021;15(5):3973-84.
<https://doi.org/10.1007/s11694-021-00961-3>

19. Braga-Souto RN, Teixeira MG, Borges LA, Oliveira MLP, Soares JF, Paiva CL et al. Improvement of sensorial and technological characteristics of chocolate cakes with buriti fruit by-product. *J Food Process Preserv.* 2022;46:e16557.
<https://doi.org/10.1111/jfpp.16557>
20. Quiles A, Llorca E, Schmidt C, Reißner AM, Struck S, Rohm H et al. Use of berry pomace to replace flour, fat or sugar in cakes. *Int J Food Sci Technol.* 2018;53(6):1579-87.
<https://doi.org/10.1111/ijfs.13765>
21. Karp S, Wyrwisz J, Kurek MA. The impact of different levels of oat β -glucan and water on gluten-free cake rheology and physicochemical characterisation. *J Food Sci Technol.* 2020;57(10):3628-38.
<https://doi.org/10.1007/s13197-020-04395-5>
22. Wyrwisz J, Karp S, Kurek MA, Moczowska-Wyrwisz M. Evaluation of modified atmosphere packaging in combination with active packaging to increase shelf life of high-in beta-glucan gluten free cake. *Foods.* 2022;11:872.
<https://doi.org/10.3390/foods11060872>
23. Campos CGP, Mendoza ADS, Rinaldi ECA, Skupien SV. Doença celíaca e o conhecimento dos profissionais de saúde da atenção primária. *Rev Saúde Públ.* 2018;1(2):54-62.
<https://doi.org/10.32811/25954482-2018v1n2p54>
24. Lebowhl B, Rubio-Tapia A. Epidemiology, presentation, and diagnosis of celiac disease. *Gastroenterology.* 2021;160(1):63-75.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.06.098>
25. Ludvigsson JF, Murray JA. Epidemiology of celiac disease. *Gastroenterol Clin N Am.* 2019;48(1):1-18.
<https://doi.org/10.1016/j.gtc.2018.09.004>
26. George JBE, Aideyan B, Yates K, Voorhees KN, O'Flynn J, Sweet K et al. Gluten-induced neurocognitive impairment: Results of a nationwide study. *J Clin Gastroenterol.* 2022;56(7):584-91.
<https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000001561>
27. Mir SA, Bosco SJD, Shah MA. Technological and nutritional properties of gluten-free snacks based on brown rice and chestnut flour. *J Saudi Soc Agric Sci.* 2019;18(1):89-94.
<https://doi.org/10.1016/j.jssas.2017.02.002>
28. Borges A, Fonseca C, Carreira F, Rodrigues I, Henriques M, Veloso ACA et al. Valorisation of frozen chestnut by-products: technological challenges for the production of gluten-free flour. *J Food Meas Charact.* 2019;13(1):864-73.
<https://doi.org/10.1007/s11694-018-9999-6>









29. Namir M, Rabie MA, Rabie NA. Physicochemical, pasting, and sensory characteristics of antioxidant dietary fiber gluten-free donut made from cantaloupe by-products. Food Measure. 2021;15(6):5445-59. <https://doi.org/10.1007/s11694-021-01106-2>
30. Ramos SA, Pereira RD, Andressa I, Schmiele M, Amaral TN. Desenvolvimento de *cookies* com coprodutos de frutas. Res Soc Dev. 2020;9(10):e5799108918. <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i10.8918>
31. Pathare PB, Opara UL, Al-Said FAJ. Colour measurement and analysis in fresh and processed foods: A review, food bioproc tech. 2013;6(1):36-60. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0867-9>
32. American Association of Cereal Chemists – AACC. Cereals & Grains Association. AACC Approved Methods of Analysis. Method 10-05.01 Guidelines for measurement of volume by rapeseed displacement. 11th ed. St. Paul (MN): The Association; 2010. [acesso 2023 Jan 10]. Disponível em: <https://www.cerealsgrains.org/resources/Methods/Pages/10BakingQuality.aspx>
33. AOAC International. Official Methods of Analysis. Methods AOAC 925.45b (Loss on drying (moisture) in sugars), AOAC 920.39 (Fat (crude) or ether extract in animal feed), AOAC 991.43 (Total, soluble, and insoluble dietary fibre). 21 ed. USA: AOAC INTERNATIONAL; 2018.
34. Civille GV, Carr BT. Sensory evaluation techniques. 5th ed. 630 p. CRC Press. Flórida: Boca Raton; 2015. <https://doi.org/10.1201/b19493>
35. Dutcosky SD. Análise Sensorial de Alimentos. 3 ed. Curitiba: Champagnat; 2011.
36. Azmoon E, Saberi F, Kouhsari F, Akbari M, Kieliszek M, Vakilinezam A. The effects of hydrocolloids-protein mixture as a fat replacer on physicochemical characteristics of sugar-free muffin cake: Modeling and optimization. Foods. 2021;10:1549. <https://doi.org/10.3390/foods10071549>
37. Erkel A, Ávila CA, Romeiro MM, Santos EF, Sarmiento UC, Novello D. Utilização da farinha da casca de abacaxi em cookies: Caracterização físico-química e aceitabilidade sensorial entre crianças. Rev Uniabeu. 2015;8(19):272-88.
38. Lima JP, Portela JVF, Marques LR, Alcântara MA, El-Aouar ÂA. Farinha de entrecasca de melancia em biscoitos sem glúten. Cienc Rural. 2015;45(9):1688-94. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20130209>

39. Aydogdu A, Sumnu G, Sahin S. Effects of addition of different fibers on rheological characteristics of cake batter and quality of cakes. *J Food Sci Technol*. 2018;55(2):667-77.
<https://doi.org/10.1007/s13197-017-2976-y>
40. Diez-Sánchez E, Llorca E, Quiles A, Hernando I. Using different fibers to replace fat in sponge cakes: In vitro starch digestion and physico-structural studies. *Food Sci Technol Int*. 2018;24(6):533-43.
<https://doi.org/10.1177/1082013218771412>
41. Nawrocka A, Krekora M, Niewiadomski Z, Szymańska-Chargot M, Krawęcka A, Sobota A et al. Effect of moisturizing pre-treatment of dietary fibre preparations on formation of gluten network during model dough mixing – A study with application of FT-IR and FT-Raman spectroscopy. *LWT – Food Sci Technol*. 2020;121:108959.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108959>
42. Huang YL, Ma YS. Optimization of the extrusion process for preparation of soluble dietary fiber-enriched calamondin pomace and its influence on the properties of bread. *J Food Sci Technol*. 2019;56(12):5444-53.
<https://doi.org/10.1007/s13197-019-04015-x>
43. Tuna Ağırbaş HE, Yavuz-Düzgün M, Özçelik B. Valorization of fruit seed flours: rheological characteristics of composite dough and cake quality. *Food Measure*. 2022;16(4):3117-29.
<https://doi.org/10.1007/s11694-022-01423-0>
44. Das PC, Khan MJ, Rahman MS, Majumder S, Islam MN. Comparison of the physico-chemical and functional properties of mango kernel flour with wheat flour and development of mango kernel flour based composite cakes. *NFS J*. 2019;17:1-7.
<https://doi.org/10.1016/j.nfs.2019.10.001>
45. Feng W, Zhang H, Wang R, Zhou X, Wang T. Modifying the internal structures of steamed rice cakes by emulsifiers for promoted textural and sensory properties. *Food Chem*. 2021;354:129469.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129469>
46. Nooshkam M, Varidi M, Bashash M. The Maillard reaction products as food-born antioxidant and antibrowning agents in model and real food systems. *Food Chem*. 2019;275:644-60.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.083>
47. Kutzli I, Weiss J, Gibis M. Glycation of plant proteins via Maillard reaction: Reaction chemistry, technofunctional properties, and potential food application. *Foods*. 2021;10:376.
<https://doi.org/10.3390/foods10020376>

48. Somjai C, Siriwoharn T, Kulprachakarn K, Chaipoot S, Phongphisutthinant R, Wiriyaicharee P. Utilization of Maillard reaction in moist-dry-heating system to enhance physicochemical and antioxidative properties of dried whole longan fruit. Heliyon. 2021;7(5):e07094. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07094>
49. Mokrzycki W, Tatol M. Color difference Delta E-A survey Colour difference ΔE -A survey [Internet]. 2011. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/236023905_Color_difference_Delta_E_-_A_survey#fullTextFileContent
50. Kırbaş Z, Kumcuoglu S, Tavman S. Effects of apple, orange and carrot pomace powders on gluten-free batter rheology and cake properties. J Food Sci Technol. 2019;56(2):914-26. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-03554-z>

Perfil epidemiológico dos pacientes com leishmaniose visceral na Região Nordeste do Brasil no período de 2012-2022

Epidemiological profile of patients with visceral leishmaniasis in the Northeast Region of Brazil in the period 2012-2022

Victor Hugo Ferraz da Silva¹ , Leonardo Luiz de Freitas² , Yago Abilio Silva Santos¹ , Diego dos Passos Santiago¹ ,
Aline Dalarme Gomes Galvão¹ , Sara Maria da Cruz Lima¹ , Beatriz Ferreira Couto¹ , Alexandre Machado de Andrade¹ 

¹ Departamento de Medicina, Universidade Federal de Sergipe, Lagarto, SE, Brasil.

² Departamento de Medicina, Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas, Maceió, AL, Brasil.

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

Recebido/Received: 10.06.2024

Aceito/Accepted: 22.10.2024

Publicação/Publication: 13.12.2024

Editor Chefe/Editor-in-chief: Adriana Bugno

RESUMO

A leishmaniose visceral é uma doença parasitária de evolução crônica e acometimento sistêmico potencialmente fatal. Trata-se de uma zoonose preocupante para as autoridades de saúde pública por ser muito presente no Brasil, com destaque na Região Nordeste, devido sua elevada concentração de casos. O objetivo deste estudo foi identificar a incidência, número de casos por sexo, faixa etária e grau de escolaridade, coinfeção por HIV, tempo médio de internação, custo médio e mortalidade intra-hospitalar no período de 2012 a 2022, na Região Nordeste por meio de levantamento de dados secundários fornecidos publicamente pelo DATASUS. Houve uma queda no número de casos a partir de 2019, com diminuição em 2021 e aparente estabilização em 2022. Os estados mais afetados foram Maranhão (23,37%), Ceará (16,51%) e Bahia (12,51%). Observou-se maior incidência no sexo masculino, representando 67,10% do total, e na faixa etária de 40-59 anos, com 20,58%, maior prevalência em indivíduos com o ensino fundamental incompleto (57% dos casos), além de coinfeção por HIV em 10,69% dos casos. O tempo médio de internação foi de 13 dias, com custo médio de R\$ 491,00 por internação e média da taxa de mortalidade intra-hospitalar de 3,41%, apresentando um panorama epidemiológico complexo e multifacetado.

Palavras-chave. Leishmania, Leishmaniose Visceral, Brasil, Epidemiologia, Região Nordeste.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is a parasitic disease with a chronic course and potentially fatal systemic involvement. It is a zoonosis of concern to public health authorities due to its presence in Brazil, especially in the Northeast Region, which has a high concentration of cases. The objective of this study was to identify the incidence, number of cases by sex, age group and level of education, HIV co-infection, average length of hospital stay, average cost, and in-hospital mortality in the period from 2012 to 2022 in the Northeastern Region through a survey of secondary data publicly provided by DATASUS. There was a decline in the number of cases starting in 2019, with a significant decrease in 2021 and an apparent stabilization in 2022. The most affected states were Maranhão (23.37%), Ceará (16.51%) and Bahia (12.51%). A higher incidence was observed in males, accounting for 67.10% of the total, and in the age group of 40-59 years, with 20.58%. There was also a higher prevalence in individuals with incomplete primary education (57% of the cases), as well as HIV co-infection in 10.69% of cases. The average length of hospital stay was 13 days, with an average cost of R\$ 491.00 per hospitalization, and an average in-hospital mortality rate of 3.41%, presenting a complex and multifaceted epidemiological panorama.

Keywords. Leishmania, Leishmaniasis, Visceral, Brazil, Epidemiology, Northeastern Region.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV), conhecida popularmente como calazar, é uma doença parasitária provocada pela infecção pelo protozoário *Leishmania infantum chagasi*, transmitido ao homem através da picada do vetor fêmea infectado, o inseto da espécie *Lutzomyia longipalpis*, sendo mais conhecido por mosquito-palha, birigui, asa-dura, dentre outros¹. É uma doença de evolução crônica, a qual pode evoluir ao óbito quando não tratada em cerca de 90% dos casos, pois pode haver acometimento sistêmico².

O ciclo da LV inicia quando a fêmea do flebotomíneo, injeta promastigotas metacíclicos na pele do hospedeiro durante um repasto sanguíneo. Seu reservatório é o cão e o homem.

Não ocorre transmissão direta de pessoa para pessoa dentro do ciclo. Depois de o indivíduo ser contaminado, o parasita pode permanecer incubado por um período médio que varia de duas semanas a dois meses³. Os principais sintomas apresentados são febre e esplenomegalia, que ocorrem na maioria dos pacientes; hepatomegalia, nem sempre associada à esplenomegalia, palidez associada à anemia grave, perda ponderal, leucopenia e trombocitopenia. Em casos mais graves, pode prosseguir com edema de membros inferiores, desnutrição com evolução para um quadro de anasarca e, devido às lesões no baço e no fígado, sangramentos, petéquias, ascite e icterícia também podem ser encontrados⁴.

De acordo com dados obtidos pela Organização Pan-Americana da Saúde⁴, entre os anos de 2001 e 2021, houve uma média anual de 2.488 casos de LV na região das Américas. Em 2021, apesar de ter havido redução dos casos registrados, o valor total ainda permanece elevado nas Américas e no Brasil, onde se concentram na Região Nordeste. Isso é explicado devido à adaptação do vetor às condições climáticas e ambientais das regiões com umidade e temperatura elevadas, associando uma maior densidade dos vetores durante os períodos de chuva nas regiões tropicais, já que o aumento da umidade proporciona a eclosão dos ovos depositados no verão⁵.

Além disso, a LV, segundo a Organização Mundial da Saúde, faz parte do grupo de doenças negligenciadas, pois afeta indivíduos em condições mais vulneráveis socioeconomicamente, o que leva a um maior contato com o vetor de transmissão, acometendo principalmente crianças menores de cinco anos⁶.

Diante do exposto acima, foi realizada uma avaliação para estudar o perfil epidemiológico dos pacientes com leishmaniose visceral na Região Nordeste.

MATERIAL E MÉTODOS

A operacionalização da pesquisa incluiu o levantamento de dados, obtidos por meio de fontes secundárias, fornecidos publicamente com abordagem qualitativa e quantitativa. Inicialmente foi realizada uma pesquisa exploratória, para uma visualização inicial da amostra.

O estudo teve como objetivo identificar a incidência, o número de casos por sexo, a faixa etária, o grau de escolaridade, a coinfeção por HIV, o tempo médio de internação, o custo médio dessas internações e a mortalidade intra-hospitalar no período de 2012 a 2022, evidenciando os indicadores epidemiológicos acerca da LV, de acordo com os registros oficiais dos órgãos de controle no Brasil.

Foram extraídos do sistema DATASUS e Tabnet⁷, os dados referentes à epidemiologia e morbidade, assim como a morbidade e mortalidade hospitalar da leishmaniose visceral na Região Nordeste, referentes ao período de 2012 a 2022. Nesse período foram utilizados dados referentes aos valores totais de casos,

valores médios de casos, média de permanência hospitalar, internações por município, óbitos por faixa etária e sexo dos pacientes infectados com LV na Região Nordeste.

A combinação entre as abordagens qualitativa e quantitativa foram mensuradas a partir dos dados fornecidos pelo DATASUS desse período, e analisados por meio do programa estatístico GraphPad Prism 8[©]. As análises quanto ao sexo foram realizadas por meio do Test t, o qual é utilizado para comparar as médias de duas amostras independentes, a fim de verificar a natureza da variação entre os conjuntos. As outras análises foram realizadas por meio da análise de variância (ANOVA), utilizada para comparar as médias de três ou mais grupos independentes. Também foi utilizada a regressão linear, a qual prevê o valor de dados desconhecidos utilizando-se de outro valor relacionado e conhecido, para verificar a variação anual no número de casos de LV na Região Nordeste no período de 2012 a 2022, a fim de determinar a tendência.

RESULTADOS

Os resultados obtidos analisando a variação anual no número de casos de LV no Nordeste (**Figura 1A**) revelam padrões significativos na incidência de LV na região durante o período de 2012 a 2022. Inicialmente o que se verifica até o ano de 2018 é uma tendência de aumento no número de casos, conforme demonstrado pelo modelo de regressão linear. Entretanto, ao adicionarmos o período de 2019-2022 à análise, percebemos uma tendência geral de queda conforme demonstrado na **Figura 1A**.

A partir do ano de 2019, uma queda acentuada nos casos foi notada, refletida em uma média móvel negativa de -30%. Este declínio continuou em 2020, com uma redução adicional de aproximadamente -20,16%, indicando uma possível eficácia das medidas de controle e prevenção contra a COVID-19 também sobre a LV durante esse período, como diminuição da mobilidade urbana que pode ter levado a uma menor interação humano-vetor ao diminuir o fluxo de pessoas para áreas endêmicas. Em 2021, embora a tendência de queda persistisse, observou-se uma diminuição, representada por uma média móvel negativa de -16,82%.

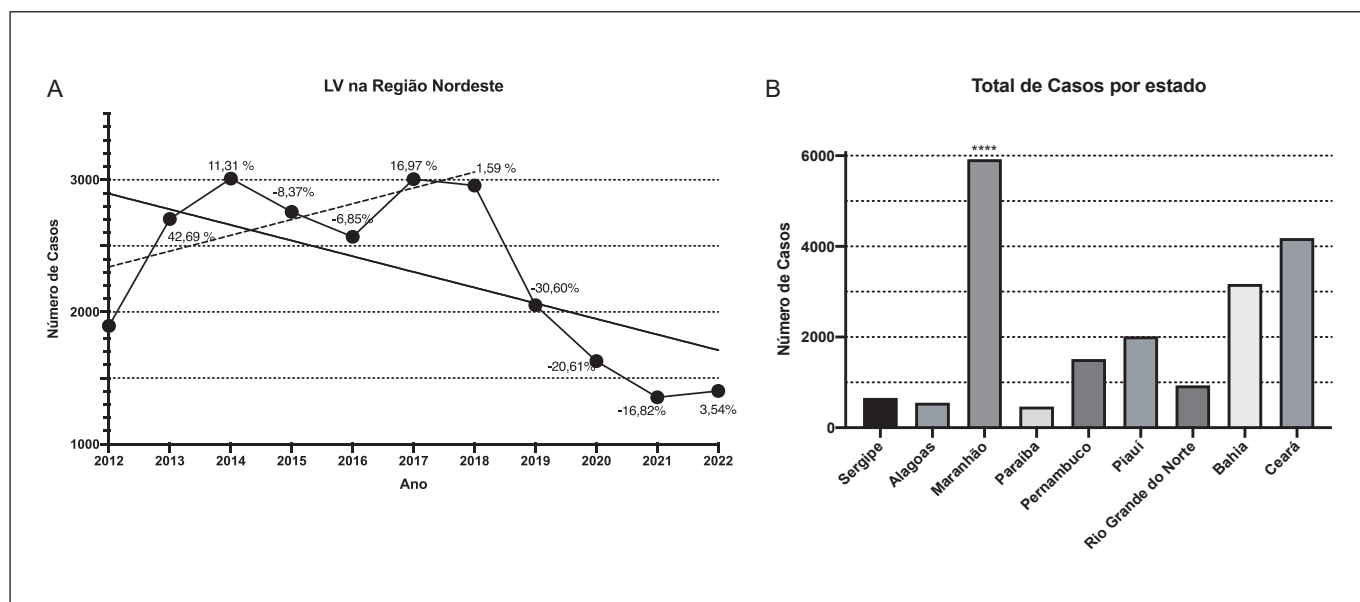


Figura 1. Número de casos de leishmaniose visceral na Região Nordeste no período de 2012-2022: (A) variação do percentual anual (linha reta contínua demonstra a tendência) e (B) e total por estado

Notavelmente, no ano de 2022, os casos de LV aparentam ter atingido um estado de estabilização, conforme indicado pela média móvel de 3,54%. Por fim, a análise de tendência realizada por regressão linear apontou uma tendência de queda nos casos de LV no período avaliado (**Figura 1A**).

A incidência de LV na Região Nordeste do Brasil no período de 2012-2022 foi de 25.337 casos. A maioria dos casos foi registrada nos estados do Maranhão, Ceará e Bahia, correspondendo a 23,37%; 6,51% e 12,51% do total, respectivamente (**Figura 1B**).

Dos 25.337 casos registrados, 17.003 (67,10%), afetaram indivíduos do sexo masculino; em contrapartida, as mulheres representaram apenas 32,90% dos casos, totalizando 8.334 registros ($p < 0,001$, pelo teste t de Student) (**Figura 2A**).

A **Figura 2B** descreve o número de casos por faixa etária, onde nota-se que indivíduos entre 40-59 anos, 5-9 anos, 1-4 anos e 20-39 anos foram os mais afetados, correspondendo a 20,58%; 17,74%; 15,49% e 13,52%, respectivamente. Notavelmente, somadas, essas quatro faixas representam 67,34% do número total de casos observados.

A maioria dos indivíduos acometidos por LV no período analisado possuía ensino fundamental incompleto (57% do total), como descrito na **Figura 3A**. Enquanto apenas 1% dos indivíduos tinham ensino superior.

Durante o período de análise, a taxa média de coinfeção na Região Nordeste foi de 10,69% (**Figura 3B**). Esse valor representa a porcentagem de indivíduos com LV que também foram diagnosticados com o HIV. Dentre os estados do Nordeste, o Rio Grande do Norte se destacou com a maior taxa de coinfeção, atingindo 23,20%, significativamente diferente dos outros ($p < 0,001$). Por outro lado, o estado da Bahia apresentou a menor taxa de coinfeção na Região Nordeste com 3,05%.

O tempo médio de permanência internado de pacientes com LV na Região Nordeste foi de 13 dias. De acordo com os resultados obtidos, a partir do teste de análise de variância (ANOVA) observou-se que três estados apresentaram tempos médios de permanência hospitalar acima da média regional, onde o Rio Grande do Norte registrou um tempo médio de permanência de 18 dias, a Paraíba com 17 dias e Alagoas com a média de permanência de 19 dias ($p < 0,001$) (**Figura 4A**). O estado do Maranhão apresentou um tempo médio de permanência menor em comparação com os demais estados, com uma média de 12 dias, sem diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

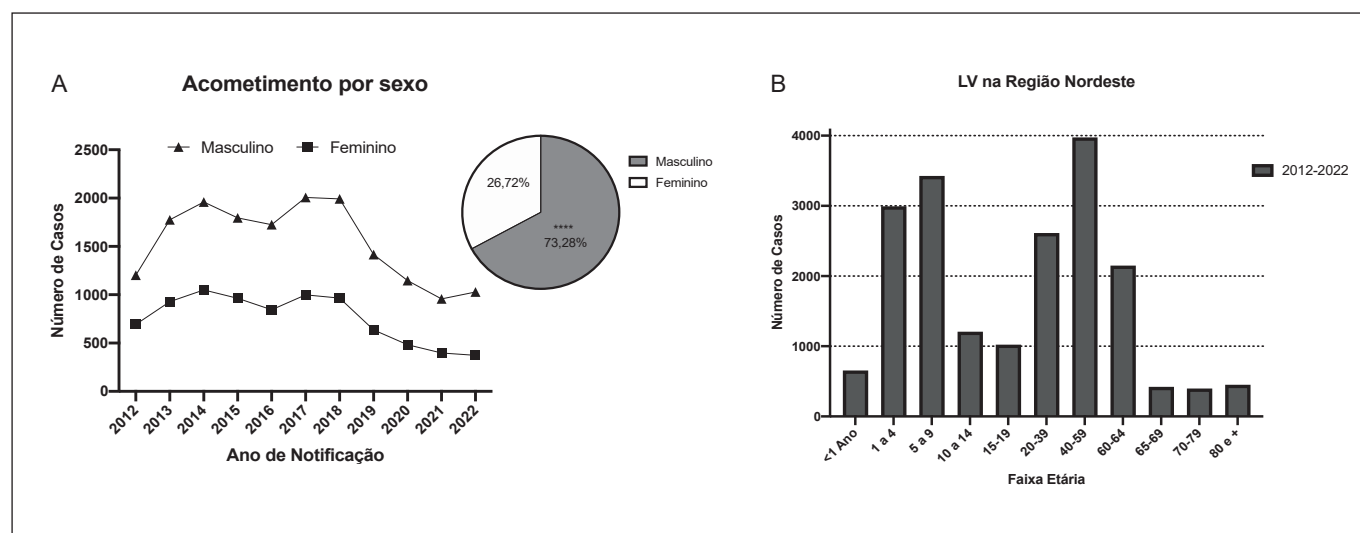


Figura 2. Casos de leishmaniose visceral na Região Nordeste no período de 2012-2022: (A) por sexo e (B) por faixa etária

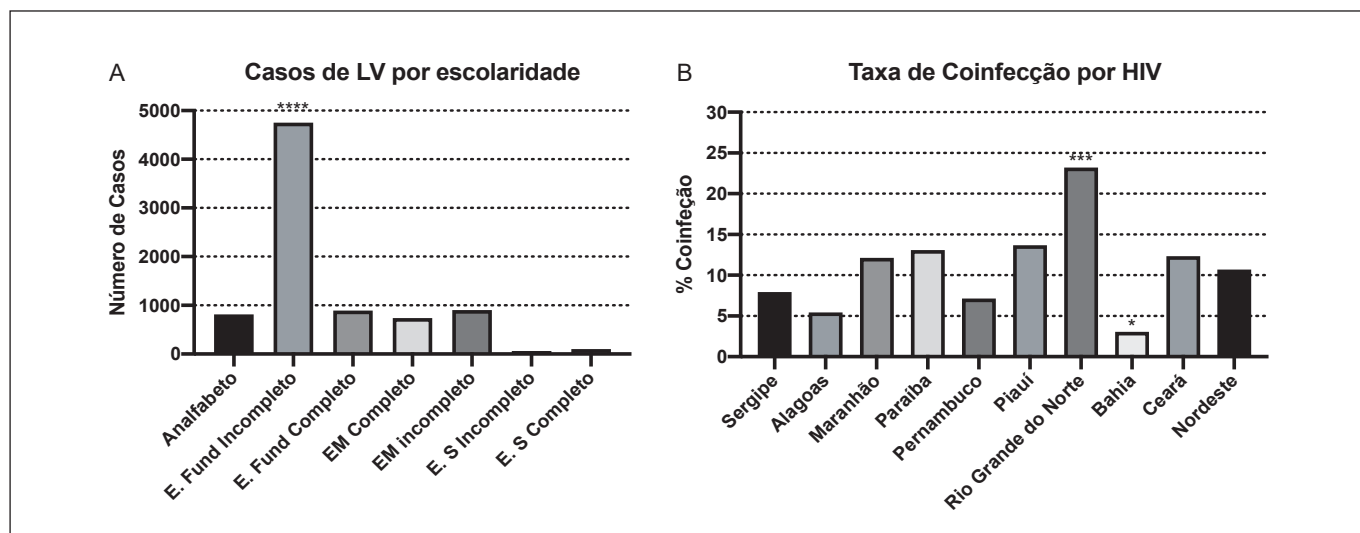


Figura 3. (A) Relação entre escolaridade e o número de casos de leishmaniose visceral na Região Nordeste no período de 2012-2022 (**** corresponde ao valor de $p < 0,001$) e (B) taxa de coinfeção por HIV na Região Nordeste

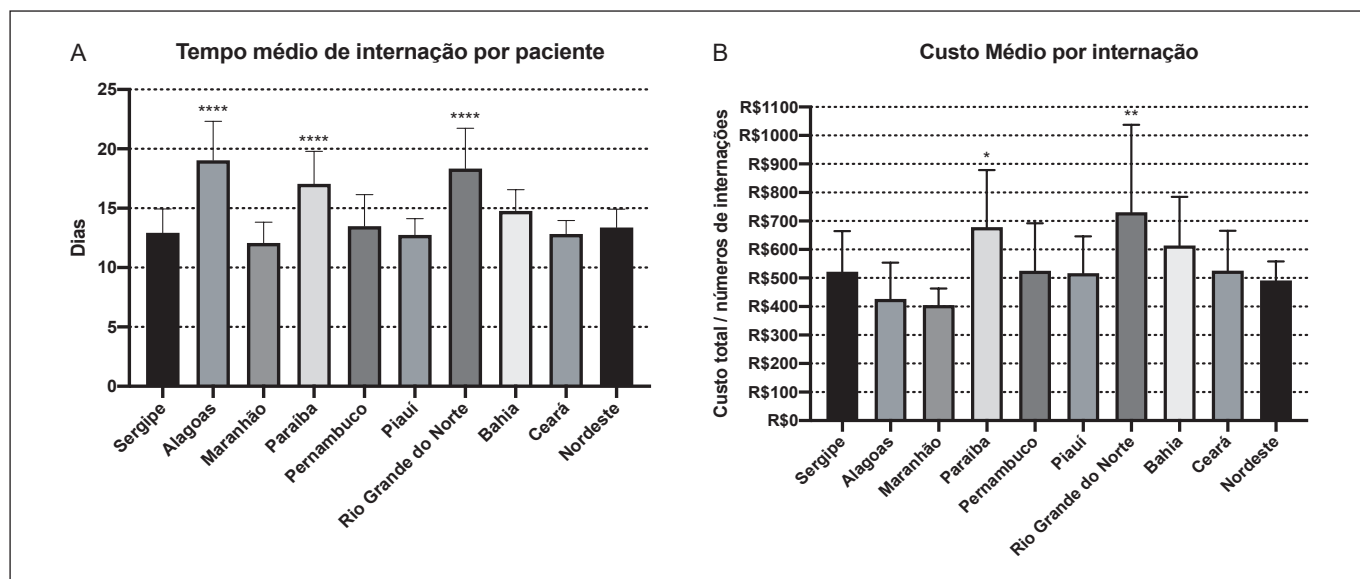


Figura 4. (A) Tempo médio e (B) custo médio de internação por paciente nos estados da Região Nordeste, no período de 2012-2022

Na Região Nordeste o custo médio de uma internação por LV foi de R\$ 491,00 por paciente. O estado do Rio Grande do Norte, com um custo médio por internação de R\$ 730,00 e a Paraíba, com um custo de R\$ 678,00, onde foram os com maior custo médio (Figura 4B).

A taxa de mortalidade intra-hospitalar é um indicador crítico da qualidade do atendimento e da eficácia do tratamento. Na Região Nordeste, a média dessa taxa é de 3,41%. O estado do Rio Grande do Norte teve a maior taxa de mortalidade: 7,18% (Figura 5).

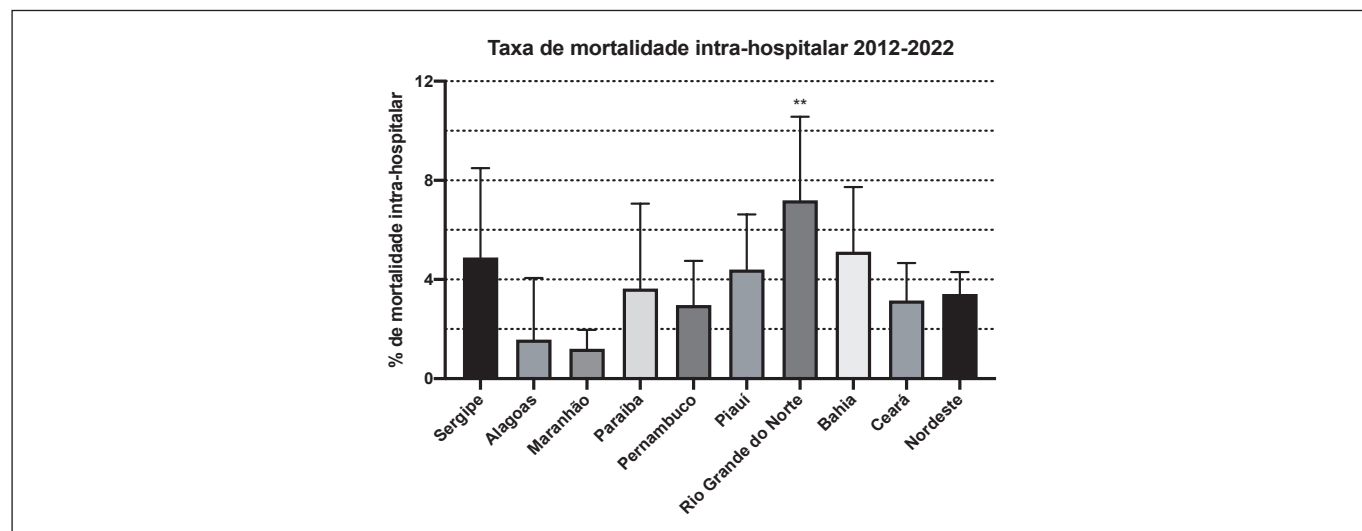


Figura 5. Taxa de mortalidade intra-hospitalar nos estados da Região Nordeste, no período de 2012-2022

DISCUSSÃO

A LV é uma doença de notificação compulsória com distribuição heterogênea entre as regiões do Brasil, com destaque para a Região Nordeste⁸. Nosso estudo evidenciou que a distribuição anual dos casos na Região Nordeste revela alta incidência de LV, especialmente no período de 2017 a 2022. Entre os anos de 2017 e 2018, aparenta haver uma estabilização nos casos, sugerindo uma relativa constância na incidência da doença em comparação com o período anterior.

No ano de 2019, notou-se uma queda acentuada nos casos, refletida em uma média móvel negativa de -30%, indicando uma possível eficácia das medidas de controle e prevenção implementadas, como controle de vetores, tratamento e monitoramento de cães infectados, campanhas de educação e conscientização e melhoria na infraestrutura de saúde pública^{8,9}. No entanto, a conexão temporal com o início da pandemia em 2020 pode sugerir uma possível influência da COVID-19 nas tendências observadas, onde durante a pandemia recursos e esforços foram redirecionados para combater o coronavírus, impactando a capacidade de vigilância e notificação de outras doenças, como a LV⁹.

O declínio nos casos, iniciado em 2020 pode ser, em parte, atribuído a uma subnotificação resultante da priorização da resposta à COVID-19. Assim, o menor número de casos pode não estar diretamente relacionado aos programas de controle, mas sim a uma possível influência da pandemia de COVID-19. Nesse sentido, a sobreposição entre a COVID-19 e a LV, aliada à sobrecarga do sistema de notificações, pode ter desempenhado um papel crucial na diminuição dos registros¹⁰. Este panorama, aparentemente auspicioso, revela uma complicada rede de desafios e demanda uma análise mais aprofundada para entender as implicações e desenvolver estratégias eficazes de enfrentamento à doença.

Por outro lado, as medidas de controle da pandemia, como distanciamento social e restrições de mobilidade, podem ter afetado a transmissão da LV, contribuindo para a tendência de queda. Mudanças nas atividades humanas e nas interações, necessárias para conter a disseminação da COVID-19, podem ter impactado indiretamente a exposição aos vetores da LV¹¹. Entretanto, ainda não dispomos de evidências conclusivas sobre o alcance do impacto das medidas de controle da COVID-19, como confinamento e restrições de viagens, nos serviços de saúde relacionados à LV.

No que diz respeito à incidência por estado destaca-se que, apesar de Bahia, Pernambuco e Ceará figurarem como os estados mais populosos da Região Nordeste, conforme dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística¹², a incidência de LV não segue linearmente a distribuição populacional. Um exemplo notável é Pernambuco, que registrou apenas 1.515 casos, ocupando a quinta posição na contagem total e ficando após o estado do Piauí, que apresentou 2.015 casos.

Fatores como condições socioeconômicas, acesso aos serviços de saúde, características geográficas e práticas de controle de vetores, podem exercer uma influência mais marcante na propagação da doença do que somente a densidade populacional¹³. Essa complexidade mostra a necessidade de uma abordagem abrangente e multidimensional ao analisar os padrões de incidência da LV, indo além da simples consideração do tamanho da população de um determinado estado da Região Nordeste.

A notável disparidade de incidência de LV entre os sexos revelada por nossa análise epidemiológica demanda atenção especial e possivelmente relaciona-se aos hábitos de vida. Fatores comportamentais e ocupacionais, como atividades em áreas rurais ou agrícolas mais prevalentes entre homens, podem explicar parte dessa disparidade, visto que aumentam a exposição ao vetor¹⁴. Uma hipótese alternativa propõe que as discrepâncias fisiológicas nas interações entre patógeno e hospedeiro, bem como na resposta imune após a infecção, fundamentam a prevalência masculina na LV. Os hormônios, incluindo os sexuais, podem modular o sistema imunológico e influenciar a resposta às infecções. Até o momento, contudo, não existem estudos que expliquem as razões fisiológicas dessa predominância masculina na LV¹⁵.

No que diz respeito à distribuição de casos por faixa etária, o expressivo número de ocorrências entre os 40-59 anos e na faixa de 20-39 anos, pode insinuar uma prolongada exposição ao ambiente, atividades laborais ou fatores relacionados ao estilo de vida, os quais aumentam a suscetibilidade à doença.

Por outro lado, a significativa incidência em crianças de 5-9 anos e de 1-4 anos destaca-se como um ponto de interesse, indicando potenciais vulnerabilidades específicas nesses grupos mais jovens. Uma análise mais minuciosa das circunstâncias desses casos pode revelar padrões comportamentais, socioeconômicos e ambientais que influenciam a transmissão.

Comumente, regiões de menor escolaridade tendem a coincidir com condições habitacionais precárias, aumento da exposição ambiental e ausência de infraestrutura sanitária adequada. Pessoas em residências mais vulneráveis podem estar mais propensas a um maior contato com vetores da leishmania, elevando assim, o risco de infecção^{13,16}. Ademais, a baixa representatividade de casos entre aqueles com ensino superior completo sugere que o acesso à informação sobre prevenção pode ser mais robusto nesses grupos.

A coexistência entre o HIV e a LV na Região Nordeste do Brasil suscita uma análise detalhada das implicações clínicas, epidemiológicas e de saúde pública. A relação entre o HIV e a LV apresenta múltiplos aspectos. A imunossupressão induzida pelo HIV pode aumentar a suscetibilidade à infecção por leishmania, complicando o quadro clínico¹⁷. Além disso, a coinfeção pode resultar em uma evolução mais severa da LV, tornando o tratamento mais desafiador. A detecção precoce da coinfeção é crucial para uma gestão clínica eficaz, ressaltando a importância da integração de programas de controle do HIV e da LV. Estratégias de prevenção, teste e tratamento integrados são fundamentais para abordar de maneira abrangente essas duas condições de saúde pública¹⁸.

Neste estudo, os resultados revelaram variações significativas nos tempos médios de permanência entre os estados, evidenciando situações em que o tratamento excedeu a média regional. Destacam-se,

nesse contexto, os estados do Rio Grande do Norte, Paraíba e Alagoas, com tempos médios de permanência de 18, 17 e 19 dias, respectivamente. Esses valores são significativamente superiores à média regional de 13 dias. A análise do tempo médio de internação proporciona uma compreensão das disparidades na gestão e tratamento da LV na Região Nordeste, fornecendo diretrizes para aprimorar a qualidade do atendimento e a eficácia dos tratamentos nos estados com tempos médios de permanência mais prolongados¹⁹. Outros fatores que podem influenciar a duração do tratamento incluem a disponibilidade de recursos, protocolos de tratamento locais, acesso a cuidados de saúde e a gravidade no momento do diagnóstico¹⁸. Além disso, é importante destacar a eficiência do estado do Maranhão em manter um tempo médio de permanência menor comparado principalmente aos estados do Rio Grande do Norte, Paraíba e Alagoas, apesar de estar em conformidade com a média regional.

Ao aprofundar a análise e correlacionar o tempo médio de permanência com o custo médio por paciente internado, fica evidente a relação entre essas variáveis. Dois estados em particular se destacam por apresentar custos médios consideravelmente acima da média regional, e esses estados também foram mencionados anteriormente em relação ao tempo médio de permanência (Paraíba e Rio Grande do Norte). Essa correlação sugere que nos estados do Rio Grande do Norte e Paraíba, os pacientes com LV enfrentam uma duração de tratamento mais extensa o que, por conseguinte, resulta em custos mais elevados em comparação com a média regional. Esses valores mais altos indicam uma demanda financeira superior para o tratamento de pacientes com essa condição nesses estados. Esta relação direta com o tempo médio de permanência mais longo, observado anteriormente nesses estados, reforça a associação entre a prolongada permanência no tratamento e os custos mais elevados associados à LV^{8,20}.

Por último, a taxa de mortalidade durante a internação emerge como um indicador crítico da gravidade dos casos e da eficácia do tratamento. A elevada taxa de mortalidade sugere possíveis desafios na gestão clínica, no acesso a cuidados intensivos ou em outras barreiras que podem impactar adversamente os desfechos de saúde dos pacientes com LV no Rio Grande do Norte e em outros estados da Região Nordeste do Brasil²¹.

A correlação entre as variáveis de tempo de internação, custo por paciente e a taxa de mortalidade intra-hospitalar aponta para desafios significativos no tratamento da LV no estado do Rio Grande do Norte. O elevado custo associado ao tratamento, aliado a uma permanência hospitalar mais prolongada, não resulta em uma redução na taxa de mortalidade intra-hospitalar¹⁸. Este cenário indica a necessidade premente de revisão das práticas de tratamento, visando assegurar uma utilização eficaz dos recursos disponíveis e otimizar a qualidade da assistência oferecida para pacientes com LV.

CONCLUSÃO

O presente estudo analisou a epidemiologia da LV na Região Nordeste do Brasil, destacando padrões de incidência e desafios no controle da doença. Nossa análise demonstrou uma tendência de queda nos casos de LV na Região Nordeste no período de 2012-2022. Entre 2017 e 2018, houve uma aparente estabilização nos casos, seguida por uma queda iniciada em 2019, levantando reflexões sobre a possível influência indireta da pandemia de COVID-19.

A sobreposição das estratégias de controle da pandemia com os esforços direcionados à LV sugere a possibilidade de subnotificação, indicando que a redução nos casos pode ser atribuída, em parte, à

realocação de recursos para combater a COVID-19. Isso destaca a necessidade de uma análise mais profunda para entender as implicações e desenvolver estratégias eficazes de enfrentamento à LV.

Além disso, a disparidade na incidência entre os sexos revela padrões relacionados aos hábitos de vida; enquanto a distribuição por faixa etária destaca a necessidade de estratégias específicas para diferentes grupos demográficos. A predominância da LV em adultos nas faixas de 40-59 anos e 20-39 anos sugere uma exposição prolongada ao ambiente, atividades laborais ou fatores relacionados ao estilo de vida. A incidência em crianças de 5-9 anos e de 1-4 anos destaca a importância de analisar padrões comportamentais, socioeconômicos e ambientais que influenciam a transmissão.

A análise do fator escolaridade aprimora a compreensão das discrepâncias na distribuição da LV, destacando que regiões com menores índices tendem a coincidir com condições habitacionais precárias, aumentando a exposição ambiental e a suscetibilidade à doença.

Os tempos médios de permanência, custos e taxa de mortalidade evidenciam desafios específicos em alguns estados, destacando a necessidade de revisão das práticas de tratamento para otimizar a eficácia dos recursos disponíveis e melhorar os desfechos clínicos.

Em síntese, este estudo fornece *insights* cruciais para orientar estratégias de prevenção, controle e tratamento da LV na Região Nordeste do Brasil, sublinhando a importância de abordagens multidimensionais e integradas para enfrentar os complexos desafios epidemiológicos da doença.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não existir conflitos de interesse.

FINANCIAMENTO

Não declarado pelos autores.

AGRADECIMENTO

Não declarado pelos autores.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Victor Hugo Ferraz da Silva: concepção do estudo, delineamento da metodologia, transcrição dos resultados, análise estatística e revisão do manuscrito final. Leonardo Luiz de Freitas: interpretação dos resultados, elaboração da discussão, revisão do manuscrito. Yago Abilio Silva Santos: coleta de dados, análise estatística e redação do manuscrito. Diego dos Passos Santiago: levantamento dos dados, formatação, redação e aprovação da versão final do manuscrito. Aline Dalarme Gomes Galvão: coleta de dados, formatação e revisão final do manuscrito. Sara Maria da Cruz Lima: delineamento da metodologia, elaboração, redação e aprovação da versão final do manuscrito. Beatriz Ferreira Couto: redação e revisão do manuscrito. Alexandre Machado de Andrade: concepção do estudo, delineamento da metodologia e aprovação final do manuscrito.

NOTA DE APRESENTAÇÃO

Não declarado pelos autores.

REFERÊNCIAS

1. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. 1ª edição, 122p. 2014. [acesso 2023 Dez 24]. Disponível em:
https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral_1edicao.pdf
2. Aguiar PF, Rodrigues RK. Leishmaniose visceral no Brasil: artigo de revisão. RUC. 2017;19(1):192-204. Disponível em:
<https://www.periodicos.unimontes.br/index.php/unicientifica/article/view/2119>
3. Cezar IS, Abreu JSD, Silva DKC, Meira CS. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral no estado da Bahia, Brasil. Res Soc Dev. 2021;10(14):e368101422122.
<https://doi.org/10.33448/rsd-v10i14.22122>
4. Organização Pan-Americana da Saúde – OPAS. Leishmaniose visceral. [acesso 2023 Dez 24]. Disponível em:
<https://www.paho.org/pt/topicos/leishmaniose/leishmaniose-visceral>
5. Fonseca Júnior JD, Mazzinghy CL, França EC, Pinow ACS, Almeida KS. Leishmaniose visceral canina: revisão. PUBVET. 2021;15(03):1-8.
<https://doi.org/10.31533/pubvet.v15n03a779.1-8>
6. Lima PV. Leishmaniose visceral no Nordeste brasileiro: aspectos espaço-temporal e variabilidade climática [tese de doutorado]. Natal (RN): Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2020. 102 p.
7. Ministério da Saúde (Brasil). DATASUS. Tecnologia da informação a serviço do SUS. Informações de Saúde. Tabnet. Brasília, DF: Ministério da Saúde; 2022 [acesso 2023 Dez 23]. Disponível em:
<https://datasus.saude.gov.br/informacoes-de-saude-tabnet/>
8. Lima RG, Mendonça TM, Mendes TS, Menezes MVC. Perfil epidemiológico da leishmaniose visceral no Brasil, no período de 2010 a 2019. REAS. 2021;13(4):e6931.
<https://doi.org/10.25248/reas.e6931.2021>
9. Sallas J, Elidio GA, Costacurta GF, Frank CHM, Rohlf's DB, Pacheco FC et al. Decréscimo nas notificações compulsórias registradas pela Rede Nacional de Vigilância Epidemiológica Hospitalar do Brasil durante a pandemia da COVID-19: um estudo descritivo, 2017-2020. Epidemiol Serv Saúde. 2022;31(1):e2021303.
<https://doi.org/10.1590/S1679-49742022000100011>

10. Paul A, Singh S. Visceral leishmaniasis in the COVID-19 pandemic era. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2023;117(2):67-71.
<https://doi.org/10.1093/trstmh/trac100>
11. Maruf S, Sagar SK, Rashid MU, Uddin MR, Ghosh D, Ghosh P et al. Assessment of treatment outcomes of visceral leishmaniasis (VL) treated cases and impact of COVID-19 on VL management and control services in Bangladesh. *J Infect Public Heal*. 2023;16(11):1716-21.
<https://doi.org/10.1016/j.jiph.2023.09.003>
12. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Panorama. Censo 2022. [acesso 2024 Jun 07]. Disponível em:
<https://censo2022.ibge.gov.br/panorama/>
13. Silva DPC, Périco E, Silveira EF, Schröder NT. Spaciality of human visceral leishmaniasis in the state of Maranhão, Brazil. *Rev Gest Soc Ambient*. 2024;18(2):e04501.
<https://doi.org/10.24857/rgsa.v18n2-033>
14. Dahal P, Singh-Phulgenda S, Olliaro PL, Guerin PJ. Gender disparity in cases enrolled in clinical trials of visceral leishmaniasis: A systematic review and meta-analysis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 2021;15(3):e0009204.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009204>
15. Cloots K, Burza S, Malaviya P, Hasker E, Kansal S, Mollett G et al. Male predominance in reported visceral leishmaniasis cases: nature or nurture? A comparison of population-based with health facility-reported data. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2020;14(1):e0007995.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007995>
16. Miranda CSC, Souza BC, Filgueiras TCGM, Sousa AM, Peixoto MCS, Filgueiras TCGM et al. Visceral leishmaniasis and land use and cover in the Carajás Integration Region, Eastern Amazon, Brazil. *Trop Med Infect Dis*. 2022;7(10):255.
<https://doi.org/10.3390/tropicalmed7100255>
17. Reis ES, Ribeiro CJN, Santos AD, Araújo DC, Bezerra-Santos M, Silva ER et al. Magnitude of visceral leishmaniasis and HIV coinfection and association with social determinants of health in the Northeast region of Brazil: a retrospective, spatiotemporal model (2010-2018). *Parasitol Res*. 2022;121:1021-31.
<https://doi.org/10.1007/s00436-022-07450-6>
18. Burki T. Guidelines for visceral leishmaniasis and HIV co-infection. *Lancet Infect Dis*. 2022;22(8):1124-5.
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(22\)00461-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(22)00461-3)

19. Martins IML, Silva JS, Campos DKO, Oliveira RS, Silva PLN, Carvalho SFG et al. Visceral leishmaniasis: historical series of hospitalized patients and correlation with climate in an endemic area in Minas Gerais, Brazil. *J Bras de Patol Med Lab*. 2021;57:e2702021. <https://doi.org/10.5935/1676-2444.20210045>
20. Brito SPS, Lima MS, Ferreira AF, Ramos Jr. AN. Hospitalizações por doenças tropicais negligenciadas no Piauí, Nordeste do Brasil: custos, tendências temporais e padrões espaciais, 2001-2018. *Cad Saúde Pública*. 2022;38(8):e00281021. <https://doi.org/10.1590/0102-311XPT281021>
21. Murilo BMC, Andrade Júnior FP, Cordeiro LV, Barbosa VSA. Epidemiological aspects of visceral leishmaniasis in Rio Grande do Norte, Brazil. *J Trop Pathol*. 2023;52(1):51-65. <https://doi.org/10.5216/rpt.v52i1.74030>

Utilização da Microscopia Eletrônica de Varredura na detecção de matérias estranhas em águas envasadas

Scanning Electron Microscopy as a tool to detect and quantify microscopic physical hazards in bottled mineral waters

Celli Rodrigues Muniz¹ , Jaqueline Rabelo de Lima² , Adroaldo Guimarães Rossetti¹ 

¹ Laboratório de Bioimagem, Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, Ceará, CE, Brasil.

² Faculdade de Educação e Ciências Integradas de Crateús, Universidade Estadual do Ceará, Crateús, CE, Brasil.

*Autor de correspondência/Corresponding author: celli.muniz@embrapa.br

Recebido/Received: 03.04.2024

Aceito/Accepted: 11.06.2024

Publicação/Publication: 23.08.2024

Editor Chefe/Editor-in-chief: Adriana Bugno

RESUMO

Este trabalho objetiva averiguar a presença de matérias estranhas presentes em águas minerais envasadas e sugerir a utilização da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), como técnica adequada para detecção e contagem. Oito amostras de água mineral foram obtidas e subamostras de 100 mL foram filtradas em membranas, que foram secas e recobertas com platina e observadas em MEV. Áreas de 21.025 μm^2 foram focalizadas e as partículas contadas. Realizaram-se análise de variância e o teste de Regwq para a comparação das médias das contagens. Diferentes partículas visualizadas foram registradas sob distintas magnificações. A análise de variância revelou alta significância entre a quantidade de matérias estranhas das amostras, indicando que as amostras diferiram bastante quanto a essa característica. As médias obtidas obedeceram a uma estratificação, mas foram estimadas com grande precisão, sugerindo-se que a subdivisão em 10 grupos de contagem e a extrapolação para o volume de 100 mL é uma estimativa confiável para a contagem de partículas filtradas nesse volume de água. Foi mostrado que o MEV se apresentou como instrumento auxiliar adequado para a contagem de matérias estranhas em amostras de águas minerais envasadas, especialmente quando suas dimensões não permitem sua identificação convencionalmente.

Palavras-chave. Matérias Estranhas, Microscopia, Bebidas, Águas Minerais.

ABSTRACT

This work aims to investigate the presence of microscopic foreign materials in bottled mineral waters and suggest the use of Scanning Electron Microscopy (SEM) as a suitable technique for counting foreign matter. Eight samples of mineral water were obtained, and 100 mL subsamples were filtered through membranes, which were then dried, coated with platinum, and observed under SEM. Areas of 21,025 μm^2 were analysed, and the particles present were counted. Variance analysis was carried out, and the Regwq test was applied to compare the counting averages. Samples of the dirt particles were imaged at different magnifications. The analysis of variance revealed high significance among the samples, indicating substantial differences between them. The averages followed a stratification pattern and were estimated with great precision, suggesting that the subdivision into 10 count groups and the extrapolation to 100 mL volume is a reliable estimate for the count of particles filtered in this volume of water. It was shown that SEM was a suitable instrument for counting and observing foreign matter and dirt in samples of bottled natural mineral waters, especially when their dimensions are too small to be detected by conventional methods.

Keywords. Foreign Particles, Microscopy, Beverages, Mineral Waters.

INTRODUÇÃO

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por meio da Resolução RDC nº 717/2022¹, estabelece que as águas envasadas compreendem as definições para a água mineral natural, a água natural, a água adicionada de sais e a água do mar dessalinizada potável. Desse grupo, a água mineral natural é obtida diretamente de fontes naturais ou por extração de águas subterrâneas, sendo caracterizada pelo conteúdo definido e constante de determinados sais minerais, oligoelementos e outros constituintes.

Assim, as etapas de fabricação da água mineral natural não devem produzir, desenvolver e/ou agregar substâncias físicas, químicas ou biológicas que coloquem em risco a saúde do consumidor e ou alterem a sua composição original, devendo ser obedecida a legislação vigente de Boas Práticas de Fabricação, devendo atender também aos Regulamentos Técnicos específicos de Características Macroscópicas e Microscópicas. De acordo com o Art. 3º, as águas envasadas não podem ser adicionadas de ingredientes, excetuando-se o dióxido de carbono e sais de grau alimentício, no caso da água adicionada de sais e da água do mar dessalinizada¹.

O mercado brasileiro de águas envasadas tem seguido em franca expansão, sendo o sétimo maior produtor do planeta, com crescimentos incrementais anualmente. Em 2021, em um levantamento feito pela Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerante e de Bebidas não Alcoólicas (ABIR), o volume de produção do mercado brasileiro de águas minerais foi de aproximadamente 13 bilhões de litros, uma variação de 4,7% em relação ao ano anterior. Já o consumo per capita do mercado brasileiro foi de 62 litros². Com um apelo cada vez mais forte relacionado a um estilo de vida saudável, o consumo desse produto tem crescido bastante, trazendo aliada consigo a ideia de que é um produto inócuo e livre de impurezas³.

Inúmeros trabalhos têm traçado o perfil microbiológico de águas minerais naturais e envasadas⁴⁻⁶, onde esses perfis muitas vezes estão fora dos parâmetros estabelecidos pela legislação em vigor, pela presença de coliformes totais, termotolerantes e até *Escherichia coli*. Apesar da regulamentação específica para a presença de matérias estranhas microscópicas em águas envasadas¹, é praticamente inexistente qualquer estudo relacionando à qualidade microscópica de águas minerais naturais envasadas.

As Resoluções da ANVISA, RDC nº 623/2022⁷ e RDC nº 717/2022¹, estabelecem disposições gerais relacionadas à presença de matérias estranhas macroscópicas e microscópicas, indicativas de riscos à saúde humana ou de falhas na aplicação das Boas Práticas na cadeia produtiva de alimentos e bebidas, fixando limites de tolerância, aplicados, inclusive, às águas envasadas. Para esses produtos, os que apresentarem matéria estranha indicativa de falhas das Boas Práticas, serão considerados em desacordo com o regulamento, com exceção da presença de até 5 ácaros mortos e 1,5% de areia (permitidos para alimentos em geral).

Existem matérias estranhas indicativas de falhas das Boas Práticas ou indicativas de riscos à saúde humana. Algumas matérias estranhas apresentam risco à saúde e podem causar lesões ao consumidor: objetos rígidos, pontiagudos e/ou cortantes, iguais ou maiores que 7 mm (medido na maior dimensão), fragmentos de osso ou de metal, lasca de madeira e plástico rígido; objetos rígidos, com diâmetros iguais ou maiores que 2 mm (medido na maior dimensão) como pedra, metal, dentes, fragmentos de vidro de qualquer tamanho ou formato. Outras matérias estranhas indicativas de riscos à saúde humana, por poderem carrear agentes patogênicos, incluem: insetos, tais como baratas,

formigas, moscas, bem como barbeiros, em qualquer fase de desenvolvimento, vivos ou mortos, inteiros ou em partes; roedores, inteiros ou em partes; outros animais, tais como morcego e pombo, inteiros ou em partes; excrementos de animais, parasitos: helmintos e protozoários, em qualquer fase de desenvolvimento, associados a agravos à saúde humana. São consideradas matérias estranhas indicativas de falhas das Boas Práticas: areia, terra, fungos filamentosos e leveduriformes que não sejam característicos dos produtos; artrópodes considerados próprios da cultura e do armazenamento; filmes plásticos e contaminações incidentais⁷.

Este trabalho objetivou averiguar a presença de matérias estranhas microscópicas presentes nesses produtos, sugerindo a utilização da Microscopia Eletrônica de Varredura, como técnica complementar, descrita a seguir, às técnicas preconizadas na RDC nº 623/2022⁷, para a detecção e contagem de matérias estranhas nessas amostras.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas oito (8) amostras de água mineral engarrafadas em embalagens de 500 mL, de distintas marcas, oriundas de comércio ambulante em semáforos ou em supermercados na cidade de Fortaleza-CE, com lacres fechados e não rompidos. Assim que coletadas, foram imediatamente levadas ao laboratório e divididas em igual volume, com auxílio de proveta, em frascos Erlenmeyer esterilizados de 250 mL.

Para cada amostra, subamostras de 100 mL foram filtradas em membranas de acetato de celulose com 0,45 µm de poro e 47 mm de diâmetro (Millipore®, EUA). Após a filtração das amostras, as membranas foram secas em estufa, a 50,0 + 2,0 °C, por um período de 24 horas. As membranas foram então, acondicionadas em placas de Petri, montadas em suporte de alumínio especialmente construído para esse fim e encaminhadas para o aparelho de cobertura metálica, da marca Emitech®, modelo K550, onde receberam um banho de platina para se tornarem condutoras de eletricidade e se tornarem aptas a serem visualizadas em microscópio eletrônico. A seguir, foram levadas ao microscópio eletrônico de varredura Zeiss® DSM 940A, da Embrapa Agroindústria Tropical, com uma voltagem de aceleração de 15 KV.

Para cada amostra, foram selecionados, aleatoriamente, dois subgrupos de 10 campos cada, medindo 145 µm de comprimento por 145 µm de largura, perfazendo uma área de 21.025 µm² ou 0,021025 mm², cada campo. Para cada um desses campos, foram contadas as partículas presentes na superfície da membrana.

A área total da membrana é de 1.734,94 mm². Considerando que 100 mL de água atravessaram homogeneamente uma área de 1.734,94 mm², então, cada porção da membrana de 0,021025 mm² filtrou um volume de 1,21 µL de água. Para cada subgrupo de 10 campos avaliados, o total de matérias estranhas refere-se a 12,1 µL de água que atravessou a membrana. Ao fim, para determinar o número de matérias estranhas em 100 mL de água, fez-se o seguinte cálculo:

$$\text{N}^\circ \text{ de matérias estranhas/100 mL (= 100.000 } \mu\text{L) } \text{água} = (M * 10) * 100.000/12,1$$

Onde M é a média do número de matérias estranhas por cada campo de 0,021025 mm².

Na análise estatística, considerou-se a amostragem estratificada, que consiste em dividir uma população em subgrupos, supondo-se que existe heterogeneidade entre as amostras e a homogeneidade dentro dos subgrupos. Realizaram-se análise de variância das amostras das águas e a aplicação do teste de Regwq⁸, a 5% de probabilidade, para a comparação das respectivas médias.

RESULTADOS

Todas as amostras apresentaram matérias estranhas, porém, em quantidades diferentes. As médias obtidas das contagens de matérias estranhas obedeceram a uma estratificação e a análise de variância revelou alta significância entre as amostras quanto à quantidade de matérias estranhas ou diferença entre os estratos, indicando que as amostras diferiram bastante entre si quanto a essa característica. A amostra 7 apresentou a maior quantidade de matérias estranhas, com 3,25 para cada campo visualizado e as outras amostras tiveram valores menores. O coeficiente de variação foi de 63% corroborando a grande variabilidade entre as amostras. Dentro dos subgrupos, porém, não houve diferença significativa nas contagens de matérias estranhas, e os valores das contagens se mantiveram constantes dentro de cada replicata por amostra, ratificando-se assim, a precisão da metodologia aqui apresentada. As médias obtidas foram estimadas com precisão, sugerindo-se que a subdivisão em 10 subgrupos de contagem e a extrapolação para o volume de 100 mL é uma estimativa confiável para a contagem de partículas filtradas nesse volume de água. A quantidade de matérias estranhas encontradas nas amostras indica que estão em desacordo com a legislação, principalmente nas amostras obtidas em semáforos (amostras 7, 4 e 3).

Algumas das matérias estranhas visualizadas em Microscopia Eletrônica de Varredura estão ilustradas nas **Figuras 1 e 2**, que mostram distintos campos de 145 µm de comprimento por 145 µm de largura, das membranas de filtração, onde se procederam as contagens de matérias estranhas. Observa-se uma ampla variedade de tipos de partículas encontradas, com diferentes tamanhos e formatos. A **Figura 1** apresenta alguns dos campos visualizados mostrando distintas partículas: esferas perfeitas, grãos esféricos, películas, crostas, entre outras, vistos com ótima resolução e contraste, podendo ter tido origem orgânica ou inorgânica. Na **Figura 1E**, um dos fragmentos possui aspecto semelhante a plástico, pela sua transparência. Porém, todas essas partículas não fazem parte da composição original da água e não deveriam estar presentes no seu meio. Para cobrir essa área de observação, foram escolhidos aumentos em torno de 500 vezes. Esse aumento foi escolhido em virtude de: 1) contemplar a faixa de aumento requerido pelas metodologias oficiais de análise de matérias estranhas em alimentos (AOAC⁹); 2) possuir um aumento suficiente para o observador visualizar as partículas contáveis não muito pequenas e com dimensões que as enquadre como matérias estranhas ao alimento.

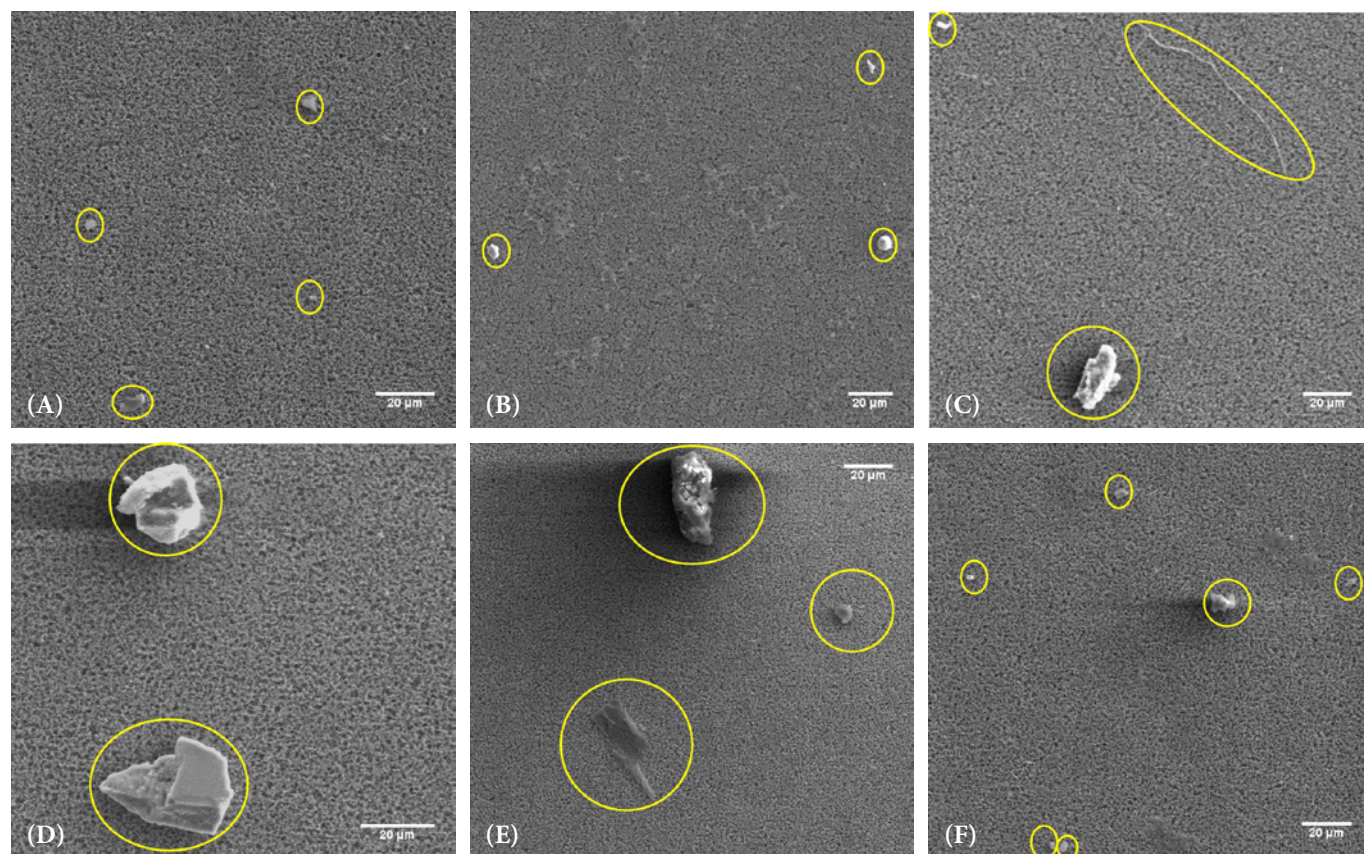


Figura 1. Imagens em MEV de alguns campos de 145 µm de comprimento x 145 µm de largura, das membranas de filtração, com detalhes das matérias estranhas retidas em diferentes tamanhos e formatos. (A – Amostra 1, B – Amostra 2, C – Amostra 3, D – Amostra 4, E – Amostra 5, F – Amostra 6) – Aumentos de 500x

Porém, para amostras tais como 3, 4 e 7, aumentos menores que 500x, como 200x (**Figura 2F**) e 300x (**Figura 2D**), foram suficientes para detecção de matérias estranhas. Na **Figura 2B**, feita em aumento de apenas 84 vezes, demonstra-se um campo de observação largo com várias matérias estranhas, de distintos tamanhos, inclusive com um fragmento não identificado bastante extenso, medindo quase 1 mm de comprimento. Em outra amostra (**Figura 2A**), com um aumento mínimo de 25 vezes, o campo de observação do MEV mostra dezenas de fragmentos, com variados tamanhos, filamentosos ou não, na superfície da membrana. Nas **Figuras 2C** e **2E**, veem-se estruturas filamentosas, com detalhe de filamento achatado, que sofreu dobramento (2C) e cilíndrico (2E). Na **Figura 2D**, visualiza-se fragmento filamentoso, com septos ao longo de sua extensão e a **Figura 2F** mostra a presença de distintas partículas. A amostra 8 apresentou fragmento bem distinto e incomum (**Figura 2G**).

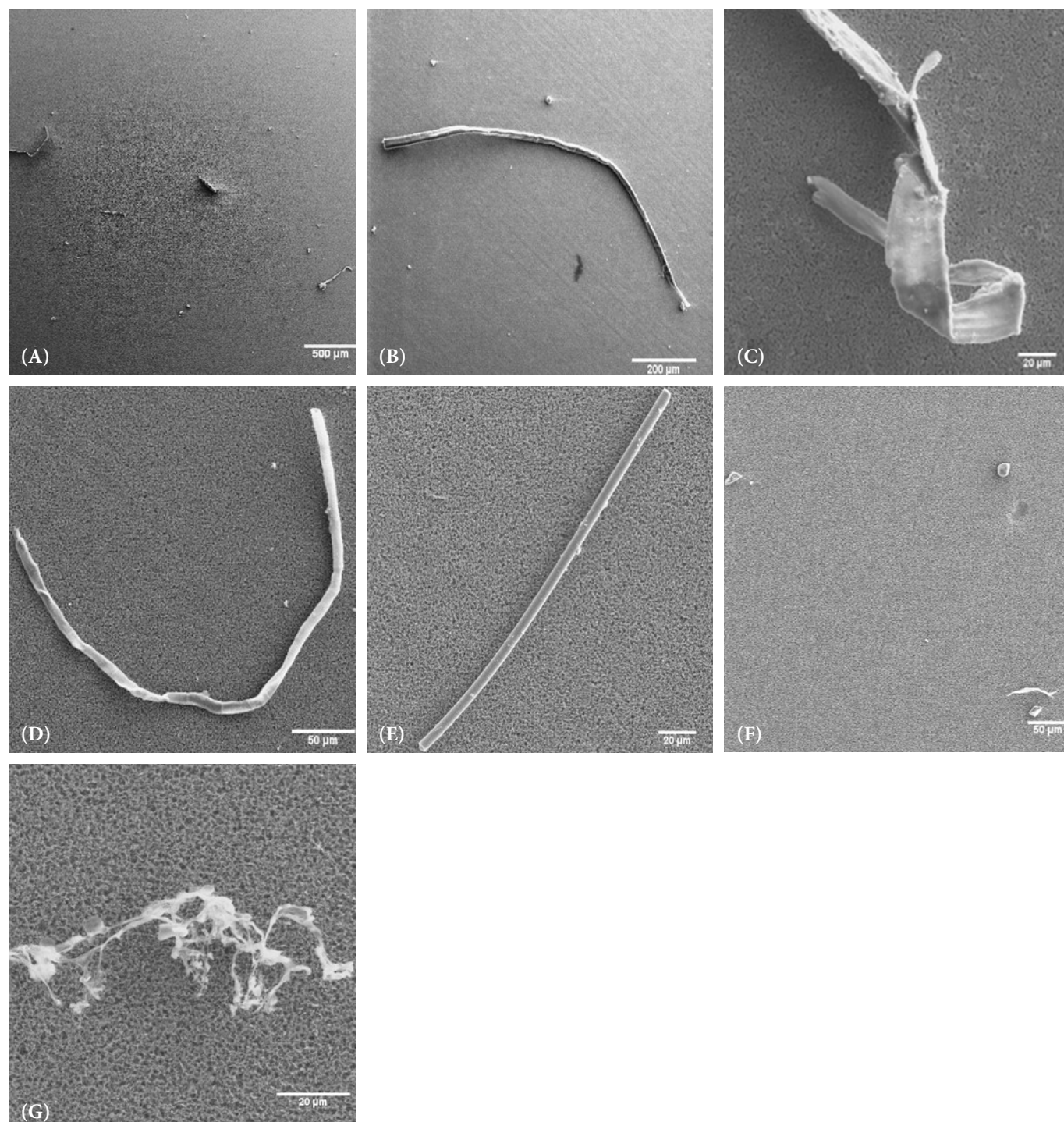


Figura 2. Matérias estranhas encontradas nas amostras de água analisadas. (A) Imagem em aumento de 25x, amostra 7. (B) Imagem em aumento de 84x, amostra 7. (C) Imagem em aumento de 500x, amostra 7. (D) Imagem em aumento de 300x, amostra 4. (E) Imagem em aumento de 500x, amostra 4. (F) Imagem em aumento de 200x, amostra 3. (G) Imagem em aumento de 900x, amostra 8

DISCUSSÃO

A literatura tem demonstrado a presença de contaminação microbiológica em muitas amostras de águas minerais ao longo dos anos¹⁰, relatando-se a incidência de contaminações por coliformes totais e termotolerantes, *Pseudomonas aeruginosa*, entre outros. No entanto, a detecção de matérias estranhas tem sido pouco relatada, como demonstrado no trabalho de Silva et al¹¹, que avaliaram a presença de matérias estranhas em água para consumo humano, onde 69% das amostras estavam em desacordo com a legislação vigente por conter resíduo vegetal, algas verdes, fungos filamentosos, matéria amorfa e protozoários de vida livre.

As matérias estranhas apresentadas na **Figura 1** possuem tamanhos e formatos distintos e indicam a ocorrência de falhas no processo de fabricação do produto. Fragmentos filamentosos, como os apresentados na **Figura 2 (A, B, C, D, E, F, G)**, indicam claramente falhas nas Boas Práticas de Fabricação do produto, podendo trazer riscos à saúde do consumidor. Especificamente na **Figura 2D**, a presença de septos ao longo da extensão do filamento, sugere fortemente uma possível origem biológica. O filamento cilíndrico mostrado na **Figura 2E** tem origem duvidosa, podendo ser orgânico ou inorgânico, e também apresenta extenso tamanho. Outra preocupação aqui colocada se refere à possível presença de microplásticos, definidos como quaisquer partículas plásticas sólidas insolúveis em água com dimensões entre 1 µm e 1.000 µm, dimensões compatíveis com as matérias estranhas aqui apontadas.

Montagner¹² relataram que os microplásticos exercem potenciais riscos aos seres humanos e podem ser vetores de transporte de outros contaminantes químicos ou biológicos. Sua ocorrência, portanto, em água envasada para consumo humano é inadmissível. De acordo com a Resolução RDC nº 717/2022¹, a tolerância para essas partículas é ausência total, não devendo conter contaminantes químicos, biológicos ou matérias estranhas que representem risco à saúde do consumidor. Assim, as matérias estranhas encontradas nesta investigação estão em desacordo com a legislação vigente.

Algumas vantagens de utilização do emprego do MEV como instrumento de contagem e observação das matérias microscópicas em águas minerais naturais envasadas podem ser listadas: 1) permite a observação de fragmentos grandes e pequenos; 2) para os fragmentos pequenos, aumentos maiores do que os permitidos pela microscopia óptica convencional como 2.500, 3.000 ou 5.000 vezes, permitem o exame minucioso da matéria estranha encontrada, provendo a chance de uma inferência sobre a origem da partícula encontrada; 3) a metalização realizada no preparo da membrana antes de ser levada ao MEV provê nítido contraste das partículas sobre o fundo 'cinza escuro' da membrana, pois aparecem mais claras e nitidamente observáveis e contáveis. No caso da observação em instrumentos comuns de óptica, algumas matérias estranhas claras e com baixa refração da luz, podem ser invisíveis ao observador, causando um 'falso' resultado; 4) o preparo da amostra é bastante rápido, devendo-se apenas filtrar a amostra em uma membrana, metalizá-la e levá-la para a visualização; e por último, 5) matérias estranhas transparentes e diáfanas, tais como microplásticos, difíceis de serem visualizadas em microscopia óptica, são facilmente detectadas em MEV. Esse método necessitaria, porém, de aprimoramento no que se refere à identificação e diagnóstico das estruturas visualizadas.

CONCLUSÃO

Foi mostrado que o microscópio eletrônico de varredura (MEV) apresentou-se como instrumento adequado para auxiliar na determinação, contagem e observação de matérias estranhas em amostras de

águas minerais naturais envasadas, estatisticamente confiável e capaz de detectar materiais opacos e também, transparentes e diáfanos. Seria um método em complementação aos métodos convencionais (filtração e leitura em microscópio estereoscópico e óptico), na identificação de matérias estranhas de difícil diagnóstico.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não existir conflitos de interesse.

FINANCIAMENTO

Não declarado pelos autores.

AGRADECIMENTOS

À Embrapa Agroindústria Tropical pela manutenção e calibração constantes e permanentes de seu microscópio eletrônico de varredura.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Todos os autores participaram da concepção, planejamento, análise e interpretação dos dados e aprovação da versão final do manuscrito.

NOTA DE APRESENTAÇÃO

Não declarado pelos autores.

REFERÊNCIAS

1. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 717, de 01 de julho de 2022. Dispõe sobre os requisitos sanitários das águas envasadas e do gelo para consumo humano. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 06 jul 2022. Seção 1(126):190-1.
2. Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerante e de Bebidas não Alcoólicas – ABIR. Águas minerais. Volume de produção do mercado brasileiro de águas minerais dos anos de 2010 a 2021. [acesso 2024 Abr 02]. Disponível em: <https://abir.org.br/o-setor/dados/aguas-minerais/>
3. Coletti GF. Mercado de bebidas no Brasil e no mundo. 193 p. Editora Senac São Paulo, 2022.
4. Castro LRS, Carvalho JS, Vale VLC. Avaliação microbiológica de diferentes marcas de água mineral. Rev B S Pública. 2010;34(4):835-44. <https://doi.org/10.22278/2318-2660.2010.v34.n4.a76>
5. Gomes TP, Santana JS, Carvalho LR. Avaliação microbiológica de água mineral comercializada no município de Itabuna-Bahia. Electronic Journal of Pharmacy. 2015;12(4):65-72. <https://doi.org/10.5216/ref.v12i4.36762>

6. Margalho GC, Castro CSCN, Costa GS, Miranda HB, Quemel GKC. Análises físico-químicas e microbiológicas da água mineral comercializada em galões de 20 litros na Cidade de Belém-Pará. Res, Soc Dev. 2021;10(14):e186101417294. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i14.17294>
7. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 623, de 9 de março de 2022. Dispõe sobre os limites de tolerância para matérias estranhas em alimentos, os princípios gerais para o seu estabelecimento e os métodos de análise para fins de avaliação de conformidade. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 16 mar 2022. Seção 1(51):119-21.
8. Omer SO. Use of REGWQ multiple comparisons of qualitative data. Journal of Mathematics and System Science. 2013;3:246-50. [acesso 2024 Jul 10]. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/313879992_Use_of_REGWQ_Multiple_Comparisons_of_Qualitative_Data
9. AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Method 945.75. Extraneous materials (foreign matter) in products. Official Methods of Analysis of AOAC International, Gaithersburg, USA. 2016.
10. Massago M, Leite RH, Conegero CI. Perfil das bactérias patogênicas nas águas minerais comercializadas no Brasil: um panorama de 2010 a 2019. Rev Bras Pesq Saúde. 2022;23(3):81-9. <https://doi.org/10.47456/rbps.v23i3.35797>
11. Silva AM, Nogueira MD, Marciano MAM, Mattos EC, Atui MB. Ocorrência de matérias estranhas em água para consumo humano. Resumos do IX Encontro do Instituto Adolfo Lutz – I Simpósio Internacional de Vigilância e Resposta Rápida. Rev Inst Adolfo Lutz. 2012;71(Suplemento 1). Disponível em: <https://periodicos.saude.sp.gov.br/RIAL/article/view/39443>
12. Montagner CC, Dias MA, Paiva EM, Vidal C. Microplásticos: ocorrência ambiental e desafios analíticos. Quim Nova. 2021;44(10):1328-52. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170791>

Integridade na pesquisa: ética profissional dos cientistas

O papel do Comitê de Integridade na Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz

Research integrity: professional ethics of scientists
The role of the Research Integrity Committee at the Adolfo Lutz Institute

Bráulio Caetano Machado , Márcia Jorge Castejon , Adriana Aparecida Buzzo Almodovar , Andrea Gobetti Coelho Bombonatte , Andréia Moreira dos Santos Carmo , Giselle Ibetete Silva López Lopes , Regina Maria Catarino 

Comitê de Integridade na Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz, Instituto Adolfo Lutz, Coordenadoria de Controle de Doenças, Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo, SP, Brasil.

*Autor de correspondência/Corresponding author: braulio.machado@ial.sp.gov.br

Recebido/Received: 25.07.2023

Aceito/Accepted: 29.02.2024

Publicação/Publication: 04.03.2024

Editor Chefe: Adriana Bugno

RESUMO

O Comitê de Integridade na Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz (CIPIAL), com o objetivo de promover a cultura da integridade científica como um dos valores fundamentais defendidos pela instituição nas suas atividades de pesquisa, considera relevante compartilhar com a comunidade científica a sua implantação, destacando o seu papel no gerenciamento deste tema na instituição. Após a publicação de seu regimento, de acordo com as suas competências primordiais, o CIPIAL elaborou e publicou o Código de Boas Práticas Científicas do IAL com o objetivo de definir as políticas de integridade para orientar os profissionais envolvidos com a pesquisa.

Palavras-chave. Revisão de Integridade Científica, Ética em Pesquisa, Pesquisadores, Má Conduta Científica.

ABSTRACT

The Research Integrity Committee of the Adolfo Lutz Institute (CIPIAL), with the aim of promoting the culture of scientific integrity as one of the fundamental values defended by the institution in its research activities, considers it relevant to share its implementation with the scientific community, highlighting its role in managing this issue at the institution. Following the publication of its rules and regulations, in accordance with its core competencies, CIPIAL drew up and published the IAL Code of Good Scientific Practice with the aim of defining integrity policies to guide professionals involved in research.

Keywords. Scientific Integrity Review, Research Ethics, Researchers, Scientific Misconduct.

A integridade na pesquisa é fundamental para manter a excelência científica bem como a confiança na ciência. Os cientistas ao realizarem suas atividades profissionais, além dos valores éticos universais como, por exemplo, a bioética, há aqueles especificamente científicos, relacionados com a finalidade própria de sua profissão, a construção da ciência como um patrimônio coletivo, sendo essa, parte da ética profissional que remete à expressão Integridade na Pesquisa. O compromisso de um cientista submete-o a deveres profissionais concernentes à qualidade científica dos resultados de seu trabalho de pesquisa, e esse trabalho individual apenas se efetiva como parte da construção coletiva da ciência¹.

A pesquisa diz respeito a todo trabalho original de investigação teórica ou experimental para a aquisição de novos conhecimentos. Baseia-se no trabalho da comunidade de pesquisadores e desenvolve-se independentemente de interesses ideológicos, econômicos ou políticos².

A divulgação de resultados de um trabalho científico tem repercussões importantes para a sociedade. Alguns deles podem afetar a saúde e o bem-estar dos indivíduos. Outros podem ser utilizados por formuladores de políticas públicas para decisões em assuntos diversos, ações de regulação, de mitigação de impactos negativos, entre outros. Mesmo que os resultados científicos não tenham aplicação imediata, contribuindo para ampliar a geração de conhecimentos, não são menores as responsabilidades dos cientistas envolvidos com o público³.

Para o cientista, a integridade compreende, acima de tudo, o compromisso do indivíduo com a honestidade intelectual e a responsabilidade pessoal. Para uma instituição, é o compromisso de criar um ambiente que promova condutas de responsabilidade e adote padrões de excelência, confiabilidade e legalidade, que possa avaliar se profissionais envolvidos com a pesquisa e administradores percebem a criação de um ambiente com altos níveis de integridade. Deste modo, as instituições de ensino e pesquisa têm o dever de promover e monitorar a conduta responsável na pesquisa. Sugere-se que as instituições criem instâncias encarregadas pela promoção da integridade em pesquisa por meio de desenvolvimento de programas e planos que incluam atividades educacionais, de treinamento e preventivas em relação às más condutas. Outra medida efetiva e importante é o estabelecimento de políticas e diretrizes institucionais para auxílio à comunidade científica que contribuam no monitoramento das condutas referentes à integridade em pesquisa^{4,5}.

Os aspectos concernentes à integridade devem ser objeto de autorregulação e autocontrole pela própria comunidade científica e não ser uma competência governamental ou designada a algum órgão externo, como enfatiza a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)⁶. Cabe aos cientistas formular os princípios e valores especificamente científicos que definem o conceito de integridade da pesquisa, definir critérios que permitam distinguir as boas e más condutas nas diferentes áreas da ciência, assim como aplicar esses critérios para a identificação, investigação e punição de más condutas¹.

Nas últimas décadas, universidades e instituições de ensino e pesquisa, sociedades científicas e autoridades nacionais desenvolveram leis, regulamentos, guias e procedimentos específicos para direcionar ações no combate às más condutas^{3,6-10}. Apesar desse avanço, há muito a ser feito, principalmente no que se refere ao desenvolvimento de instrumentos de prevenção, suporte e estabelecimento efetivo de sanções para coibir as más condutas científicas, como vemos no caso das instituições acadêmicas de nosso país¹¹⁻¹⁴.

Desde 2015, o Instituto Adolfo Lutz (IAL) iniciou as tratativas para a realização de estudo referente à temática de integridade científica. Tornou-se a primeira instituição no âmbito dos institutos de pesquisa do estado de São Paulo a tomar iniciativas efetivas para o aprofundamento no assunto.

Inicialmente, foi criado o Grupo de Estudo de Integridade na Pesquisa do IAL (GEPIAL), grupo de trabalho instituído pela Portaria Dg/Ial 25, de 26 de agosto de 2016¹⁵. Como resultado desse estudo, verificou-se a necessidade de se promover a cultura da integridade científica na pesquisa e no ensino, e a implantação de políticas de conduta responsável para fortalecer ainda mais as boas práticas científicas relacionadas à integridade ética na instituição. Constatou-se também a necessidade da criação de um órgão interno responsável por esse gerenciamento. Posteriormente, a direção geral da instituição, no uso de suas atribuições, criou em 2017, o Comitê de Integridade na Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz (CIPIAL) que, logo em seguida, publicou o Guia de Recomendações de Boas Práticas Científicas do IAL, elaborado pelo GEPIAL, dispendo sobre valores, princípios, orientações para a condução da pesquisa científica, comunicação de seus resultados e práticas responsáveis¹⁶. Ao CIPIAL compete: estabelecer, fortalecer e assegurar a manutenção de uma estrutura para a promoção da cultura de integridade ética da pesquisa; coordenar ações preventivas e educativas sobre a integridade ética na pesquisa; atuar como órgão consultivo, examinando situações onde haja dúvidas sobre integridade na pesquisa; coordenar as ações de recebimento de alegações e averiguação inicial e, se necessário, encaminhamento para investigação quanto às alegações de práticas de má conduta na instituição¹⁷.

Desde 2017, o CIPIAL tem promovido atividades educativas diversificadas para a comunidade científica com a realização de cursos, palestras, simpósios e divulgação de normativas institucionais sobre integridade em pesquisa.

Em 2021, o Comitê tornou público seu regimento¹⁸. Em 2022, foi reformulado e ampliado o número de membros¹⁹, tendo sido apresentado para a comunidade científica institucional, com a finalidade principal de promover a Cultura de Integridade Científica, como um dos valores fundamentais defendidos pela instituição nas suas atividades de pesquisa. Dentre as competências primordiais estabelecidas, uma delas foi a elaboração do Código de Boas Práticas Científicas do IAL com intuito de definir as políticas de integridade na pesquisa, para servir de norteador aos cientistas como base de apoio à instituição nos assuntos referentes a possíveis casos de má conduta. Em seguida, este documento foi instituído pela Portaria IAL – 19, de 11 de julho de 2023²⁰. Nesta normativa estão descritos os desvios de comportamentos inaceitáveis, como as más condutas graves, a falsificação, a fabricação e o plágio e também as práticas de pesquisa questionáveis como, por exemplo, atribuição de autoria a quem não contribuiu de forma intelectual ou prática significativa no trabalho, duplicação de publicação, conflito de interesse, entre outros²⁰. Posteriormente, o CIPIAL disponibilizou o documento Código de Boas Práticas Científicas do IAL no sítio eletrônico da instituição, com o objetivo de reforçar a adesão de seus profissionais às boas práticas na condução da pesquisa científica²¹.

O CIPIAL considera importante que o assunto seja divulgado, discutido e bem compreendido por todos. A participação dos cientistas em ações educativas planejadas e o conhecimento do Código de Boas Práticas Científicas do IAL poderá favorecer a integridade na pesquisa, fortalecendo a comunidade

acadêmica e científica, resultando em melhor qualidade de suas atividades de pesquisa e maior confiança da sociedade.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não existir conflitos de interesse.

FINANCIAMENTO

Não declarado pelos autores.

AGRADECIMENTO

À Direção Geral do Instituto Adolfo Lutz pelo apoio prestado ao Comitê de Integridade na Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Márcia Jorge Castejon: elaboração e aprovação da versão final do manuscrito. Bráulio Caetano Machado, Adriana Aparecida Buzzo Almodovar, Andrea Gobetti Coelho Bombonatte, Andreia Moreira dos Santos Carmo, Giselle Ibetta Silva López Lopes e Regina Maria Catarino: revisão crítica do conteúdo e aprovação da versão final do manuscrito.

REFERÊNCIAS

1. Santos LHL. Sobre a integridade ética da pesquisa. Cienc Cult. 2017;69(3):4-5. <https://dx.doi.org/10.21800/2317-66602017000300002>
2. All European Academies – ALLEA. The European code of conduct for research integrity. Berlin; 2017. [acesso 2023 Mai 10]. Disponível em: <https://allea.org/code-of-conduct/>
3. Academia Brasileira de Ciências – ABC. Rigor e integridade na condução da pesquisa científica. Guia de recomendações de práticas responsáveis. Rio de Janeiro; 2013. [acesso 2023 Mai 10]. Disponível em: <https://www.abc.org.br/IMG/pdf/doc-4559.pdf>
4. National Academies. Sciences Engineering Medicine. Integrity in scientific research: creating an environment that promotes responsible conduct. Washington; 2002.
5. Machado BC, Almodovar AAB, Vicentini AP, Catarino RM, Bugno A, Nogueira L et al. Implementação do Comitê de Integridade na Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz: Propostas para a promoção da cultura de integridade científica institucional. BEPA. 2022;218:1-24. <https://doi.org/10.57148/bepa.2022.v.19.37814>

6. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP. Código de boas práticas científicas. São Paulo; 2014. [acesso 2023 Mai 10]. Disponível em: https://fapesp.br/boaspraticas/2014/FAPESP-Codigo_de_Boas_Praticas_Cientificas.pdf
7. Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ. Diretrizes sobre integridade acadêmica. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro; 2015. [acesso 2024 Fev 21]. Disponível em: <http://pef.if.ufrj.br/regulamentos/DiretrizesIntegridadeAcademica-UFRJ-2015.pdf>
8. Universidade de São Paulo – USP. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Código de boas práticas do ICB/USP. São Paulo; 2016. [acesso 2024 Fev 21]. Disponível em: https://ww3.icb.usp.br/wp-content/uploads/2019/08/Cod_Boas_Praticas_Cientificas.pdf
9. Fundação Osvaldo Cruz – FIOCRUZ. Guia de integridade em pesquisa da Fiocruz. Rio de Janeiro; 2019. [acesso 2024 Fev 21]. Disponível em: https://ppghcs.coc.fiocruz.br/images/DocumentoseManuais/guia_de_integridade_em_pesquisa_da_fiocruz.pdf
10. Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS. Guia de integridade em pesquisa científica. Porto Alegre; 2020. [acesso 2024 Fev 21]. Disponível em: <https://www.ufrgs.br/propeq1/propeq/wp-content/uploads/2020/09/Guia-para-Integridade-em-Pesquisa-2020-UFRGS.pdf>
11. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq. Relatório da Comissão de Integridade de Pesquisa do CNPq. Brasília; 2011. [acesso 2024 Fev 21]. Disponível em: <https://www.gov.br/cnpq/pt-br/composicao/comissao-de-integridade/relatorio-comissao-integridade-do-cnpq.pdf>
12. Santos-D’Amorim K, Correia AEGC, Miranda MKFO, Santa-Cruz P. Reasons and implications of retracted articles in Brazil. Transinformação. 2021;33:e210001. <https://doi.org/10.1590/2318-0889202133e210001>
13. Stavale R, Pupovac V, Ferreira GI, Guilhem DB. Research integrity guidelines in the academic environment: The context of Brazilian institutions with retracted publications in health and life sciences. Front Res Metr Anal. 2022;7:991836. <https://doi.org/10.3389/frma.2022.991836>
14. Ventura M, Oliveira SC. Integrity and ethics in research and science publication. Cad Saúde Pública. 2022;38(1):e00283521. <https://doi.org/10.1590/0102-311X00283521>

15. São Paulo. Poder Executivo. Instituto Adolfo Lutz. Portaria Dg/Ial 25, de 26 de agosto de 2016. Grupo de Estudo de Integridade na Pesquisa do IAL. Diário Oficial do Estado. São Paulo, SP, 27 ago 2016. Seção 1;126(162):39.
16. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo – Brasil). Grupo de Estudo de Integridade na Pesquisa do IAL. Guia de recomendações de boas práticas científicas do Instituto Adolfo Lutz. São Paulo (SP): Instituto Adolfo Lutz; 2017. Disponível em:
<http://www.ial.sp.gov.br/ial/pesquisa/cipial-comite-de-integridade-na-pesquisa/grbpc-do-ial>
17. São Paulo. Poder Executivo. Instituto Adolfo Lutz. Portaria IAL – 16, de 31 de julho de 2017. Criação do Comitê de Integridade na Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz. Diário Oficial do Estado. São Paulo, SP, 01 ago 2017. Seção 1;127(143):27.
18. São Paulo. Poder Executivo. Instituto Adolfo Lutz. Portaria DG/IAL – 18, de 15 de outubro de 2021. Dispõe sobre o Regimento do Comitê de Integridade na Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz – CIPIAL. Diário Oficial do Estado. São Paulo, SP, 15 out 2021. Seção 1;131(198):41.
19. São Paulo. Poder Executivo. Instituto Adolfo Lutz. Portaria DG/IAL – 11, de 07 de abril de 2022. Dispõe sobre a composição do Comitê de Integridade na Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz – CIPIAL. Diário Oficial do Estado. São Paulo, SP, 08 abr 2022. Seção 1;132(72):35.
20. São Paulo. Poder Executivo. Instituto Adolfo Lutz. Portaria DG/IAL – 19, de 11 de julho de 2023. Institui a Política de Integridade na Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz. Diário Oficial do Estado. São Paulo, SP, 12 jul 2023. Seção 1;133(31):30.
21. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo – Brasil). Comitê de Integridade da Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz. Código de boas práticas científicas do Instituto Adolfo Lutz. São Paulo (SP): Instituto Adolfo Lutz; 2023. Disponível em:
http://www.ial.sp.gov.br/resources/editorinplace/ial/2023_8_17/codigo_de_boas_praticas_cientificas_do_ial_versao_final_2.pdf

Produção de anticorpos e citocinas em resposta ao SARS-CoV-2: comparação entre imunidade vacinal e híbrida

Antibody and cytokine production in response to SARS-CoV-2: vaccine versus hybrid immunity comparison

Júlia Bombini Faustini¹ , Ana Paula Campanelli² , Thais Fernanda de Campos Fraga da Silva³ , Vânia Nieto Brito de Souza^{1*} 

¹ Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, SP, Brasil.

² Departamento de Microbiologia e Imunologia, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, SP, Brasil.

³ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

* Autor de correspondência/Corresponding author: vbrito@ils.br

Recebido/Received: 19.12.2023

Aceito/Accepted: 25.03.2024

Publicação/Publication: 24.06.2024

Editor Chefe/Editor-in-chief: Adriana Bugno

RESUMO

A resposta imunológica pelo SARS-CoV-2 após protocolos vacinais e infecção natural é pouco compreendida. Comparando indivíduos vacinados com esquema heterólogo que receberam um reforço vacinal (imunidade vacinal) com aqueles que apresentaram episódio leve de COVID-19 (imunidade híbrida) no mesmo período, verificamos níveis semelhantes de anticorpos contra SARS-CoV-2. Em culturas de células mononucleares, o estímulo com o antígeno viral induziu produção de citocinas pró-inflamatórias nos dois grupos, entretanto, os níveis de IL-17 foram menores em indivíduos com imunidade vacinal. Nossos resultados sugerem que o reforço vacinal teve efeitos semelhantes à infecção natural pelo SARS-CoV-2 na resposta imunológica de indivíduos previamente vacinados.

Palavras-chave. SARS-CoV-2, COVID-19, Vacinas, Resposta Imune, Anticorpos.

ABSTRACT

The immune response generated by SARS-CoV-2 vaccination protocols and natural infection remains incompletely understood. We compared individuals who received a heterologous vaccination scheme with a booster shot (vaccine immunity) to those who experienced a mild COVID-19 episode (hybrid immunity) during the same timeframe. Our findings revealed similar levels of SARS-CoV-2 antibodies in both groups. Stimulation by viral antigen in mononuclear cell cultures induced pro-inflammatory cytokines in both groups, while individuals with vaccine immunity exhibited lower IL-17. These results suggest that a vaccine booster can induce an immune response in previously vaccinated individuals comparable to that elicited by natural SARS-CoV-2 infection.

Keywords. SARS-CoV-2, COVID-19, Vaccines, Immune Response, Antibodies.

A COVID-19 permanece um problema sanitário atual, sendo a vacinação uma importante ferramenta profilática para mitigar os impactos dessa doença. Apesar da aplicação de vacinas desencadear a produção de uma resposta imune específica com papel protetivo, foi notado que a aplicação de uma única dose vacinal não sustenta essa imunidade ativa por longos períodos, havendo diminuição dos níveis plasmáticos de anticorpos após poucos meses¹. Assim, são necessárias doses de reforço para manter uma resposta imune eficiente por períodos maiores. Com o desenvolvimento de diferentes vacinas, diversos protocolos heterólogos foram aplicados a fim de gerar respostas imunológicas mais eficazes¹. Nesse cenário, foi amplamente questionada a eficácia das vacinas e dos protocolos vacinais diante da proteção gerada pela infecção natural².

Dessa maneira, investigamos a resposta imune celular e humoral específica de trabalhadores da saúde previamente submetidos a esquema vacinal heterólogo, comparando o efeito da infecção natural pelo SARS-CoV-2 após o esquema vacinal com uma dose de reforço com a vacina da Janssen.

Foram avaliados profissionais da área de saúde do sexo feminino (n = 24) imunizadas com esquema vacinal heterólogo contra o SARS-CoV-2 composto por três doses de vacina, sendo as duas primeiras doses de CoronaVac (Sinovac Biotech/Butantan), com um intervalo de 21 dias entre elas, e a terceira dose de BNT162b2 (Comirnaty, Pfizer-BioNTech), 180 dias após a primeira dose da CoronaVac. As participantes foram divididas em dois grupos: Imunidade Híbrida (IH; n = 9) e Imunidade Vacinal (IV; n = 15). O grupo IH apresentou um único episódio de COVID-19 com sintomas leves, sem necessidade de internação, num período entre 30 e 60 dias antes do estudo. O grupo IV recebeu, nesse mesmo período, uma dose de reforço com a vacina Ad26.COV2.S (Janssen, Johnson & Johnson) e nunca teve confirmada infecção pelo SARS-CoV-2 até o momento do estudo.

A pesquisa de IgG anti-Spike do SARS-CoV-2 foi feita por ELISA empregando-se um kit comercial (EI2606-9601G, Euroimmun, Lübeck, Germany), de acordo com as instruções do fabricante. Para a avaliação da resposta imune celular foram feitas culturas de células mononucleares do sangue periférico (PBMC – Peripheral blood mononuclear cell) estimuladas com a cepa selvagem de SARS-CoV-2 (Genbankaccess MT126808.1) inativada por radiação ultravioleta. As células mononucleares foram isoladas em gradiente de densidade empregando-se Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA). O número de células foi determinado através do método de exclusão com azul de Tripán em câmara hemocitométrica de Neubauer e as células foram distribuídas em placas de 96 poços, na densidade de 1×10^5 células/poço. As culturas foram realizadas em meio RPMI 1640 (Gibco, Life Technologies, New York, NY, USA) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco), 1 mM penicilina-estreptomicina (Gibco), 2 nM de L-glutamina, 1 mM de aminoácidos não essenciais e mantidas em estufa incubadora a 37 °C com 5% de CO₂ por 24 horas. Foram gerados 8 poços de cultura por paciente, divididos em culturas controles não estimuladas e culturas estimuladas com SARS-CoV-2 inativado na multiplicidade de infecção 10:1 (vírus:célula). Os níveis de interleucina (IL)-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-17, Interferon-gama (IFN- γ) e Fator de necrose tumoral (TNF) foram avaliados no sobrenadante das culturas empregando-se o ensaio multiplex CBA (Cytometric Bead Array, BD Biosciences) de acordo com as instruções do fabricante.

Para a análise de dados, a comparação dos resultados entre diferentes grupos foi feita pelo teste de Mann Whitney, e a comparação entre as variáveis no mesmo grupo foi feita pelo teste de Wilcoxon, após a exclusão dos outliers pelo método ROUT. Todas as análises foram realizadas pelo programa estatístico GraphPad Prism versão 9.0.0 (2020). O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Lauro de Souza Lima (Número do Parecer: 5.485.067) de acordo com as normas preconizadas pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), e seguiu os padrões exigidos pela Resolução 466/2012 do Ministério da Saúde – Conselho Nacional da Saúde. Consentimento informado, livre e esclarecido foi obtido de todos os participantes do estudo.

A média de idade do grupo IH foi de 51,4 anos enquanto no grupo IV a média foi de 50,1 anos. Os níveis de anticorpos foram semelhantes entre os grupos, não havendo diferença significante entre os

indivíduos que foram naturalmente infectados pelo SARS-CoV-2 (IH) e aqueles que receberam a dose de reforço vacinal (IV) (**Figura A**). Quanto à produção de citocinas (**Figura B**), observamos que nas culturas estimuladas com SARS-CoV-2, houve maior produção de citocinas pró-inflamatórias TNF e IL-6 em ambos os grupos em comparação com as culturas não estimuladas, sem diferenças significantes entre os grupos. Os níveis de IL-17 foram maiores no grupo IH tanto nas culturas não estimuladas quanto naquelas estimuladas com o SARS-CoV-2 em comparação ao grupo IV. Em relação a IL-10, verificamos menor produção nas culturas estimuladas pelo SARS-CoV-2 do grupo IH, enquanto no grupo IV não houve diferença significativa entre culturas estimuladas e não estimuladas. A produção de IL-1 β foi significativamente maior nas culturas estimuladas com o vírus apenas no grupo IV. Os níveis de IL-2, IL-4, IL-5, IL-9, IL-12p70 e IFN- γ foram baixos ou indetectáveis.

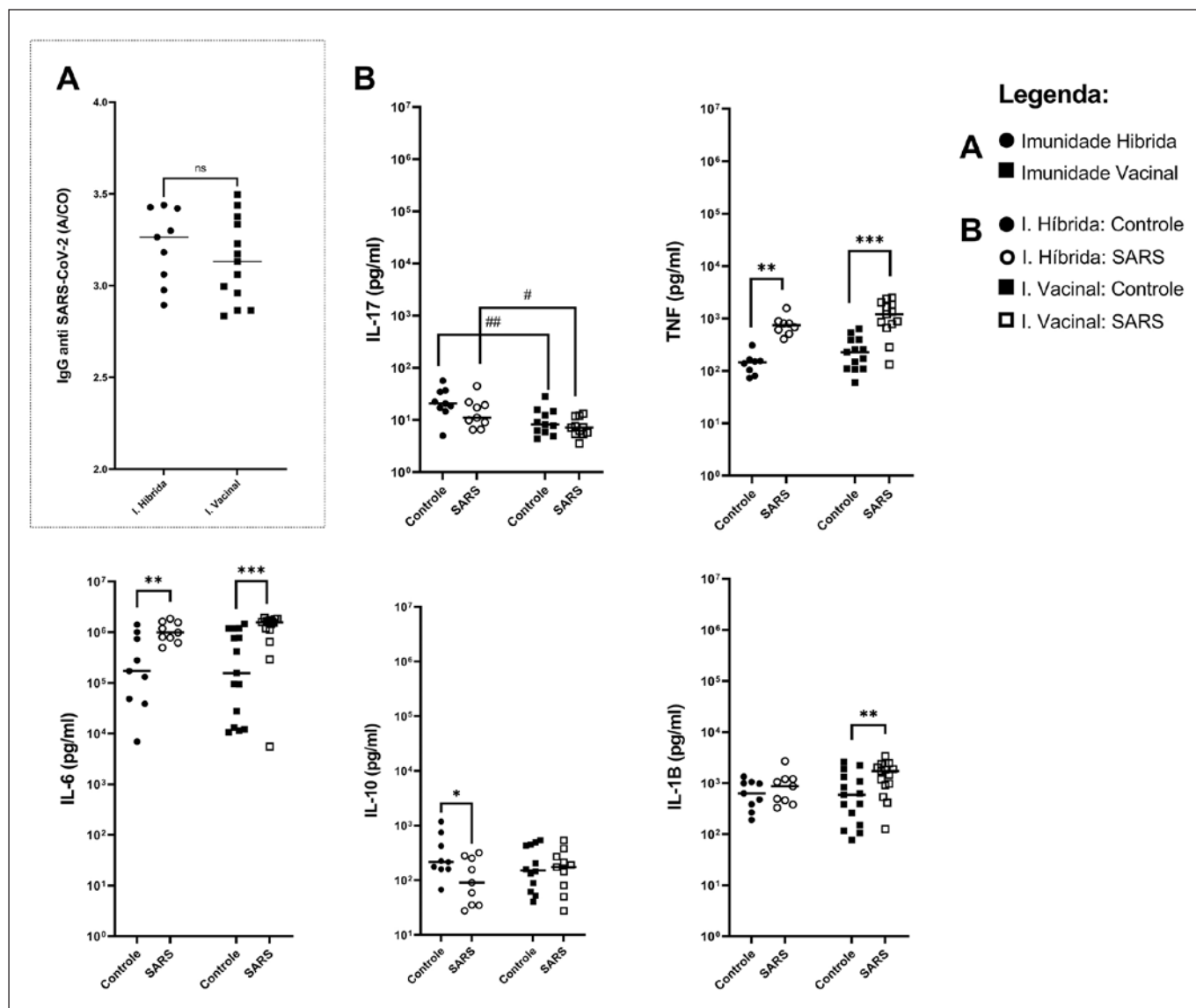


Figura. (A): Detecção por ELISA de anticorpos (IgG) contra a proteína S (*Spike*) do SARS-CoV-2 em amostras de soro. Os valores apresentados representam a razão entre a absorbância na amostra (A) de cada paciente e o *cut-off* (CO) fornecido pelo fabricante do ensaio; (B): Níveis de citocinas em culturas de células monoclulares de sangue periférico estimuladas com SARS-CoV-2 (SARS) inativado ou mantidas sem estímulo (Controle). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$. Teste de Wilcoxon para amostras pareadas (*); Teste de Mann-Whitney (#)

O entendimento da fisiopatogenia da COVID-19 e de ferramentas que diminuem a transmissão e gravidade do quadro clínico é de suma importância para o manejo dessa doença. Nesse sentido, as vacinas foram implementadas como ferramenta para redução da transmissão e dos danos causados pela doença³.

No presente estudo, verificamos que os indivíduos previamente vacinados que receberam uma dose de reforço apresentaram resposta semelhante aos indivíduos vacinados que foram naturalmente infectados pelo coronavírus no mesmo período. Ambos os grupos apresentaram níveis semelhantes de anticorpos IgG contra a proteína *Spike* do SARS-CoV-2. De maneira similar, Vespa et al² observaram que indivíduos naturalmente infectados pelo coronavírus tinham níveis de anticorpos semelhantes aos observados em indivíduos que receberam a vacina baseada em vetor viral (Ad26.COV2.S, Janssen), cerca de 30 dias depois do estímulo. Resultados semelhantes foram relatados por Rossi et al⁴, ao comparar os níveis de anticorpos entre indivíduos naturalmente infectados e aqueles vacinados com outra vacina empregando vetor viral (AZD1222, Astrazeneca), enquanto as vacinas baseadas em mRNA induziram níveis mais elevados de anticorpos².

Embora todos os participantes tenham recebido imunização prévia com vírus inativado (Coronovac) e reforço com vacina baseada em mRNA (BNT162b2; Pfizer-BioNTech), os níveis de anticorpos produzidos frente a esta última caem drasticamente após 6 meses de imunização⁵. Assim, acreditamos que os dados apresentados reflitam o último estímulo recebido: infecção natural ou reforço adicional com vacina de vetor viral.

Além da resposta imune humoral representada pela produção de anticorpos, o conjunto de citocinas produzido em resposta ao SARS-CoV-2 apresenta grande relevância para o desfecho da infecção. Nossos resultados demonstraram que o perfil de citocinas pro-inflamatórias (TNF e IL-6) induzido em culturas de PBMC estimuladas com o coronavírus inativado, foi semelhante entre indivíduos que receberam o reforço vacinal e aqueles que tiveram a infecção pelo SARS-CoV-2. No entanto, observamos aumento de IL-1 β apenas no grupo que recebeu o reforço vacinal (IV). Olajide et al⁶ também verificaram produção elevada de TNF, IL-6, IL-1 β e IL-8 em culturas PBMCs de indivíduos saudáveis não vacinados estimuladas com antígenos do SARS-CoV-2. No mesmo sentido, Vespa et al² relataram níveis semelhantes de linfócitos T CD4⁺ produzindo TNF entre indivíduos naturalmente infectados pelo coronavírus e aqueles imunizados com a vacina, baseada em vetor viral (Ad26.COV2.S, Janssen).

A IL-17 é uma citocina pró-inflamatória considerada um marcador da gravidade da doença, pois contribui de maneira ativa para a gravidade do quadro inflamatório⁷. Nossos dados, entretanto, não apontam níveis elevados desta citocina nas culturas estimuladas com o SARS-CoV-2, fato que pode estar relacionado ao modelo empregado, incluindo o antígeno usado (vírus inativado) e o curto período de incubação (24 horas). Vale ressaltar, entretanto, que essa citocina foi a única que apresentou níveis maiores no grupo IH, sugerindo que a infecção natural pelo vírus pode estimular sua produção, fato que não ocorreria na IV e poderia contribuir na proteção contra danos inflamatórios.

Com um papel regulador, a IL-10 confere proteção frente a quadros inflamatórios. No contexto do COVID-19, esta citocina é encontrada em níveis aumentados em conjunto com outras citocinas inflamatórias como a IL-4, IL-7, IL-18, IFN- γ e TNF⁸. A menor produção desta citocina nas culturas do grupo IH estimuladas com antígenos do SARS-CoV-2 sugere que a resposta ao vírus é mediada principalmente por citocinas pró-inflamatórias, e a produção da IL-10 pode até ser inibida. No grupo IV, por outro lado, não houve inibição da produção desta citocina, sugerindo um melhor prognóstico para estes indivíduos.

Em conjunto, os dados obtidos no presente estudo apontam semelhança nas respostas imunes mediadas por anticorpos e citocinas entre os grupos IV e IH, sugerindo que a aplicação de doses de reforço aos esquemas vacinais heterólogos é capaz de mimetizar a proteção conferida pela infecção natural em indivíduos vacinados.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não existir conflitos de interesse.

FINANCIAMENTO

Não declarado pelos autores.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem Andressa de Deus Souza, Rejane Rojas Lozano Cortezini e Marcia Regina Garcia Miras Bosco, pelo suporte laboratorial ao projeto.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Júlia Bombini Faustini: convite aos participantes do estudo, execução das análises laboratoriais, interpretação de resultados, preparo do manuscrito. Ana Paula Campanelli e Thais Fernanda de Campos Fraga da Silva: concepção do estudo, execução das análises laboratoriais, interpretação de resultados, revisão do manuscrito. Vânia Nieto Brito de Souza: concepção do estudo, supervisão das análises laboratoriais, interpretação de resultados, revisão crítica do manuscrito. Todos os autores aprovaram a versão final do manuscrito.

NOTA DE APRESENTAÇÃO

Os resultados deste manuscrito integram o Trabalho de Conclusão do curso de Pós-Graduação de Júlia Bombini Faustini, intitulado “Resposta imune celular e humoral contra o SARS-CoV-2: comparação entre imunidade vacinal e mista”, apresentado no ano de 2022, no Instituto Lauro de Souza Lima/Bauru através do Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS (CEFOR).

REFERÊNCIAS

1. Fiolet H, Kherabi Y, MacDonald CJ, Ghosn J, Peiffer-Smadja N. Comparing COVID-19 vaccines for their characteristics, efficacy and effectiveness against SARS-CoV-2 and variants of concern: a narrative review. *Clinical Microbiology and Infection*. 2022;28(2):202-221.
<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.10.005>
2. Vespa S, Simeone P, Catitti G, Buca D, Bellis D, Pierdomenico L et al. SARS-CoV-2 and immunity: natural infection compared with vaccination. *Int J Mol Sci*. 2022;23:8982.
<https://doi.org/10.3390/ijms23168982>

3. Hodgson SH, Mansatta K, Mallett G, Harris V, Emary KRW, Pollard AJ. What defines an efficacious COVID-19 vaccine? A review of the challenges assessing the clinical efficacy of vaccines against SARS-CoV-2. *Lancet Infect Dis*. 2021;21(2):e26-e35.
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30773-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30773-8)
4. Rossi C, Lanuti P, Cicalini I, Bellis D, Pierdomenico L, Boccio P et al. BNT162b2 mRNA vaccination leads to long-term protection from COVID-19 disease. *Vaccines*. 2021;9:1164.
<https://doi.org/10.3390/vaccines9101164>
5. Levin EG, Lustig Y, Cohen C, Fluss R, Indenbaum V, Amit S et al. Waning immune humoral response to BNT162b2 Covid-19 vaccine over 6 months. *N Engl J Med*. 2021;385(24):e84.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa2114583>
6. Olajide OA, Iwuanyanwu VU, Adegbola OD, Al-Hindawi AA. SARS-CoV-2 spike glycoprotein S1 induces neuroinflammation in BV-2 microglia. *Mol Neurobiol*. 2022;59(1):445-58.
<https://doi.org/10.1007/s12035-021-02593-6>
7. Wu X, Xia T, Shin WJ, Yu KM, Jung W, Herrmann A et al. Viral mimicry of Interleukin-17A by SARS-CoV-2 ORF8. *mBio*. 2022;13(2):e00402-22.
<https://doi.org/10.1128/mbio.00402-22>
8. Udomsinprasert W, Jittikoon J, Sangroongruangsri S, Chaikledkaew U. Circulating levels of Interleukin-6 and Interleukin-10, but not tumor necrosis factor-alpha, as potential biomarkers of severity and mortality for COVID-19: systematic review with meta-Analysis. *J Clin Immunol*. 2020;41:11-22.
<https://doi.org/10.1007/s10875-020-00899-z>



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 conseqüente elevação do nível científico dos artigos publicados ao longo de 2024.

- **Adele Caterino de Araújo** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Imunologia. São Paulo, SP
- **Aline Tiecher** Universidade Federal do Pampa. Itaqui, RS
- **Andrezza da Silva Ramos** Universidade Federal do Amazonas. Manaus, AM
- **Carlos Alexandre Marques** Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro. Nilópolis, RJ
- **Carlos Roberto Prudêncio** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Imunologia. São Paulo, SP
- **Cássia Aldrin de Mello** Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Agronomia, Medicina Veterinária e Zootecnia. Cuiabá, MT
- **Denise Hage Russo** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Alimentos, Laboratório de Biologia Molecular Imunoensaio em Alimentos. São Paulo, SP
- **Expedito José de Albuquerque Luna** Universidade de São Paulo, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. São Paulo, SP
- **Flávia Garcez da Silva** Universidade Federal do Oeste do Pará, Instituto de Saúde Coletiva. Santarém, PA
- **Heitor Franco de Andrade Jr** Universidade de São Paulo, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. São Paulo, SP
- **Helena Hilomi Taniguchi** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Parasitologia e Micologia, Núcleo de Parasitoses Sistêmicas. São Paulo, SP
- **José Eduardo Tolezano** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Parasitologia e Micologia. São Paulo, SP
- **Laís Fernanda de Pauli Yamada** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Alimentos, Núcleo de Morfologia e Microscopia. São Paulo, SP
- **Luciléia Granhen Tavares Colares** Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Departamento de Nutrição e Dietética, Laboratório de Pesquisa e Extensão em Sustentabilidade na Produção de Refeições. Rio de Janeiro, RJ
- **Márcia Nogueira Dimov** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Alimentos, Núcleo de Morfologia e Microscopia. São Paulo, SP
- **Marina Ishii** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Laboratório de Microbiologia Aplicada. São Paulo, SP
- **Natalia do Couto Abreu** Universidade Federal do Pará. Belém, PA
- **Regina Maria Catarino** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Patologia, Núcleo de Hematologia e Bioquímica. São Paulo, SP



- **Victor Eduardo Arrúa Arias** Centro de Referência da Saúde da Mulher, Hospital Pérola Byington, Núcleo de Patologia. São Paulo, SP
- **Yolanda Eugenia Alamo Gabrine Boza** Instituto Agrônomo de Campinas, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Ecofisiologia e Biofísica. Campinas, 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 diagramação

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

