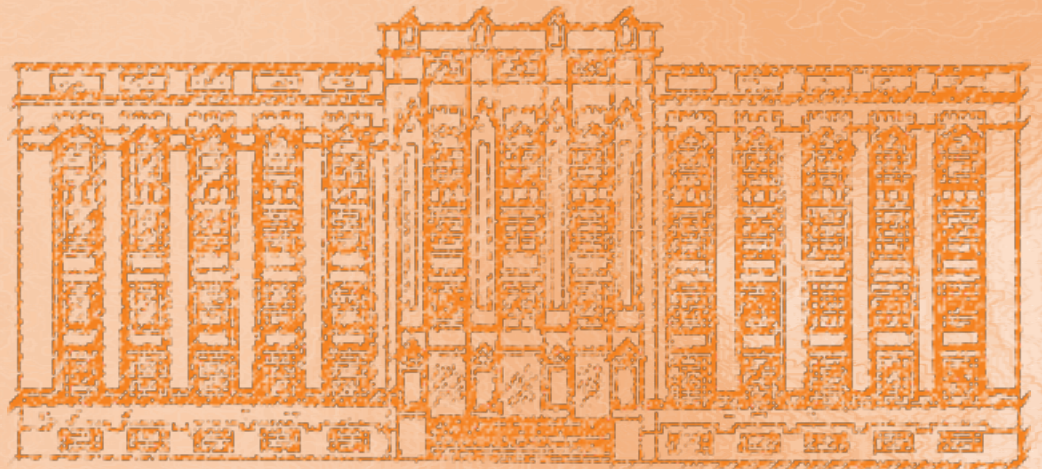


ISSN: 1983-3814 (*on-line*)  
RIALA6

# REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ



**Volume 78 número único, 2019**







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

# REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Volume 78, 2019

---





## Diretor Geral do Instituto Adolfo Lutz

Hélio Hehl Caiaffa Filho

### Editores Assistentes

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

### Editor Chefe

Pedro Luiz Silva Pinto

### Editor Adjunto

Adriana Bugno

### Núcleo de Acervo

Rocely Aparecida Bueno Moita

### Editores/Diagramação

Irony Therezinha Pires

---

## Conselho Editorial / Editorial Board

Adele Caterino-de-Araújo, São Paulo, Brasil.  
Alexandre Januário da Silva, Atlanta, EUA  
Antonio Ruffino Netto, Ribeirão Preto, Brasil.  
Bernadette Dora G. de Melo Franco, São Paulo, Brasil.  
Delia Rodrigues Amaya, Campinas, Brasil.  
Elizabeth de Souza Nascimento, São Paulo, Brasil.  
Elizabeth Castañeda, Bogotá, Colômbia.  
Eliseu Alves Waldman, São Paulo, Brasil.  
Fernando C. Schmitt, Porto, Portugal.  
Gordon S. Shephard, Cape Town, África do Sul.  
Guilherme Prado, Belo Horizonte, Brasil.  
Hans P. van Egmond, Bilthoven, Holanda.  
Heitor Franco de Andrade Junior, São Paulo, Brasil.  
John Gilbert, York, UK.  
Juan Carlos Palomino, Antuérpia, Bélgica.  
Lígia Bicudo de Almeida Muradian, São Paulo, Brasil.

Luz Elena Cano Restrepo, Medellín, Colômbia.  
Maria José Mendes Gianini, Araraquara, Brasil.  
Marluce Bibbo, Pennsylvania, EUA.  
Martin Emilio Munk, Copenhagen, Dinamarca.  
Myrna Sabino, São Paulo, Brasil.  
Paul W. Flinn, Kansas, EUA.  
Pedro Paulo Chieffi, São Paulo, Brasil.  
Regina Maura Bueno Franco, Campinas, Brasil.  
Susana Córdoba, Buenos Aires, Argentina.  
Terezinha de Jesus Andreoli Pinto, São Paulo, Brasil.  
Thales de Brito, São Paulo, Brasil.  
Vanessa Yardley, London, UK.  
Venâncio Avancini Ferreira Alves, São Paulo, Brasil.  
Vera Akiko Maihara, São Paulo, Brasil.  
Vera Lucia Garcia Calich, São Paulo, Brasil.

---

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ  
(Secretaria de Estado da Saúde)  
São Paulo, SP – Brasil

1941  
2019, 78

CDD<sub>18</sub> 614.07205

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

(\*) ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE BIBLIOTECÁRIOS. Grupo de Bibliotecários Biomédicos.

Normas para catalogação de publicações seriadas especializadas, São Paulo, Ed. Polígono, 1072.

Os artigos publicados na Revista do Instituto Adolfo Lutz são indexados por: Abstracts on Hygiene and Communicable Diseases; Analytical Abstracts; Bibliografia Brasileira de Medicina Veterinária e Zootécnica; Biological Abstracts; Chemical Abstracts; Food Science and Technology Abstracts; Index Medicus Latino-americano; LILACS, SP: Saúde Pública; Microbiology Abstracts; Sumários Correntes Brasileiros; Toxicology Abstracts; Tropical Diseases Bulletin; e Virology Abstracts.

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

<http://www.ial.sp.gov.br/>

Portal de Revistas em Veterinária e Zootecnia

<http://revistas.bvs-vet.org.br/>

Portal de Revistas Saúde SP

<http://periodicos.ses.sp.bvs.br/>

Cartas ao editor:

Endereço / Address

Núcleo de Acervo

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

Tel/ Fax. + 55 11 3068-2869

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



## ■ ARTIGO DE REVISÃO/ REVIEW ARTICLE

- 1779 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos: uma revisão sobre metodologias de análise e níveis de contaminação em produtos cárneos defumados**  
Polycyclic aromatic hydrocarbons: a review on the methodologies of the analysis and the levels of contamination in smoked meat products  
Letícia de Queiroz MOZANER, Adriana Palma de ALMEIDA, Simone Alves da SILVA

## ■ ARTIGO ORIGINAL/ORIGINAL ARTICLE

- 1765 Concentrações de nitrato em águas de abastecimento público de 88 municípios da Rede Regional de Atenção à Saúde 13 do estado de São Paulo, Brasil**  
Concentrations of nitrate in the public water supply of 88 municipalities of the Regional Health Care Network 13 of the São Paulo State, Brazil  
Sergio DOVIDAUSKAS, Isaura Akemi OKADA, Maria Helena IHA, Álvaro Gennari CAVALLINI
- 1768 Padronização de teste para quantificar anticorpos anti-poliiovírus utilizando vírus vacinal**  
Standardization of a test for quantifying the antibodies against poliovirus using the vaccine virus  
Elaine dos Santos LIMA, Maria Isabel de MORAES-PINTO, Roberta Morozetti BLANCO, Celso Francisco Hernandez GRANATO, Eliete Caló ROMERO
- 1769 Eficiência da pasteurização lenta do leite de cabra em diferentes binômios tempo/temperatura**  
Efficiency of slow pasteurization of goat milk in the different time/temperature binomials  
Quelson Prestes COSTA, Bruna Samara dos Santos REKOWSKY, Marion Pereira COSTA, Nelson de Carvalho DELFINO
- 1770 Perfil sorológico dos pacientes com suspeita clínica de paracoccidiodomicose avaliados pelo Instituto Adolfo Lutz no ano de 2016**  
Serological profile of patients with clinical suspicion of paracoccidiodomycosis evaluated by Instituto Adolfo Lutz in 2016  
Camila Mika KAMIKAWA, Karolina Rosa Fernandes BERALDO, Lúcia Cupertino BARRETO, Mayra Simioni ZAPAROLI, Adriana Pardini VICENTINI
- 1775 Environmental risk factors of leishmaniasis in Bahia State, Brazil using NASA earth observation satellites**  
Fatores de risco ambientais para leishmanioses no estado da Bahia, Brasil, utilizando satélites da NASA de observação da terra  
Moara de Santana Martins RODGERS, Maria Emilia BAVIA, Bernard Eichold II, Claire SHIPMAN, Nathan OWEN, Hunter WINSTANLEY, Margaret GORDON, Marine KARAPETYAN, Marta Mariana Nascimento SILVA, Deborah Daniela Madureira Trabuco CARNEIRO, Luciana Lobato CARDIM, Elivelton da Silva FONSECA, John Brooks MALONE

- 
- 1777 Sobrevivência e desenvolvimento de *Pseudomonas aeruginosa* em água mineral experimentalmente contaminada**  
Survival and growth of *Pseudomonas aeruginosa* in the experimentally contaminated mineral water  
Ana Paula de SOUZA, Ruth Estela Gravato ROWLANDS, Cecília Gerales MARTINS, Ana Paula Ramalho de PAULA, Christiane Asturiano RISTORI
- 1778 Prospecção fitoquímica de cruá vermelho (*Sicana odorifera* Naudin) e atividade antioxidante do fruto**  
Phytochemical prospection of cruá vermelho (*Sicana odorifera* Naudin) and antioxidant activity of fruit  
Victor Maximiliano Reis TEBALDI, Yuri Heinrich Silva de SOUZA, Edilberto Oliveira de ALMEIDA, Jonathan Neves de Carvalho ALVES, Alexandre Miranda de SOUZA, Kamila de Oliveira NASCIMENTO
- 1780 Avaliação antifúngica de uma solução à base de glucoprotamina e do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* em leveduras de ambiente hospitalar**  
Antifungal action of a solution based on the glucoprotamine and the essential oil from *Cymbopogon citratus* on the yeasts from the hospital environment  
Carolina Lambrecht GONÇALVES, Cristina Hallal de FREITAS, Pedro Rassier dos SANTOS, Evandro Carlos PEREIRA, Camila LOPES, Ivandra SANTIN, Rogério Antônio FREITAG, Patrícia da Silva NASCENTE
- 1781 Fatores de risco para doenças cardiovasculares e ingestão dietética por mulheres climatéricas não usuárias de Terapia de Reposição Hormonal (TRH)**  
Risk factors for cardiovascular diseases and dietary intake by climateric women not users of Hormone Replacement Therapy (TRH)  
Bruna Aparecida Ribeiro REL, Caroline de Maman OLDRA, Maiara FRIGO, Eloá Angélica KOEHNLEIN

#### ■ COMUNICAÇÃO BREVE/ BRIEF COMMUNICATION

- 1766 Avaliação das reações de Hemaglutinação Indireta (HI) e Aglutinação Modificada (MAT) na detecção de anticorpos *T. gondii* em exsudatos cárneos bovinos**  
Evaluation of indirect Hemagglutination (HI) and Modified Agglutination (MAT) reactions in the detection of anti-*T. gondii* IgG antibodies in bovine meat exudates  
Maria Aparecida Moraes MARCIANO, Heitor Franco de ANDRADE JUNIOR, Luciana Regina MEIRELES
- 1767 Avaliação de indicadores higiênicos sanitários em mortadelas fatiadas**  
Evaluation of sanitary hygienic indicators in the sliced bolognas  
Jucilene Rodrigues CARDOSO, Paula Daianny Alves Araújo FERREIRA, Ana Paula Colares de ANDRADE
- 1771 Frequência de enteroparasitos em mulheres não grávidas e seus filhos e grávidas atendidos em uma unidade de saúde**  
Frequency of enteroparasites in non-pregnant women and their children and pregnant women attended at a public health unit  
Carolina Novato GONDIM, Alexandra Almeida Pereira CHAGAS, Thales Augusto BARÇANTE, Ingrid Marciano ALVARENGA, Marina Martins de OLIVEIRA, Joziana Muniz de Paiva BARÇANTE
- 1772 Nutrition students beliefs on the nutritional information and nutritional claims on in the pre-packaged food products: an application of the theory of planned behavior**  
Crenças de estudantes de nutrição sobre informação e alegação nutricional em produtos alimentícios: uma aplicação da teoria do comportamento planejado  
Gabriela Macedo FRAIZ, Renata Labronici BERTIN, Caroline Opolski MEDEIROS

---

**1773 Análise comparativa da rotulagem das embalagens de melados de cana-de-açúcar com a legislação vigente**  
Comparative analysis of the sugarcane syrup package labeling with the current legislation  
Carolina Medeiros VICENTINI-POLETTE, Maria Teresa Mendes Ribeiro BORGES, Marta Regina VERRUMA-BERNARDI

**1774 Listeria spp. em queijos Minas Frescal e avaliação das condições higiênico-sanitárias de produção e comercialização em Viçosa, MG, Brasil**  
Listeria spp. in Minas Frescal cheeses and assesment of hygienic-sanitary conditions of production and commercialization in Viçosa, MG, Brazil  
Mariana Barboza VINHA, Cláudia Lúcia de Oliveira PINTO, Maria Cristina Dantas VANETTI, José Benício Paes CHAVES

■ **NOTA CIENTÍFICA/SCIENTIFIC NOTE**

**1776 Determinação de baixas concentrações de lítio em águas de abastecimento público por cromatografia de íons: validação de método**  
Determination of low concentrations of lithium in public water supply by the ion chromatography: method validation  
Sergio DOVIDAUSKAS, Isaura Akemi OKADA, Felipe Rodrigues dos SANTOS

■ **COLABORADORES**

■ **INSTRUÇÕES AOS AUTORES**





# Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos: uma revisão sobre metodologias de análise e níveis de contaminação em produtos cárneos defumados

## Polycyclic aromatic hydrocarbons: a review on the methodologies of the analysis and the levels of contamination in smoked meat products

RIALA6/1779

Letícia de Queiroz MOZANER<sup>1,2</sup>, Adriana Palma de ALMEIDA<sup>1</sup>, Simone Alves da SILVA<sup>1\*</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Núcleo de Contaminantes Orgânicos, Centro de Contaminantes, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, Cerqueira César, São Paulo, SP, Brasil, CEP: 01246-000. Tel: 11 3068 2921. E-mail: [simone.silva@ial.sp.gov.br](mailto:simone.silva@ial.sp.gov.br)

<sup>2</sup>Programa de Aprimoramento Profissional (PAP) em Determinação de Contaminantes Químicos em Produtos e Materiais de Interesse à Saúde Pública, Instituto Adolfo Lutz, Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo

Recebido: 20.09.2018 - Aceito para publicação: 06.08.2019

### RESUMO

A defumação é um processo rotineiramente empregado nos alimentos como técnica de conservação, e uma maneira de proporcionar as características sensoriais específicas. Entretanto, o processo pode levar à formação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), que são compostos com dois ou mais anéis aromáticos condensados, alguns deles considerados carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos. Estudos em diversos países indicam que a contaminação de produtos cárneos defumados por diferentes HPAs é elevada e frequente, e desta maneira pode apresentar risco à saúde humana. O Brasil tem sido um dos maiores consumidores de carne no mundo, com tendência de aumentar o consumo de alimentos processados, e não é conhecida a real exposição da população aos HPAs pela ingestão de produtos cárneos defumados. Não há dados nacionais recentes quanto à contaminação destes alimentos com estes produtos. Considerando este panorama, o presente trabalho tem como objetivo realizar a revisão das principais metodologias analíticas, dos aspectos regulatórios e dos níveis de HPAs detectados em produtos cárneos defumados. Ademais, são apresentadas as maneiras de reduzir a contaminação dos alimentos por estes compostos.

**Palavras-chave.** hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, contaminantes, defumação, produtos cárneos, métodos de análise.

### ABSTRACT

Smoking is a common process employed in food as a conservation technique, as well as to provide the specific sensory characteristics. However, the process can lead to the formation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), which are composed of two or more fused aromatic rings, and some of them are considered carcinogenic, mutagenic and teratogenic. Studies conducted in several countries indicate that contamination of smoked meat products by different PAHs is high and frequent, and it may cause a risk to human health. Although Brazil has been one of the largest consumers of meat in the world, with a trend to increase the consumption of processed foods, it has not known the real population exposure to PAHs by consuming the smoked meat products. There is no recent national data on the contamination of these foods. Considering this scenario, this study aimed at reviewing the main analytical methodologies, the regulatory aspects and the levels of PAHs found in the smoked meat products. In addition, the forms to reduce the contamination by these compounds are presented.

**Keywords.** polycyclic aromatic hydrocarbons, contaminants, smoking, meat products, methods of analysis.

## INTRODUÇÃO

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são substâncias formadas apenas por carbono e hidrogênio, que possuem na estrutura dois ou mais anéis aromáticos condensados<sup>1</sup>. Tais substâncias são formadas a partir da combustão incompleta de matéria orgânica e podem ser originadas de fontes naturais ou antropogênicas, sendo a última a principal fonte de contaminação do ambiente e dos alimentos<sup>2</sup>. Muitos deles já foram determinados em alimentos e são reconhecidos por organizações internacionais, como a *International Agency for Research on Cancer* (IARC) da Organização Mundial da Saúde, devido à alta toxicidade, sendo alguns classificados como carcinogênicos ou provavelmente carcinogênicos para humanos e animais<sup>3,4</sup>. Estudos epidemiológicos com humanos e com animais de laboratório indicam que a exposição aos HPAs é um dos fatores responsáveis pelo aumento de câncer ao qual a população está exposta<sup>5,6</sup>.

Os alimentos podem ser contaminados a partir da poluição ambiental ou de diferentes processos aos quais podem ser submetidos, especialmente a defumação. A contaminação pode estar relacionada ao contato do alimento com a fumaça produzida da queima incompleta da madeira, ou pela utilização do aroma de fumaça, usado com a intenção de dar características organolépticas específicas ao alimento defumado. Em produtos cárneos, a principal fonte de contaminação por HPAs tem sido relacionada à defumação, e alimentos como bacon, frango e linguiça apresentam maior quantidade desses compostos carcinogênicos<sup>7</sup>.

O Brasil está no *ranking* entre os maiores fabricantes de carnes no mundo, sendo o 2º maior produtor de carne bovina (10 milhões de toneladas) e o 4º de carne suína (3,7 milhões de toneladas)<sup>8</sup>. Além disso, segundo a Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF), o consumo alimentar médio *per capita* da carne bovina é de 63,2 g/dia, para carne suína de 8,5 g/dia, e o consumo médio de produtos cárneos embutidos (como linguiça, salsicha, mortadela e presunto) é de 7,9 g/dia, com pesquisas indicando uma tendência de aumento no consumo de alimentos processados e ultraprocessados<sup>8,9</sup>.

Muitos estudos no exterior têm relatado quantidades elevadas de HPAs em vários produtos defumados. Portanto, este trabalho teve como objetivo realizar uma revisão de artigos publicados entre 2007 e 2017 sobre HPAs em carnes defumadas e derivados, abordando diferentes metodologias analíticas aplicadas para quantificá-los, avaliação da ocorrência desses contaminantes em alimentos analisados em diversos países e maneiras de reduzir a contaminação por esses compostos.

## MATERIAL E MÉTODOS

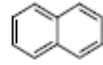
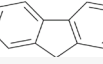
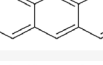
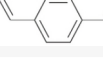
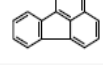
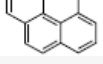
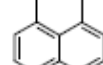
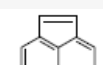

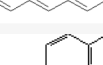
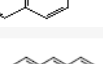
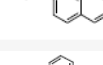
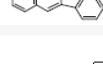
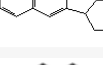
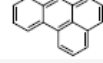
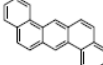
Para realizar a revisão, foram utilizadas as seguintes bases de dados: ScienceDirect, SibiUSP, PubMed, Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), *Food Science and Technology Abstracts* (FSTA), Scielo, entre outras, usando os seguintes descritores e associações: “meat”, “sausage”, “smoked”, “polycyclic aromatic hydrocarbons” e “benzo(a)pyrene”. Foram selecionados artigos publicados entre 2007 e 2017. As publicações descritas neste trabalho com mais de 10 anos foram selecionadas considerando a relevância do artigo nesta área.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### HPA: formação e propriedades físico-químicas

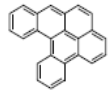
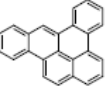
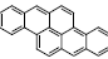
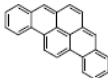
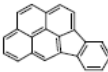
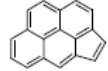

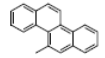
A **Tabela 1** apresenta os dados gerais (nome, abreviação, fórmula química, *CAS number*, massa molecular, estrutura e presença em lista das principais organizações internacionais) de alguns HPAs. Verifica-se que os HPAs são substâncias constituídas por anéis aromáticos condensados em arranjos lineares ou angulares, com duplas ligações conjugadas e, devido a esta característica, são persistentes no meio ambiente, de fácil disseminação e apresentam elevada toxicidade, na qual a lipofilicidade e toxicidade aumentam com o incremento da massa molecular. Já foram identificados mais de 100 compostos orgânicos com tais características, sendo estes pertencentes à classe de poluentes orgânicos persistentes (POPs) por serem tóxicos, persistentes, bioacumuláveis, e poderem causar efeitos negativos sobre a saúde e ao meio ambiente<sup>7,10</sup>.

**Tabela 1.** Principais hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs)

HPAs	Abreviações	Fórmula Química	CAS number	Massa molar (g/mol)	Estrutura	Lista
Naftaleno	Naf	$C_{10}H_8$	91-20-3	128		EPA
Fluoreno	Flu	$C_{13}H_{10}$	86-73-7	166		EPA
Antraceno	Ant	$C_{14}H_{10}$	120-12-7	178		EPA
Fenantreno	Fen	$C_{14}H_{10}$	85-01-8	178		EPA
Fluoranteno	Flt	$C_{16}H_{10}$	206-44-0	202		EPA
Pireno	Pir	$C_{16}H_{10}$	129-00-0	202		EPA
Acenaftaleno	AcF	$C_{12}H_{10}$	83-32-9	154		EPA
Acenafetileno	Aci	$C_{12}H_8$	208-96-8	152		EPA
Benzo[a]antraceno	BaA	$C_{18}H_{12}$	56-55-3	228		EPA,SCF, CEC, EU
Criseno	Cri	$C_{18}H_{12}$	218-01-9	228		EPA, SCF, CEC, EU
Benzo[a]pireno	BaP	$C_{20}H_{12}$	50-32-8	252		EPA, SCF, CEC, EU
Benzo[b]fluoranteno	BbF	$C_{20}H_{12}$	205-99-2	252		EPA, SCF, CEC, EU
Benzo[k]fluoranteno	BkF	$C_{20}H_{12}$	207-08-09	252		EPA, SCF, EU
Benzo[g,h,i]perileno	BgP	$C_{22}H_{12}$	191-24-2	276		EPA, SCF
Dibenzo[a,h]antraceno	DaA	$C_{22}H_{14}$	53-70-3	278		EPA, SCF, EU
Benzo[j]fluoranteno	BjF	$C_{20}H_{12}$	205-82-3	252		SCF, EU

Continua na página 4/21

Continuação

HPAs	Abreviações	Fórmula Química	CAS number	Massa molar (g/mol)	Estrutura	Lista
Dibenzo[a,l]pireno	DlP	C <sub>24</sub> H <sub>14</sub>	191-30-0	302		SCF, EU
Dibenzo[a,e]pireno	DeP	C <sub>24</sub> H <sub>14</sub>	192-65-4	302		SCF, EU
Dibenzo[a,h]pireno	DhP	C <sub>24</sub> H <sub>14</sub>	189-64-0	302		SCF, EU
Dibenzo[a,i]pireno	DiP	C <sub>24</sub> H <sub>14</sub>	189-55-9	302		SCF, EU
Indeno [1,2,3-cd]pireno	IcP	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub>	193-39-5	276		EPA, SCF, EU
Ciclopenta [c,d]pireno	Cpp	C <sub>18</sub> H <sub>10</sub>	27208-37-3	226		SCF, EU
Benzo[c]fluoreno	BcF	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub>	205-12-9	216		EU
5-metilcriseno	5mc	C <sub>18</sub> H <sub>10</sub>	3697-24-3	242		SCF

Environmental Protection Agency (EPA), Scientific Committee on Food (SCF), European Union (EU): Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) e SCF, e Regulamento nº 835/2011 da Commission of the European Communities (CEC). Fontes: Lawal<sup>1</sup>, Kim et al<sup>13</sup>, CEC<sup>35</sup> e Purcaro et al<sup>42</sup>

A formação dos HPAs se dá a partir da combustão incompleta da matéria orgânica e é influenciada pela temperatura e pressão da queima, sendo a formação favorecida pela queima em temperaturas entre 500 e 900°C, principalmente acima de 700°C. Em elevadas temperaturas, a pirólise de compostos orgânicos produz fragmentos de moléculas e radicais livres que se combinam para dar origem aos HPAs<sup>7</sup>.

O mecanismo de formação dos HPAs não é ainda completamente conhecido, mas em temperaturas elevadas e baixas concentrações de oxigênio, compostos orgânicos de elevada massa molecular são fracionados em moléculas menores, contendo dois ou três anéis aromáticos e alguns radicais livres. Na pirossíntese, os HPAs e os radicais livres formados no processo anterior podem se reorganizar originando moléculas

maiores (contendo de quatro a seis anéis aromáticos) e mais estáveis<sup>7</sup>.

#### Toxicidade: mecanismos e efeitos causados por curta e longa exposição

Os primeiros indícios da carcinogenicidade dos HPAs foram relatados em 1775, quando foi observada uma maior incidência de câncer em limpadores de chaminés. Estudos posteriores conduziram à identificação de vários processos industriais e misturas complexas dotados de potencial mutagênico e/ou carcinogênico atribuído à presença destas substâncias, no qual a toxicidade varia de acordo com a estrutura<sup>11</sup>.

A IARC é responsável pelo levantamento de pesquisas com o objetivo de identificar produtos químicos, misturas complexas, agentes físicos, biológicos e fatores de exposição que

apresentam risco de incremento de câncer, que são apresentadas na forma de monografias. Os produtos são classificados em grupos, de acordo com sua carcinogenicidade em humanos, sendo o Grupo 1 considerados carcinogênicos, o Grupo 2A prováveis carcinogênicos, o Grupo 2B possíveis carcinogênicos e o Grupo 3 não carcinogênicos. O único hidrocarboneto presente no Grupo 1 é o benzo[a]pireno, enquanto demais são alocados entre os Grupos 2A e 3<sup>3,4</sup>.

A **Tabela 1** apresenta ainda a lista dos HPAs classificados como os contaminantes prioritários em diversas organizações e agências internacionais, como a *U.S. Environmental Protection Agency* (EPA), a *European Union* (EU), o *Scientific Committee on Food* (SCF) e a *Commission of the European Communities* (CEC). Há evidências que a mistura destes compostos é considerada mais carcinogênica para humanos<sup>12</sup>.

O efeito causado para humanos e animais por tais contaminantes não depende apenas da estrutura do hidrocarboneto em questão, mas também do tempo e a forma de exposição. Quando ocorre o contato com tais compostos, em um curto prazo de exposição, foi relatado o comprometimento da função pulmonar em asmáticos e efeitos trombóticos em pessoas afetadas por doença cardíaca coronária, entretanto não há um conhecimento sobre a concentração e quais HPAs provocaram os sintomas. Exposições ocupacionais por curtos prazos a altos níveis de concentrações são conhecidas por resultar em sintomas como irritação ocular, náuseas, vômitos e diarreia. Já a exposição aos HPAs por longo prazo pode causar os efeitos carcinogênicos<sup>13</sup>.

Os HPAs são absorvidos rapidamente por meio da pele, por ingestão ou por inalação, e após serem absorvidos podem ser acumulados em vários órgãos, principalmente os que possuem maior porcentagem de lipídeos, como é o caso do fígado, trato gastrointestinal, rins, entre outros<sup>11</sup>. Uma vez absorvidos pelo organismo, os hidrocarbonetos passam por processos com a intenção de diminuir a toxicidade do composto absorvido, mas a toxicidade pode ser aumentada devido à ativação dos metabólitos formados. Os HPAs sofrem metabolização por enzimas específicas formando metabólitos mais tóxicos que eles mesmos, já que estes podem se ligar ao DNA<sup>11</sup>.

As principais vias de eliminação desses contaminantes após o metabolismo hepático são as fezes e urina, na qual o 1-hidroxipireno urinário e adutos de HPA-DNA são os biomarcadores mais comumente empregados em estudos de exposição aos HPAs. O 1-hidroxipireno foi introduzido como biomarcador para humanos, e já foi apresentado como avaliador por vários estudos<sup>14-16</sup>. É um biomarcador de fácil detecção, utilizado quando a avaliação da exposição externa é difícil e a coleta de sangue não é possível.

Adutos DNA-HPA também podem ser biomarcadores da exposição aos HPAs e do metabólito reativo final. Tais adutos podem ser encontrados em glóbulos brancos periféricos de adultos expostos aos HPAs. Entretanto, quantificar o aduto-DNA não é uma tarefa fácil, considerando que estão em concentrações muito baixas, a eficiência dos mecanismos biológicos de reparo, a diluição dos adutos devido a divisão celular e a dificuldade de amostragem do DNA humano, especialmente tendo-se em conta a grande variedade de órgãos-alvo dos diversos HPAs. Por isso, especial atenção tem sido dada aos estudos dos adutos formados nas reações entre os agentes carcinogênicos e proteínas, como indicadores dos níveis de reação com o DNA<sup>13</sup>.

Trabalhos publicados têm associado à ingestão diária de alimentos contaminados por HPAs ao risco de vários tipos de cânceres: colorretal, esôfago, laringe, pulmão, rim, pele e bexiga, e também à outras doenças não genotóxicas como diabetes e doenças cardiovasculares<sup>13</sup>.

### **Exposição humana aos HPAs**

Os HPAs são facilmente disseminados no ar, solo, água e corpos aquáticos, e alguns foram identificados em altas concentrações nos alimentos e no meio ambiente<sup>13</sup>. A contaminação por HPAs ocorre principalmente pela combustão incompleta de combustíveis presentes nas fontes naturais e antropogênicas. As fontes naturais são limitadas por queimas naturais de florestas e erupções vulcânicas. Dentre as fontes antropogênicas, estão incluídos derramamento de petróleo, combustão de veículos, aviões a jato, incineração, queimadas, fumaça de cigarro, processos industriais, dentre outros<sup>2</sup>. De acordo com Azeredo et al<sup>17</sup>, a fonte antropogênica é a



principal forma de contaminação dos alimentos e do meio ambiente.

O destino do contaminante irá depender das propriedades físico-químicas do HPA em questão e também das condições ambientais do local em que for emitido, geralmente os que possuem baixo peso molecular são encontrados na troposfera, enquanto que os de alta massa molecular são encontrados nas partículas presentes na atmosfera, já que estes são menos voláteis, entretanto a partição no ar e em partículas irá depender de suas características<sup>13</sup>.

Os HPAs ligados às partículas podem facilmente entrar em outros compartimentos ambientais a partir da sua deposição na biosfera terrestre, sendo então uma forma de contaminação dos alimentos. Solos também podem estar contaminados com HPAs, seja por deposição de partículas ou acidentes ambientais próximos, existindo a possibilidade de transferir esses contaminantes para as plantas por meio do sistema radicular e/ou fertilizantes, contaminando os alimentos vegetais, que são incorporados e transferidos ao longo da cadeia alimentar<sup>17</sup>.

Os ambientes marinhos também podem ser contaminados por HPAs pelo derramamento de petróleo ou outros efluentes derivados do carbono, por serem lipofílicos e não solúveis em água. Estes poluentes se depositam no sedimento ou também podem se acumular em tecidos adiposos de peixes e outros organismos marinhos, sendo outra maneira de exposição aos humanos<sup>18</sup>.

### Contaminação em alimentos

Frutas e vegetais *in natura* podem ser contaminados de várias maneiras, considerando o fato dos HPAs estarem presentes na atmosfera, águas e solos. O material particulado contaminado pode se depositar na superfície destes alimentos, de forma mais específica na camada de cera superficial representando uma forma de exposição dos humanos aos HPAs<sup>17</sup>.

Os cereais também podem ser contaminados pela secagem dos grãos com gases de combustão, na qual a concentração de HPAs irá variar de acordo com o gás utilizado e as condições de queima. Além disso, Azeredo et al<sup>17</sup> citam que solos contaminados também podem ser fonte de contaminação dos grãos.

Os óleos vegetais e gorduras são facilmente contaminados, já que os HPAs são compostos lipofílicos e dissolvidos nestes. De acordo com Silva et al<sup>19</sup>, as principais formas de contaminação são por absorção por plantas oleaginosas a partir do solo contaminado, deposição dos HPAs nas plantas, secagem direta das sementes com gases de combustão ou a partir de solventes a base de petróleo, usados na extração do óleo da semente.

No café, a torrefação dos grãos provoca a formação dos HPAs e cerca de 20-30% destes são transferidos para a bebida pelo método tradicional de preparo. Segundo Singh et al<sup>20</sup>, o nível de contaminação por HPAs depende do tempo e grau de torrefação do café, no qual aqueles que utilizam um tempo maior e um grão mais torrado apresentam maiores níveis.

Bebidas alcoólicas, como cachaças, apresentam contaminação por HPAs no início de seu processamento, na queima da cana-de-açúcar durante a colheita, ou nas etapas finais, por meio de adição de caramelo (utilizado para a correção da coloração da bebida envelhecida) ou durante a maturação (envelhecimento) em tonéis de madeira cuja parte interior foi submetida à queima durante sua confecção<sup>21</sup>.

No grupo dos *fast-foods*, as pizzas são as mais contaminadas por BaP, principalmente se forem assadas no forno a lenha. Além de que outros ingredientes utilizados na fabricação de determinados alimentos podem ser fontes adicionais de contaminação por HPAs: a maionese, por exemplo, apresenta quantidade significativa de óleo de soja na composição, que pode ser uma forma de contaminação<sup>12</sup>.

Nos alimentos de origem animal como carnes e peixes, o grau de contaminação por HPAs depende da quantidade de lipídeos do animal, metabolismo, estrutura corporal e textura, entre outros fatores que afetam na bioacumulação destes contaminantes por poluição ambiental<sup>11</sup>. Também por meio de alimentação contaminada (rações, pastagens), os HPAs podem ser transferidos para tais produtos.

Segundo Garcia et al<sup>7</sup>, a exposição dos humanos pela ingestão de alimentos contaminados também pode ocorrer a partir de processos de preparação dos alimentos que envolvem a queima

incompleta da matéria orgânica, tais como grelhar, fritar, assar, entre outros.

Muitas variáveis devem ser consideradas para a formação destes compostos, tais como a posição do alimento em contato com o calor, a temperatura da queima, tempo do processo, fonte de calor, quantidade de gordura presente na carne, entre outros. Rose et al<sup>22</sup> mostraram que o mais seguro é não deixar que a gordura do alimento entre em contato com a chama, e não expor o produto em altas temperaturas por tempo elevado. Alimentos mais gordurosos como bacon, carnes gordurosas e linguiças estão mais propensos à contaminação<sup>11</sup>.

Rose et al<sup>22</sup> analisaram alguns tipos de carnes de churrasco como bife de carne, frango, hambúrgueres e salsichas, e os HPAs foram encontrados em quase todas as amostras, algumas em níveis elevados, principalmente nos embutidos de carne suína e nos hambúrgueres assados na churrasqueira. Entretanto, embutidos de carne suína que estavam a uma distância menor da fonte de calor apresentaram níveis mais baixos, o que não era esperado pelos autores, e a justificativa dada foi em relação à textura da carne, ao teor de lipídeos, a composição da “capa”, que resultaram em uma menor absorção de HPAs nestas amostras.

No trabalho de Martorell et al<sup>23</sup>, em que foram analisados os teores de HPAs em vários grupos de alimentos ingeridos no cotidiano da população de Catalônia, e estimada a contribuição de cada alimento para a ingestão diária total de HPAs dos indivíduos, verificou-se que carnes e derivados apresentaram os maiores índices de contaminação, com uma contribuição para a ingestão total de 49,2%, seguido por óleos e gorduras. Além disso, dentre as diversas categorias de alimentos estudadas entre 2007 e 2017, produtos cárneos defumados é um dos grupos com o maior número de publicações relacionadas<sup>24</sup>.

Em suma, verifica-se que a exposição aos HPAs por meio dos alimentos pode ser significativa, o que coloca em risco a saúde da população, considerando a carcinogenicidade destes compostos.

### **Processo de defumação de alimentos**

O processo de defumação é um método antigo de preparo, usado tradicionalmente em diversos alimentos como carne, peixe e queijo, com o objetivo de conferir um perfil organoléptico específico, além

de conservar o produto por mais tempo, uma vez que inativa enzimas e microrganismos que causam a degradação dos nutrientes<sup>24,25</sup>.

No processo de defumação, ocorre a penetração de voláteis no alimento por meio da fumaça gerada pela queima de um material combustível<sup>26</sup> e a formação da cor e do aroma é função da interação das partículas da fumaça com o alimento. A quantidade de componentes depositados depende da temperatura, umidade, agitação e composição da fumaça<sup>27</sup>.

De acordo com Ledesma et al<sup>28</sup>, há diversas maneiras de defumação, nas quais variam a temperatura da defumação, o local de geração da fumaça e o combustível utilizado. Esses diferentes métodos podem ser classificados em dois tipos: direto (tradicional) e indireto (industrial).

No método tradicional, o alimento é disposto em prateleiras na mesma câmara em que a fumaça é gerada. A queima do material combustível pode ocorrer de duas formas, fumaça fria ou quente, sendo que na fumaça fria, após a geração da fumaça, o fogo não é mantido e, na fumaça quente, o fogo é continuamente alimentado para a produção de fumaça, que pode atingir temperaturas de 130°C<sup>28</sup>.

No método industrial, a fumaça é gerada separadamente da câmara de defumação, a partir de diferentes métodos com condições mais controladas, por exemplo fricção, vapor de fumaça, fumaça fumegante e toque de fumaça<sup>28</sup>.

Skaljic et al<sup>29</sup> avaliaram embutidos de carne suína defumados pelos dois diferentes métodos, tradicional e industrial, na qual foram alterados temperatura, tipo de madeira, umidade relativa e tempo de defumação, e os níveis mais elevados de HPAs foram encontrados em produtos defumados pelo método tradicional.

Com o objetivo de reduzir a contaminação dos alimentos por HPAs, técnicas alternativas estão sendo desenvolvidas para a defumação, que podem variar o fluxo de fumaça, a distância do alimento da fonte de queima, a temperatura utilizada, a densidade de fumaça, o gás de queima, entre outros. Segundo Alakali et al<sup>30</sup>, a maioria dos fornos possui fluxo horizontal de fumaça e utilizam carvão ou biomassa como combustível. De acordo com os mesmos autores, são necessários fornos em que a densidade de fumaça não seja tão elevada e que

o consumo de combustível seja baixo, para que o aspecto desejado do alimento seja obtido em curto tempo e com melhor qualidade.

Vários tipos de materiais combustíveis podem ser utilizados para a produção da fumaça, como cascas de coco, espiga de milho, caroços de frutas, diferentes tipos de madeira (pinheiro, faia, carvalho) e carvão<sup>28</sup>. A escolha do tipo de combustível a ser usado deve ser realizado com cautela, considerando que diferentes combustíveis podem gerar diferentes componentes na fumaça, especialmente os HPAs. Stumpe-Viksna et al<sup>31</sup> avaliaram carnes defumadas com carvão e com dez diferentes tipos de madeira (macieira, amieiro, amieiro e *juniper maple*, abeto vermelho, aveleira, *plum*, álamo, cerejeira, romeira), e o uso da madeira de abeto vermelho resultou em concentrações de HPAs cerca de duas vezes superiores às concentrações encontradas com as madeiras de macieira e amieiro.

Uma alternativa para a defumação tradicional é o uso do aroma de fumaça, que oferece maior praticidade, pois é possível produzir produtos defumados com tempo reduzido e com quantidade menor de matéria-prima, além de ser possível controlar a concentração de aroma adicionado ao alimento. Esta é uma técnica bastante empregada pela indústria de alimentos. O aroma é proveniente da condensação da fumaça produzida pela queima controlada de serragem ou lascas de madeira, com quantidade mínima de oxigênio. Após a condensação, o líquido é refinado para retirar impurezas e compostos carcinogênicos (tais como os HPAs), e por fim é suavemente envelhecido, originando o produto final, que dá ao alimento características muito semelhantes ao da defumação tradicional<sup>28</sup>.

### Legislação para HPAs em alimentos

Em 2002, o SCF apresentou uma revisão sobre a toxicidade dos HPAs nos alimentos, e adotaram que o BaP seria o marcador da presença desses contaminantes. Em 2003, a legislação para alimentos da Comunidade Europeia estabeleceu valores máximos de BaP e BaA e as condições necessárias para comercializar aromas de fumaça utilizados para a preparação de alimentos defumados, bem como condições de produção, e procedimentos de avaliação dos aromas de fumaça<sup>32</sup>.

Os valores máximos de BaP e BaA estipulados para estes produtos foram de 10 µg/kg e 20 µg/kg, respectivamente. Em 2006, limites para BaP foram estabelecidos pela Comissão Europeia em alguns alimentos (óleos e gorduras, carnes e derivados de carnes defumados, peixes e crustáceos, moluscos bivalves, cereais processados, alimentos para bebês e alimentos dietéticos)<sup>33</sup>

A partir de 2007, a *European Food Safety Authority* (EFSA) iniciou os estudos de reavaliação de marcadores de HPAs, em consequência de vários trabalhos apresentados entre os anos de 2005-2007, realizados em 18 países da União Europeia, na qual os resultados analíticos comprovaram a contaminação de vários alimentos por outros HPAs genotóxicos e tóxicos além do BaP. Assim, a soma dos 4 HPAs (BaP, BaA, BbF e Cri) ou a soma de 8 HPAs (BaP, BaA, BbF, BkF, Cri, BgP, IcP, DaA) foram estabelecidos como biomarcadores, além do BaP. Entretanto, comparando os resultados da soma de 8 HPAs e 4 HPAs, não houve diferença significativa entre os resultados, concluindo-se que a soma dos 4 HPAs já era suficiente para detectar a presença dos componentes prioritários<sup>34</sup>.

Logo, a Comissão da Comunidade Europeia, com o Regulamento nº 835/2011<sup>35</sup>, propôs novos limites máximos para o BaP e para a soma de 4 HPAs em diversos alimentos. Nesta legislação, ainda é apontado um valor separado para BaP, com a intenção de levantar dados para comparações futuras. O limite para BaP de 5,0 µg/kg e para os 4 HPAs de 30,0 µg/kg foi estabelecido para carne defumada e produtos a base de carne defumada, espadilhas defumadas, espadilhas defumadas em lata.

Este mesmo regulamento propôs, para carne defumada e produtos, que os valores fossem reduzidos gradativamente para BaP e para os 4 HPAs respectivamente para 2,0 µg/kg e 12,0 µg/kg, e estes limites deveriam prevalecer a partir de 2014. Entretanto, apesar da aplicação de boas práticas de defumação, certos países membros da União Europeia não conseguiram atingir os limites em produtos defumados pelo modo tradicional. Assim, os limites foram mantidos para os países e o prazo para redução foi prorrogado para 2017 pelo Regulamento nº 1327/2014<sup>36</sup>.

No Brasil, há valores máximos estabelecidos para BaP para aromas de fumaça segundo a Resolução RDC nº 2/2007<sup>37</sup>, a qual estabelece que estes produtos não devem transferir mais que 0,03 µg/kg de BaP ao alimento final. Há também limites máximos de BaP para água de consumo segundo Portaria nº 5/2017<sup>38</sup> (0,7 µg/L) e para óleo de bagaço de oliva, de acordo com a Resolução RDC nº 281/2003<sup>39</sup> (2 µg/kg).

### Diferentes métodos para extração, limpeza e quantificação de HPAs em produtos cárneos defumados

Para que seja possível mensurar corretamente a quantidade de HPAs presente nas amostras, é necessário dispor de um método exato, preciso, seletivo, com boa reprodutibilidade e repetibilidade e com limites de detecção e quantificação que satisfaçam os níveis requeridos na legislação, sendo que quanto mais baixo forem estes limites, mais sensível deve ser o método.

Métodos de extração, limpeza e quantificação dos HPAs inovadores, com tempo e custo de análise reduzidos, vêm sendo desenvolvidos. A escolha da metodologia empregada depende da matriz, dos materiais e insumos disponíveis, do custo, entre outros fatores. A **Tabela 2** apresenta alguns métodos utilizados para extração, limpeza e quantificação de HPAs em produtos cárneos defumados, coletados da literatura científica. São empregados os métodos: saponificação a quente com solução metanólica de hidróxido de potássio (KOH) e extração líquido-líquido com ciclohexano para a extração em aroma de fumaça, carne e peixe defumado ou extração com ciclohexano em ultrassom em embutidos de carne suína, limpeza com sílica-SPE ou cromatografia clássica com C18 e DMSO, e quantificação em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detectores de fluorescência (FLD)/ultravioleta (UV) ou cromatografia gasosa (CG) acoplada ao espectrômetro de massas (MS)<sup>25,29,40-56</sup>.

**Tabela 2.** Métodos utilizados para extração, limpeza e detecção dos HPAs

Referência	Ano	Tipo de alimento	Método de Extração	Método de Limpeza	Método de quantificação	LD (µg/kg)	LQ (µg/kg)
AOAC <sup>40</sup>	1974	Carnes, queijos, alimentos defumados, compostos dietéticos e bebidas	Saponificação a quente com solução etanólica de KOH e extração líquido-líquido com isoctano	Florisil-SPE	CCD-FLD/UV	-	0,5
Djinovic et al <sup>41</sup>	2008	Presunto de carne bovina, presunto de porco, bacon com pele e sem pele, embutidos de carne suína	Extração acelerada por solvente a quente (ASE 200)	CPG e Sílica-SPE	Fast-CG/HRMS	0,001-0,077	-
Gómez-Ruiz et al <sup>43</sup>	2009	Embutidos de carne suína	Extração acelerada por solvente em elevada temperatura (ASE 300)	CPG e Sílica-SPE	CG-MS	-	-
Purcaro et al <sup>42</sup>	2009	Embutidos de carne suína, bacon defumado, carne de porco defumada e carne bovina defumada	Dois métodos usando n-hexano: digestão em micro-ondas e extração líquido-líquido	Sílica-SPE	CLAE-FLD	0,2-0,6	-
Farhadian et al <sup>44</sup>	2011	Carne bovina e frango	Saponificação com NaOH e adição de terra diatomáceas (refil extrelut)	Coluna Extrelut conectada ao PRS-SPE e Sílica-SPE	CLAE-FLD	0,01-0,03	0,04-0,1

*Continua na página 10/21*

Continuação

Referência	Ano	Tipo de alimento	Método de Extração	Método de Limpeza	Método de quantificação	LD (µg/kg)	LQ (µg/kg)
Roseiro et al <sup>45</sup>	2011	Chouriço grosso	Saponificação a quente com solução metanólica de KOH e extração líquido-líquido com n-hexano	Florisil-SPE	CLAE-FLD/UV	-	-
Chung et al <sup>46</sup>	2011	Presunto, bacon, embutidos de carne suína, frango grelhado e assado, carne bovina e suína	Saponificação a quente com solução de KOH (metanol:água 9:1, v/v) por 2h e após esse tempo adicionou-se n-hexano e água gelada. A mistura foi deixada <i>overnight</i>	Florisil-SPE	CLAE-FLD	0,003-0,2	-
Jahurul et al <sup>47</sup>	2013	Carnes e peixes	Saponificação com NaOH e adição de terra diatomáceas (refil extrelut)	Coluna Extrelut conectada ao PRS-SPE	CLAE-FLD	0,01-0,09	0,03-0,3
Kumosani et al <sup>48</sup>	2013	Peixe frito, frango frito e carne frita	Saponificação a quente com solução metanólica de KOH e extração líquido-líquido com ciclohexano, seguido por extração com N,N-dimetilformamida: água (9:1, v/v)	-	CLAE-FLD e confirmação por CG-MS	-	-
Skaljic et al <sup>29</sup>	2014	Embutidos de carne suína típico alemão	QuEChERS – uso de acetonitrila e sais de sulfato de magnésio e cloreto de sódio	QuEChERS (C18 + PSA)	CG-MS	0,3-0,6	-
Olatunji et al <sup>49</sup>	2014	Carne bovina, suína e filé de frango defumados	Saponificação a quente com solução metanólica de KOH e extração líquido-líquido com n-hexano:diclorometano (4:1, v/v)	Sílica-SPE	CG-FID	0,1-0,3	0,3-0,9
Chen et al <sup>50</sup>	2014	Diversas partes da carne (pele, gordura e parte magra) de porco defumadas	Digestão em microondas com acetonitrila e em seguida extração líquido-líquido com n-hexano	Cromatografia clássica com sílica e alumina	CG-MS	2,9-6,8	-
Surma et al <sup>51</sup>	2014	Presunto de porco	QuEChERS- uso de acetato de etila e sais de sulfato de magnésio e cloreto de sódio	QuEChERS (PSA + C18)	CG-MS	0,0001-0,001	0,0003-0,0028
AOAC <sup>52</sup>	2014	Frutos do mar	Extração líquido-líquido com acetato de etila:água e uso de sulfato de magnésio e cloreto de sódio	Sílica-SPE	CG-MS	-	-
Ledesma et al <sup>25</sup>	2015	Chorizo (um defumado típico da Espanha produzido com carne de porco, gordura de porco e especiarias, encapados em <i>casing</i> feitas do intestino do animal)	Extração usando ultrassom com n-hexano por 1 hora, seguida de extração líquido-líquido com n-hexano	Sílica-SPE	CG-MS	0,05	0,24

Continua na página 11/21



Continuação

Referência	Ano	Tipo de alimento	Método de Extração	Método de Limpeza	Método de quantificação	LD (µg/kg)	LQ (µg/kg)
Khorshid et al <sup>53</sup>	2015	Peixe tipo <i>Herring</i>	QuEChERS – uso de acetonitrila e sais de sulfato de magnésio e cloreto de sódio	Sílica-SPE	CG-MS	0,09-1,94	2,00
Chatterjee et al <sup>54</sup>	2016	Carne de peixe	QuEChERS- uso de acetonitrila e sais de sulfato de magnésio	PSA-C18 PSA-C18- CaCl <sub>2</sub> PSA-C18- Florisil-CaCl <sub>2</sub> - hexano	CG-MS/MS	0,001-0,004	0,002-0,013
Zachara et al <sup>55</sup>	2017	Peixe defumado, embutidos de carne suína, presunto defumado e tiras de frango defumado	Saponificação a quente com solução metanólica de KOH e extração líquido-líquido com ciclohexano	Cromatografia clássica com óxido de alumínio	CLAE-FLD	0,18	0,25
Lu et al <sup>56</sup>	2017	Produtos prontos para consumo, como fatias de frango, bacon, presunto defumado e embutidos de carne suína	Saponificação com NaOH e adição de terra diatomáceas (refil extrelut)	Coluna Extrelut conectada ao PRS-SPE e Sílica-gel	CLAE-FLD	0,06-0,08	0,12-0,16

Síglas: CCD-FLD/UV: Cromatografia em camada delgada acoplada com detector de fluorescência e detector ultravioleta, CLAE-FLD/UV: cromatografia líquida acoplada com detector de fluorescência e detector ultravioleta, CG-MS: Cromatografia gasosa acoplada com detector de massa, Fast-CG – HRMS: Cromatografia gasosa rápida acoplada a detector de massa de alta resolução, Fast-CG/MS: Cromatografia gasosa rápida acoplada a detector de massa, CG-MS/MS: Cromatografia gasosa acoplada com detector de massa tripló quadrupolo, CG-FID: Cromatografia gasosa com detector por ionização de chama, CPG: cromatografia de permeação em gel, Florisil-SPE: cartucho de extração em fase sólida empacotado com Florisil, Sílica-SPE: cartucho de extração em fase sólida empacotado com sílica, PRS-SPE: cartucho de troca iônica, PSA: amina primária secundária, C18: octadecilsilano

Para comprovar que o método é adequado para o fim proposto, permitindo obter resultados confiáveis nas análises laboratoriais, é sugerido que os laboratórios nacionais realizem a validação da metodologia analítica de acordo com o Guia do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), incluindo parâmetros de linearidade, seletividade, exatidão, precisão, limites de detecção e quantificação<sup>57</sup>. Além disso, de acordo com Zelinkova e Wenzl<sup>58</sup>, é possível também utilizar uma metodologia oficial, como as descritas pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC)<sup>40,52</sup>.

O uso de materiais de referência certificados (MRC) tem sido uma exigência para comprovação de que a metodologia atende critérios de exatidão<sup>57</sup>. Atualmente, existem disponíveis no mercado dois tipos de MRC de mexilhão oferecidos pelo *National Institute of Standards & Technology* (NIST), que apresentam como analitos os HPAs, SMR 1974 e SMR 2974a<sup>59,60</sup>.

A AOAC<sup>40</sup> publicou o primeiro método oficial para determinação de BaP em diversas categorias de alimentos, como carne, alimentos defumados, queijos, compostos dietéticos e bebidas. No método utilizou-se saponificação com solução etanólica de hidróxido de potássio, seguido por uma etapa de partição entre isoctano, água e álcool etílico para a extração dos analitos da amostra. Após isso, realizou-se a purificação com cartucho de extração em fase sólida (SPE) florisil e extração líquido-líquido (ELL) com dimetilsulfóxido, na qual a fase orgânica foi separada. Os analitos foram quantificados por cromatografia em camada delgada com detecção no ultravioleta com confirmação em espectrofluorescência.

Grimmer e Bohnke<sup>61</sup> foram um dos primeiros autores que propuseram metodologias para a determinação de HPAs em alimentos, incluindo dois grupos: (I) com alto teor proteico, como carne, peixe, aves e cereais e (II) óleos e gorduras. No grupo I, devido ao alto teor proteico das

amostras, foi necessária a saponificação dos produtos, na qual foi utilizado solução metanólica com hidróxido de potássio. A ELL foi realizada com metanol:água e ciclohexano, seguido por extração com dimetilformamida (DMF):água e a purificação foi realizada por cromatografia em sílica-gel seguida por cromatografia por exclusão de tamanho (Sephadex LH 20). Por fim, para a determinação e quantificação utilizou-se CG com detector de ionização de chama (FID). Para o grupo II, a etapa de saponificação não foi realizada, e a ELL foi feita apenas com DMF: água e ciclohexano.

O método AOAC 2014.08 é aplicado para determinação dos 16 HPAs em pescados e derivados, tais como molusco, camarão e peixe. Esta metodologia sugere a ELL com acetato de etila:água na presença de sulfato de magnésio e cloreto de sódio, utilizando o princípio do QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Rugged, Safe*). O extrato foi levado à purificação em cartuchos de SPE-sílica, e a determinação e quantificação realizada por cromatografia gasosa acoplada com detector de massa<sup>52</sup>.

Verifica-se que, com o decorrer dos anos, houve um avanço de tecnologias, com desenvolvimento de metodologias e preocupação com a sustentabilidade e meio ambiente. Assim, os métodos foram miniaturizados. Por exemplo, o método da AOAC, de 1974, utiliza cerca de um litro de iso-octano para a extração dos HPAs, e usava o benzeno para a eluição dos analitos, que é altamente tóxico<sup>40</sup>. Grimmer e Bohnke<sup>61</sup> realizavam a extração dos HPAs em funil de separação de dois litros com 800 mL de ciclohexano. Já nos métodos mais recentes, como o da AOAC<sup>52</sup>, utilizou-se cerca de 10 mL de acetato de etila, e a extração foi realizada em tubo de centrífuga de 50 mL. Portanto, é possível a determinação de vários HPAs (incluindo os 16 prioritários) com uma redução da quantidade dos reagentes e solventes, empregando produtos menos tóxicos.

#### Extração dos analitos

A **Tabela 2** apresenta um resumo das principais técnicas de extração para os HPAs, incluindo: saponificação a quente com solução metanólica de KOH e ELL com n-hexano ou iso-octano, digestão em micro-ondas com n-hexano, saponificação com hidróxido de sódio (NaOH) e adição de terras diatomáceas (refil extrelut),

QuEChERS (uso de acetonitrila e sais de sulfato de magnésio), entre outras<sup>40-56</sup>.

Para a determinação e quantificação dos HPAs é necessário realizar a extração dos analitos de interesse e remover os possíveis interferentes presentes na amostra. De acordo com Zelinkova e Wenzl<sup>58</sup>, os lipídeos são as impurezas majoritárias em tecidos animais, sendo necessária a escolha de um método de extração que remova de forma eficiente os HPAs da matriz cárnea.

Um método de extração, frequentemente utilizado na literatura para cárneos, é a saponificação seguida de ELL com ciclohexano ou n-hexano<sup>42,45,62</sup>. É um método eficaz, que apresenta recuperações elevadas e baixo custo. Uma vez que os HPAs tendem a ficar adsorvidos em componentes como proteínas e lipídeos, a adição de um composto alcalino com KOH é necessária, já que tais componentes não podem ser destruídos apenas na presença de álcool ou com elevação de temperatura. Então, a ELL solubiliza os HPAs livres na matriz e permite isolá-los<sup>61</sup>.

O QuEChERS é um método de extração que vêm sendo largamente estudado e utilizado nos últimos anos para HPAs, por ser rápido, usar pouca quantidade de solventes e gerar pequenas quantidades de resíduos<sup>63</sup>. O QuEChERS tradicional foi inicialmente desenvolvido para extrair pesticidas de frutas e vegetais, ou seja, matrizes pouco gordurosas. Entretanto, várias adaptações (solventes, sais e fases dispersivas) do método vêm sendo realizadas para extrair analitos de matrizes gordurosas tais como peixes, frutas gordurosas, entre outros. O procedimento envolve partição líquido-líquido pela adição de acetonitrila e sais de sulfato de magnésio e cloreto de sódio, seguido pela etapa de limpeza utilizando um material dispersivo, sulfato de magnésio e água para remover os interferentes polares<sup>42</sup>.

O material Extrelut é outra inovação que está sendo amplamente utilizada como alternativa aos métodos tradicionais. Baseia-se em um material quimicamente inerte, composto por terras diatomáceas, vendido pré-embalado em cartuchos, no qual suas propriedades de superfície permitem que funcione como um suporte para a ELL de substâncias lipofílicas. Quando uma amostra aquosa é aplicada ao Extrelut, distribui-se como uma película fina ao longo da superfície e age como uma fase estacionária. A eluição de analitos

é realizada utilizando um solvente orgânico que é imiscível com água, por exemplo, éter dietílico, acetato de etila ou hidrocarbonetos halogenados<sup>64</sup>.

Vários estudos mostram que os métodos mais recentes de extração, como o QuEChERS e a utilização do material Extrelut apresentam vantagens em relação à clássica ELL devido à maior praticidade, menor tempo, redução de reagentes e menor uso de vidrarias, além de resultados com recuperações e limites de detecção similares aos métodos tradicionais<sup>65</sup>. Entretanto, esses novos métodos devem ser adaptados de acordo com cada matriz, por isso a escolha e a utilização dos mesmos deve ser criteriosa.

#### *Limpeza e purificação dos analitos*

A etapa de limpeza da amostra tem o intuito de retirar possíveis interferentes da análise, para que estes não interfiram na etapa de quantificação e separação dos analitos desejados.

Após a extração dos analitos da matriz carne e seus derivados, esta etapa é necessária para remover interferentes como ácidos graxos e trigliceróis<sup>54</sup>. Segundo Purcaro et al<sup>42</sup>, a SPE é bastante utilizada pois apresenta elevada sensibilidade e é relativamente rápida. Existem vários adsorventes já empregados na análise de HPAs, sendo os principais: C18, florisil, sílica, estireno/divinilbenzeno (PS/DVB), ou uma mistura de C18-florisil. Na maioria dos trabalhos apresentados para produtos defumados (**Tabela 2**), a sílica foi usada como adsorvente, com a intenção de reter os interferentes (triacilgliceróis), e os HPAs foram eluídos com solventes como n-hexano ou diclorometano<sup>25,42,49,52,53</sup>. Florisil como adsorvente foi empregado por Chung et al<sup>46</sup>. De acordo com Purcaro et al<sup>42</sup>, quando amostras com alto teor de gordura são purificadas utilizando a sílica-SPE ou a florisil, obtém-se eficácia na remoção das impurezas, mas a recuperação é mais baixa com Florisil-SPE do que com a sílica.

Outra maneira de limpar os extratos é por cromatografia de permeação em gel (CPG), uma vez que, de acordo com Zelinkova e Wenzl<sup>58</sup>, o CPG e o SPE constituem métodos prioritários para limpeza de extratos alimentares primários. O conceito de CPG é a separação a partir do tamanho das partículas (mais exatamente a massa molecular), o que confere simplicidade ao método. Existem vários géis de purificação, com diferentes tamanhos, e a amostra é eluída com solventes como diclorometano, n-hexano,

ciclohexano, acetato de etila, ou uma mistura deles<sup>58</sup>. Geralmente, para retirar totalmente os interferentes da amostra, utiliza-se o CPG seguido de SPE, o que resulta em uma boa limpeza de diferentes matrizes, entretanto, a inclusão de diversas etapas de limpeza implica em maiores custos, uso de solventes, tempos de análise e possibilidade de perdas do analito durante o procedimento.

#### *Determinação e quantificação dos analitos*

A cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência e a cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas são as principais técnicas instrumentais utilizadas para a separação e quantificação dos HPAs presentes nos produtos cárneos e derivados (**Tabela 2**).

Nas análises por CLAE dos HPAs em produtos cárneos, o detector de fluorescência é o mais comum, que determina e quantifica a partir do fenômeno de fluorescência, gerando um espectro característico. A fluorescência é uma propriedade particular de cada hidrocarboneto, e depende da presença de um grupo fluoróforo. Cada analito é excitado e emite a energia em um comprimento de onda específico, a excitação ocorre nos comprimentos de 245-400 nm e a emissão de 280-550 nm<sup>65</sup>.

Boa parte dos HPAs apresenta fluorescência, com exceção do Naf, Aci, Acf e Flu que, quando analisados por CLAE, são determinados usando o detector UV<sup>66</sup>. Entretanto, o CLAE-FLD, em comparação com o CG-MS, apresenta limites de detecção superiores para todos os HPAs, uma vez que a sensibilidade desse método depende das propriedades de fluorescência, intrínsecas de cada substância<sup>65</sup>.

A CG é utilizada para separação de compostos voláteis e termicamente estáveis, uma vez que a amostra deve ser volatilizada, e o gás utilizado como fase móvel, possibilita um rápido equilíbrio com a fase estacionária e então diminui o tempo de análise e oferece uma alta resolução. Os detectores mais utilizados na CG para análise de HPAs são o MS e o detector de ionização de chama. Com o CG-MS é possível obter baixos limites de detecção, sendo considerada uma técnica sensível e seletiva. Um aspecto crítico do CG-MS é a seleção do tipo de injetor, uma vez que é observada alta discriminação dos HPAs de alto peso molecular quando comparado com os de médio e baixo peso. Tal fato pode ser

causado por uma injeção com transferência desigual dos analitos na coluna, o que pode ser reduzido utilizando a técnica de injeção com temperatura programada de vaporização. A discriminação pode ser causada também devida forte interação desses analitos com a fase estacionária<sup>58</sup>.

Várias análises em uma ampla faixa de matrizes complexas vêm sendo realizadas utilizando também CLAE-MS, mas o único modo de ionização que atinge seletividade e sensibilidade adequada aos HPAs é o de fotoionização a pressão atmosférica<sup>58</sup>.

### Levantamento da ocorrência de HPAs em alimentos defumados

Existe uma vasta gama de produtos defumados que são comercializados, e vários estudos mostraram que as concentrações de HPAs em diversos alimentos como bacon, carne de porco e embutidos de carne suína estão elevadas<sup>25,29,41-43,45,46,51,56</sup>.

Na **Tabela 3** estão listadas as concentrações encontradas em amostras de carnes e derivados defumados (bovinos, suínos e pescados) de diversas referências para o BaP, os 4 HPAs prioritários, a soma destes e a soma de diversos HPAs analisados.

**Tabela 3.** Concentrações dos HPAs em diferentes produtos cárneos defumados

Referências	Ano	Produto	BaA (µg/kg)	Cri (µg/kg)	BbF (µg/kg)	BaP (µg/kg)	Σ4 HPAs (µg/kg)	Σtotal (µg/kg)
<b>Bovinos</b>								
Djinovic et al <sup>41</sup>	2008	Presunto de carne bovina (defumado por 15 dias)	2,94	3,68	0,91	1,09	8,62	21,3 (16*) (BaA, Cri, BbF, BkF, BaP, IcP, DhP, BgP, DeP, DiP, DfP, 5mc, DaA, BcF, BjF, Cpp)
Purcaro et al <sup>42</sup>	2009	Carne bovina defumada	0,1	0,4	0,1	<LQ	0,2	10,3 (13*) (Flu, Flt, Fen, Ant, Pir, BaA, Cri, BbF, BkF, BaP, DhP, IcP, BgP)
Chung et al <sup>46</sup>	2011	Carne bovina	-	-	-	<LD	-	<LD
Olatunji et al <sup>49</sup>	2014	Carne bovina defumada	-	-	-	5,34	-	5,34 (1*) (BaP)
<b>Suínos</b>								
Camargo e Toledo <sup>69</sup>	2001	Bacon	0,44	<LD	0,36	0,44	1,24	10,29 (10*)
		Linguiça	0,61	<LD	0,41	0,12	0,65	3,72 (10*)
		Salsicha	<LD	<LD	0,26	0,32	0,58	3,96 (10*)
		Mortadela	<LD	<LD	0,14	0,10	0,24	1,52 (10*) (Flt, Pir, BaA, Cri, BeP, BbF, BkF, BaP, DaA, BgP)
Djinovic et al <sup>41</sup>	2008	Presunto de porco	1,50	1,97	0,49	0,52	4,50	10,2 (16*)
		Bacon sem pele	2,87	3,60	0,91	1,40	8,42	22,7 (16*)
		Bacon com pele	1,45	1,92	0,50	0,55	4,42	12,2 (16*)
		Embutido de carne suína ( <i>cajna</i> )	0,54	0,76	0,25	0,24	1,79	4,4 (16*)
		Embutido de carne suína ( <i>sremska</i> )	1,36	2,11	0,33	0,33	4,13	10,5 (16*) (BaA, Cri, BbF, BkF, BaP, IcP, DhP, BgP, DeP, DiP, DfP, 5mc, DaA, BcF, BjF, Cpp)

Continua na página 15/21

Continuação

Referências	Ano	Produto	BaA (µg/kg)	Cri (µg/kg)	BbF (µg/kg)	BaP (µg/kg)	Σ4 HPAs (µg/kg)	Σtotal (µg/kg)
Purcaro et al <sup>42</sup>	2009	Embutido de carne suína	0,7	1,5	0,8	0,5	3,5	186,1 (13*)
		Bacon defumado	0,1	0,2	0,1	< LQ	0,4	7,8 (13*)
		Carne de porco defumada	< LQ	< LQ	0,1	< LD	0,1	5,1 (13*) (Flu, Flt, Fen, Ant, Pir, BaA, Cri, BbF, BkF, BaP, DhP, IcP, BgP)
Wretling et al <sup>67</sup>	2010	Presunto de porco	19,5	16,7	8,9	13,3	58,4	92,6 (15*)
		Bacon	15,6	17,8	6,1	9,36	48,9	91,6 (15*) (BjP, BgP, DaA, Ant, Pir, BaA, Cri, BbF, BkF, BaP, DhP, IcP, DeP, 5mc, Cpp)
Lorenzo et al <sup>70</sup>	2010	Embutidos de carne suína (Botillo)	0,5	0,9	0,4	0,4	2,2	29,4 (15*)
		Embutidos de carne suína (Androlla)	0,7	1,0	0,5	0,5	2,7	70,9 (15*) (Naf, Flu, Flt, Fen, Ant, Pir, BaA, Cri, BbF, BkF, BaP, DhP, IcP, BgP, DaA)
Roseiro et al <sup>45</sup>	2011	Chouriço grosso (cru)	0,79	0,6	0,55	0,26	2,20	244,34 (16*)
		Chouriço grosso (defumado por 40 dias)	17,98	19,48	3,48	3,53	87,37	3237,1 (16*) (Naf, Flu, Flt, Fen, Ant, AcF, Pir, BaA, Cri, BbF, BkF, BaP, DhP, IcP, BgP, DaA)
Chung et al <sup>46</sup>	2011	Embutido de carne suína	-	-	-	0,08	-	0,08 (1*)
		Presunto de porco	-	-	-	0,03	-	0,03 (1*) (BaP)
Skaljic et al <sup>29</sup>	2014	Embutido de carne suína (Petrovská Klábasa)	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	220 (13*) (Flu, Fen, Ant, AcF, Pir, BaA, Cri, BbF, BkF, BaP, IcP, BgP, DaA)
Surma et al <sup>51</sup>	2014	Presunto de porco	< LD	0,0024	0,0015	0,0022	0,0061	0,026 (12*) (Flu, Fen, Ant, AcF, Pir, BaA, Cri, BbF, BkF, BaP, IcP, DaA)
Lu et al <sup>56</sup>	2017	Bacon	-	-	-	0,9	-	0,9 (1*)
		Embutido de carne suína	-	-	-	0,08	-	0,08 (1*) (BaP)
<b>Pescados</b>								
Wretling et al <sup>67</sup>	2010	Filé de peixe	182,5	168,9	64,1	75,5	491,0	1056,1 (15*) (BjP, BgP, DaA, Ant, Pir, BaA, Cri, BbF, BkF, BaP, DhP, IcP, DeP, 5mc, Cpp)

\*Quantidade de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) analisados



Para as carnes bovinas, apenas o estudo de Olatunji et al<sup>49</sup> apresentou valor de BaP (5,34 µg/kg) acima do limite da legislação (2 µg/kg), os demais autores apresentaram valores de BaP e da soma dos 4 HPAs dentro dos limites permitidos.

Skaljic et al<sup>29</sup>, Wretling et al<sup>67</sup> e Bogdanović et al<sup>68</sup> analisaram produtos suínos como bacon, embutidos de carne suína e presunto, e a maioria das amostras apresentaram concentrações abaixo do valor permitido para BaP e para a soma dos 4 HPAs. Entretanto para o BaP, o presunto (13,3 µg/kg) e o bacon (9,4 µg/kg) analisados por Wretling et al<sup>67</sup>, e o chouriço após defumação de 40 dias (3,5 µg/kg) analisado por Roseiro et al<sup>45</sup> apresentaram concentrações acima do limite. A soma dos 4 HPAs também ultrapassou o valor permitido no presunto (58,4 µg/kg) e bacon (48,9 µg/kg) avaliados por Wretling et al<sup>67</sup>, no chouriço após defumação de 40 dias (42,9 µg/kg) analisado por Roseiro et al<sup>45</sup>. Dentre os HPAs analisados, o BaA e o Cri foram os mais frequentes e em concentrações mais elevadas (**Tabela 3**).

São poucos os trabalhos realizados com pescados defumados, mas os dados apresentados por Wretling et al<sup>67</sup> indicaram que os hidrocarbonetos que apresentaram maiores concentrações foram o BaA (182,5 µg/kg) e o Cri (168,9 µg/kg). A concentração média encontrada para BaP (75,5 µg/kg) está cerca de 35 vezes acima do permitido pela legislação (2 µg/kg), e a concentração para a soma dos 4 HPAs (491 µg/kg) também excedeu o limite estabelecido em 40 vezes (12 µg/kg).

Apesar das concentrações de BaP e a soma dos 4 HPAs estarem dentro do valor permitido pela legislação, a soma do total de HPAs analisados apresentaram valores superiores (**Tabela 3**). No embutido de carne suína analisado por Purcaro et al<sup>42</sup>, a soma de todos os HPAs (AcF, Flt, Naf, BaA, BbF, BaP, BkF, Cri, Aci, Ant, BgP, Flu, Fen, DaA, IcP, Pir) foi de 186,1 µg/kg em contraste com apenas 3,5 µg/kg da soma dos 4 HPAs. Da mesma forma, no embutido de carne suína analisado por Skaljic et al<sup>29</sup>, o valor da soma total (Flu, Fen, Ant, AcF, Pir, BaA, Cri, BbF, BkF, BaP, IcP, BgP, DaA) foi 220 µg/kg enquanto a dos 4 HPAs apresentou-se abaixo do limite de detecção.

Outro fato a ser observado é que as amostras de bacon e presunto de porco analisadas na Suíça

por Wretling et al<sup>67</sup> estavam mais contaminadas que as analisadas por outros autores como Purcaro et al<sup>42</sup>, Chung et al<sup>46</sup>, Lu et al<sup>56</sup>. Possivelmente a maneira de defumação utilizada nesse país é um método tradicional, que combinado com o tipo de carne utilizado, contribuem para uma maior contaminação por HPAs.

Para prever o efeito do tempo de defumação do alimento na contaminação por HPAs, o trabalho de Roseiro et al<sup>45</sup> avaliou amostras de chouriço em diferentes dias de defumação (14, 22, 30 e 40). No 14º dia, a concentração de BaP foi de 0,68 µg/kg e a soma dos 4 HPAs prioritários de 6,35 µg/kg, já no 40º eram de 3,5 µg/kg e 42,9 µg/kg (acima dos valores permitidos pela legislação). Logo, pode-se concluir que quanto maior a duração da defumação, maior será a quantidade de HPAs presente.

No Brasil, não há estudos recentes sobre a ocorrência de HPAs em produtos cárneos defumados e derivados, e no único trabalho realizado por Camargo e Toledo<sup>69</sup> os valores de BaP e para a soma dos 4 HPAs em bacon, linguiça, salsicha e mortadela estavam todos abaixo do permitido pela legislação europeia. Entretanto, apresentou maior concentração de outros HPAs, sendo a soma dos HPAs analisados variando de 1,52-10,29 µg/kg.

### **Maneiras de reduzir a contaminação por HPAs em carnes defumadas e derivados**

Apesar da ocorrência de contaminação por HPAs em carnes e derivados defumados, os benefícios da defumação para a prevenção da deterioração e contaminação biológica são relevantes, por isso a Comissão do *Codex Alimentarius* (CAC 68/2009) indicou as variáveis a serem controladas para minimizar a formação de HPAs nesse processo, dentre elas o método (direto ou indireto), o tipo de combustível, a temperatura empregada, o designer da câmara de defumação e a técnica utilizada para produção da fumaça<sup>28</sup>.

Utilizando o método industrial (indireto) é possível reduzir a contaminação dos HPAs. Wretling et al<sup>67</sup> analisaram várias amostras de carnes defumadas e derivados e aquelas que foram defumadas pelo método indireto apresentaram valores de HPAs inferiores às defumadas pelo método tradicional.

O tipo de combustível influencia na quantidade de HPAs no alimento final, uma vez que estudos mostraram que a utilização de cascas de macieira e amieiro geraram menores quantidades de HPAs do que as que utilizaram madeira de abeto vermelho<sup>28</sup>.

A contaminação por HPAs depende da temperatura usada na queima do combustível uma vez que, de acordo com Ledesma et al<sup>25</sup> (2015 *apud* Toth e Blaas, 1972), a quantidade de HPAs na fumaça durante a pirólise aumenta linearmente com o incremento da temperatura no intervalo de 400-1000 °C.

A distância e posição da carne ou derivado da fonte de fumaça também influenciam na quantidade de HPAs presentes. De acordo com Roseiro et al<sup>45</sup>, a concentração diminui com o aumento da distância entre o alimento e a fonte.

Existem novas tecnologias para produção da fumaça de defumação utilizando método indireto. Foi observado que a técnica de fricção apresentou as menores concentrações de HPAs quando comparada com as outras técnicas, como fumaça fria, fumaça quente, por toque, entre outras Ledesma et al<sup>28</sup> (2016 *apud* Pohlmann et al, 2016).

O aroma de fumaça também pode ser uma alternativa para reduzir a contaminação por HPAs. Entretanto, deve-se considerar o tipo de madeira utilizada para produzir o aroma de fumaça uma vez que, no trabalho de Ledesma et al<sup>28</sup>, o aroma produzido com madeira álamo (*Populus* spp.) apresentou concentrações elevadas de HPAs.

## CONCLUSÃO

Vários métodos de extração, limpeza e quantificação de HPAs em produtos cárneos defumados e derivados são descritos na literatura. A escolha da metodologia empregada depende da matriz, dos materiais e insumos disponíveis, do custo, entre outros fatores, mas as etapas mais comuns na análise de HPAs em cárneos incluem: saponificação metanólica com KOH, seguida de ELL com n-hexano ou ciclohexano, limpeza com cartucho de extração de sílica e quantificação por cromatografia em CG-MS ou CLAE-FLD. No decorrer dos anos, verificou-se uma redução de insumos utilizados, como solventes, visando reduzir custos e tempo de análise, e é crescente a utilização

do QuEChERS considerando a praticidade e os inúmeros benefícios relacionados.

Em geral, as amostras de carnes defumadas apresentam valores dentro do limite estipulado pela legislação da Comunidade Europeia para BaP e a soma dos 4 HPAs, entretanto foram observados níveis elevados de HPAs em alguns grupos como produtos suínos e pescados. No Brasil, há poucos dados referentes a esses produtos e não há legislação específica para os mesmos, justificando a importância da realização de pesquisas sobre a ocorrência de HPAs nestes alimentos.

Como forma de reduzir a contaminação de produtos cárneos por HPAs, podem ser utilizados métodos indiretos na defumação, como a produção da fumaça por fricção, uso de combustíveis que formem menos HPAs, como cascas de macieiro e amieiro, ou a utilização de aromas de fumaça produzidos com estes materiais.

## REFERÊNCIAS

1. Lawal AT. Polycyclic aromatic hydrocarbons. A review. *Cogent Environ Sci*. 2017;3(1):1339841. <https://doi.org/10.1080/23311843.2017.1339841>
2. Abdel-Shafy HI, Mansour MSM. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egypt J Petrol*. 2016;25(1):107-23. <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.03.011>
3. International Agency for Research on Cancer (IARC). Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, overall evaluation of carcinogenicity. Some Non-heterocyclic Polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. V. 92. Lyon: IARC; 2010.
4. International Agency for Research on Cancer (IARC). Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, overall evaluation of carcinogenicity. Chemical agents and related occupations. 100F. Lyon: IARC; 2012.
5. Purcaro G, Moret S, Conte LS. Overview on polycyclic aromatic hydrocarbons: occurrence, legislation and innovative determination in foods. *Talanta*, 2013;105:292-305. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.10.041>

6. Domingo JL, Nadal M. Human dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the scientific literature. *Food Chem Toxicol*. 2015;86:144-53. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.10.002>
7. Garcia LPA, Gonçalves BL, Scussel VM. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em alimentos: uma revisão. *PUBVET*. 2014;8(19):2292-450.
8. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. EMBRAPA suínos e aves [Internet]. Santa Catarina, 2016. [acesso 2018 Ago 26]. Disponível em: <https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas>
9. Pesquisa de orçamentos familiares 2008–2009: análise do consumo alimentar pessoal no Brasil/IBGE, Coordenação de Trabalho e Rendimento [Internet]. Rio de Janeiro (RJ): IBGE; 2011. [acesso 2018 Ago 26]. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv50063.pdf>
10. Morado CN. Avaliação da qualidade ambiental da bacia do rio Paraíba do Sul e reservatório do Funil, sudeste, Brasil, utilizando biomarcadores e bioindicadores em peixes. [dissertação de mestrado]. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro;2008. Disponível em: <https://tede.ufrjr.br/jspui/handle/tede/192>
11. Netto ADP, Moreira JC, Dias AEXO, Arbilla G, Ferreira LFV, Oliveira AS et al. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitrados (NHPAs): uma revisão metodológica. *Quim Nova*. 2000;23(6):765-73. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422000000600010>
12. Villar-Navarro M, Martín-Valero MJ, Fernández-Torres RM, Callejón-Mochón M, Bello-López MA. Easy, fast and environmental friendly method for the simultaneous extraction of the 16 EPA PAHs using magnetic molecular imprinted. *J Chromatogr B*. 2017; 1044/1045:63-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.12.009>
13. Kim KH, Jahan SA, Kabir E, Brown RJC. A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environ Int*. 2013;60:71-80. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2013.07.019>
14. Strickland P, Kang D. Urinary 1-hydroxypyrene and other PAH metabolites as biomarkers of exposure to environmental PAH in air particulate matter. *Toxicol Lett*. 1999;108(2-3):191-9. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4274\(99\)00089-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4274(99)00089-2)
15. Tsai P, Shieh HY, Lee WJ, Lai SO. Characterization of PAHs in the atmosphere of carbon black manufacturing workplaces. *J Hazard Mater*. 2002;91(1-3):25-42. [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3894\(01\)00384-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3894(01)00384-3)
16. Tsai PJ, Shih TS, Chen HL, Lee WJ, Lai CH, Liou SH. Assessing and predicting the exposures of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their carcinogenic potencies from vehicle engine exhausts to highway toll station workers. *Atmos Environ*. 2004;38(2):333-43. <http://dx.doi.org/10.1016/j.atmosenv.2003.08.038>
17. Azeredo A, Toledo MCF, Camargo MCR. Determinação de benzo(a)pireno em pescados. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2006;26(1):89-93. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612006000100015>
18. Azeredo M. Determinação de benzo(a)pireno em pescados comercializados em Campinas-SP. [dissertação de mestrado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas;2001. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/254999>
19. Silva SAD, Sampaio GR, Torres EAFDS. Optimization and validation of a method using UHPLC-fluorescence for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in cold-pressed vegetable oils. *Food Chem*. 2017;221:809-14. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.098>
20. Singh L, Varshney JG, Agarwal T. Polycyclic aromatic hydrocarbons' formation and occurrence in processed food. *Food Chem*. 2016; 199:768-81. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.074>
21. Chávez IPA. Dos teores de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em aguardentes acondicionadas em tonéis de carvalho. [dissertação de mestrado]. São Carlos (SP): Universidade de São Paulo;2015. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75135/tde-16062015-092624/pt-br.php>
22. Rose M, Holland J, Dowding A, Petch S, White S, Fernandes A et al. Investigation into the formation of PAHs in foods prepared in the home to determine the effects of frying, grilling, barbecuing, toasting and roasting. *Food Chem Toxicol*. 2015;78:1-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2014.12.018>

23. Martorell I, Perelló G, Martí-Cid R, Castell V, Llobet JM, Domingo JL. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in foods and estimated PAH intake by the population of Catalonia, Spain: temporal trend. *Environ Int*. 2010;36(5):424-32. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2010.03.003>
24. Sun Y, Wu S, Gong G. Trends of research on polycyclic aromatic hydrocarbons in food: a 20-year perspective from 1997 to 2017. *Trends Food Sci Technol*. 2019;83:86-98. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2018.11.015>
25. Ledesma E, Rendueles M, Díaz M. Spanish smoked meat products: benzo(a)pyrene (BaP) contamination and moisture. *J Food Compos Anal*. 2015;37:87-94. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2014.09.004>
26. Ghasemzadeh-Mohammadi V, Mohammadi A, Hashemi M, Khaksar R, Haratian P. Microwave-assisted extraction and dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry for isolation and determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked fish. *J Chromatogr A*. 2012;1237:30-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.02.078>
27. Silva JH. Aspectos tecnológicos relacionados à fabricação de bacon [trabalho de conclusão]. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande Do Sul;2010. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/28414>
28. Ledesma E, Rendueles M, Díaz M. Contamination of meat products during smoking by polycyclic aromatic hydrocarbons: Processes and prevention. *Food Control*. 2016;60:64-87. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.07.016>
29. Skaljic S, Petrovic L, Tasic T, Lkonic P, Jokanovic M, Tomovic V et al. Influence of smoking in traditional and industrial conditions on colour and content of polycyclic aromatic hydrocarbons in dry fermented sausage "Petrovská klobása" from Serbia. *Food Control*. 2014;40:12-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.11.024>
30. Alakali JS, Adekoyeni OO, Alaka IC, Faasema J, Torvor T. Fabrication and performance evaluation of a hybrid fish smoking kiln. *J Food Process Preserv*. 2016;41:e12935. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12935>
31. Stumpe-Viksna I, Bartkevics V, Kukare A, Morozovs A. Polycyclic aromatic hydrocarbons in meat smoked with different types of wood. *Food Chem*. 2008;110(3):794-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.03.004>
32. Commission of the European Communities. Commission Regulation (EC) N° 2065/2003 of the European Parliament and of the Council of 10 November 2003 on smoke flavourings used or intended for use in or on foods. *Official J Eur Union*. 2003;L309:1-8.
33. Commission of the European Communities. Regulation (EC) N° 1881/2006 of Commission of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official J Eur Union*. 2006;L364:5-24.
34. European Food Safety Authority (EFSA). Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain on a request from the european commission on PAHs in food. *Eur Food Safety Authority J*. 2008; 724:1-114.
35. Commission of the European Communities. Regulation (EC) N° 835/2011 of Commission of 19 August 2011 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels for polycyclic aromatic hydrocarbons in foodstuffs. *Official J Eur Union*. 2011;L215:4-8.
36. Commission of the European Communities. Regulation (EC) N° 1327/2014 of Commission of 12 December 2014 amending Regulation (EC) No 1881/2006 s regards maximum levels of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in traditionally smoked meat and meat products and traditionally smoked fish and fishery products. *Official J Eur Union*. 2014;L358:13-4.
37. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007. Regulamento técnico sobre aditivos aromatizantes. *Diário Oficial da União, Brasília, DF*, 15 jan 2007. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC\\_02\\_2007\\_COMP.pdf/c966caff-1c19-4a2f-87a6-05f7a09e940b](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_02_2007_COMP.pdf/c966caff-1c19-4a2f-87a6-05f7a09e940b)
38. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria de Consolidação nº 5, de 28 de setembro de 2017. Consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde. *Diário Oficial da União, Brasília, DF*,



- 03 out 2017. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/marco/29/PRC-5-Portaria-de-Consolida----o-n---5--de-28-de-setembro-de-2017.pdf>
39. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 281, de 06 de outubro de 2003. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 08 out. 2003. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/393845/Resolucao\\_RDC\\_n\\_281\\_de\\_06\\_de\\_outubro\\_de\\_2003.pdf/37e5b459-5f82-4a8b-8da7-ba29d4408174/](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/393845/Resolucao_RDC_n_281_de_06_de_outubro_de_2003.pdf/37e5b459-5f82-4a8b-8da7-ba29d4408174/)
40. Association of Official Analytical Chemistry (AOAC). Official Methods of Analysis. AOAC 973.30. Polycyclic aromatic hydrocarbons and benzo[a]pyrene in food. 20th. Washington (DC): Association of Analytical Chemists;2015.
41. Djinic J, Popovic, A, Jira, W. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in different types of smoked meat products from Serbia. *Meat Sci*. 2008;80(2):449-56. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.01.008>
42. Purcaro G, Moret S, Conte LS. Optimisation of microwave assisted extraction (MAE) for polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) determination in smoked meat. *Meat Sci*. 2009;81(1):275-80. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.08.002>
43. Gómez-Ruiz JA, Cordeiro F, López P, Wenzl T. Optimisation and validation of programmed temperature vaporization (PTV) injection in solvent vent mode for the analysis of the 15+1 EU-priority PAHs by GC-MS. *Talanta*. 2009;80(2):643-50. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2009.07.041>
44. Farhadian A, Jinap S, Hanifah HN, Zaidul IS. Effects of meat preheating and wrapping on the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in charcoal-grilled meat. *Food Chem*. 2011;124(1):141-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.116>
45. Roseiro LC, Gomes A, Santos C. Influence of processing in the prevalence of polycyclic aromatic hydrocarbons in a Portuguese traditional meat product. *Food Chem Toxicol*. 2011;49(6):1340-5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2011.03.017>
46. Chung SY, Yettella RR, Kim JS, Kwon K, Kim MC, Min DB. Effects of grilling and roasting on the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in beef and pork. *Food Chem*. 2011;129(4):1420-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.092>
47. Jahurul MHA, Jinap S, Zaidul ISM, Sahena F, Farhadian A, Hajeb P. Determination of fluoranthene, benzo[b]fluoranthene and benzo[a]pyrene in meat and fish products and their intake by Malaysian. *Food Biosci*. 2013;1:73-80. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbio.2013.03.006>
48. Kumosani TA, Moselhy SS, Asseri AM, Asser AH. Detection of polycyclic aromatic hydrocarbons in different types of processed foods. *Toxicol Ind Health*. 2013;29(3):300-4. <http://dx.doi.org/10.1177/0748233711433936>
49. Olatunji OS, Fatoki OS, Opeolu BO, Ximba BJ. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons [PAHs] in processed meat products using gas chromatography – Flame ionization detector. *Food Chem*. 2014;156:296-300. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.120>
50. Chen Y, Shen G, Su S, Shen H, Huang Y, Li T et al. Contamination and distribution of parent, nitrated, and oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2014;21(19):11521-30. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-014-3129-8>
51. Surma M, Sadowska-Rociek A, Cieslik E. The application of d-SPE in the QuEChERS method for the determination of PAHs in food of animal origin with GC-MS detection. *Eur Food Res Technol*. 2014;238(6):1029-36. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2181-4>
52. Association of Official Analytical Chemistry (AOAC). Official Methods of Analysis. AOAC 2014.08. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Seafood. 20th. Washington (DC): Association of Analytical Chemists; 2015.
53. Khorshid M, Souaya ER, Hamzawy AH, Mohammed MN. QuEChERS Method followed by solid phase extraction method for gas chromatographic-mass spectrometric. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in fish. *Int J Anal Chem*. 2015;2015: ID 352610. <https://doi.org/10.1155/2015/352610>
54. Chatterjee NS, Utture S, Banerjee K, Shabeer TA, Kamble N, Mathew S et al. Multiresidue analysis of multiclass pesticides and polyaromatic

- hydrocarbons in fatty fish by gas chromatography tandem mass spectrometry and evaluation of matrix effect. *Food Chem*. 2016;196:1-8. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.014>
55. Zachara A, Galkowska D, Juszcak L. Contamination of smoked meat and fish products from Polish market with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Food Control*. 2017;80:45-51. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.04.024>
56. Lu F, Kuhnle GK, Cheng Q. Heterocyclic amines and polycyclic aromatic hydrocarbons in commercial ready-to-eat meat products on UK market. *Food Control*. 2017;73(B):306-15. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.08.021>
57. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO). Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos. DOQ-CGRE-008. Revisão 7, 2018. [acesso 2018 Ago 27]. Disponível em: [http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc\\_organismos.asp?tOrganismo=CalibEnsaio](http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc_organismos.asp?tOrganismo=CalibEnsaio)
58. Zelinkova Z, Wenzl T. The Occurrence of 16 EPA PAHs in food – a review. *Polycycl Aromat Compd*. 2015;35(2-4):248-84. <https://doi.org/10.1080/10406638.2014.918550>
59. National Institute of Standards and Technology (NIST). Standard Reference materials. SRM 1974. 2018. [acesso 2018 Ago 27]. Disponível em: [https://www-s.nist.gov/srmors/view\\_detail.cfm?srm=1974](https://www-s.nist.gov/srmors/view_detail.cfm?srm=1974)
60. National Institute of Standards and Technology (NIST). Standard Reference materials. SRM 2974a. 2018. [acesso 2018 Ago 27]. Disponível em: [https://www-s.nist.gov/srmors/view\\_detail.cfm?srm=2974a](https://www-s.nist.gov/srmors/view_detail.cfm?srm=2974a)
61. Grimmer G, Bohnke H. Polycyclic aromatic hydrocarbon profile of high-protein foods, oils, and fats by gas chromatography. *J Assoc Off Anal Chem*. 1975;58(4):725-33.
62. Brasseur C, Brose F, Pirlot A, Douny C, Eppe G, Maghuin-Rogister G. Validation of the analytical procedure for the determination of polyaromatic hydrocarbons in smoke flavourings using high performance liquid chromatography coupled to an ultraviolet, diode array or fluorescence detector. *Accred Qual Assur*. 2007;12(10):535-42. <https://doi.org/10.1007/s00769-007-0295-0>
63. Kim L, Lee D, Cho HK, Choi SD. Review of the QuEChERS method for the analysis of organic pollutants: persistent organic pollutants, polycyclic aromatic hydrocarbons, and pharmaceuticals. *Trends Environ Anal Chem*. 2019;22:e00063. <https://doi.org/10.1016/j.teac.2019.e00063>
64. Part of avantor- VWR. Cromatografia, colunas-extração líquido-líquido Extrelut. [acesso 2018 Ago 27]. Disponível em: <https://pt.vwr.com/store/product/551127/extracao-liquido-liquido-extrelut-nt>
65. Kumar S, Negi S, Maiti P. Biological and analytical techniques used for detection of polyaromatic hydrocarbons. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2017;24(33):25810–27. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0415-2>
66. Joseph M. HPLC detector options for the determination of polynuclear aromatic hydrocarbons. Varian Application Note. [acesso 2018 Ago 27]. Disponível em: <https://www.agilent.com/cs/library/applications/lc07.pdf>
67. Wretling S, Eriksson A, Eskhult GA, Larsson B. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in swedish smoked meat and fish. *J Food Compos Anal*. 2010;23(3):264-72. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2009.10.003>
68. Bogdanović T, Pleadin J, Petričević S, Listeš E, Sokolić D, Marković K et al. The occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in fish and meat products of Croatia and dietary exposure. *J Food Compos Anal*. 2019;75:49-60. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.09.017>
69. Camargo RMC, Toledo MCF. Dietary polycyclic aromatic hydrocarbon intakes in some Brazilian metropolitan areas. *Rev Bras Toxicol*. 2001;14(2):23-30.
70. Lorenzo JM, Purriños L, Fontán MCG, Franco D. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in two spanish traditional smoked sausage varieties: “Androlla” and “Botillo”. *Meat Sci*. 2010;86(3):660-4. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.05.032>





# Concentrações de nitrato em águas de abastecimento público de 88 municípios da Rede Regional de Atenção à Saúde 13 do estado de São Paulo, Brasil

## Concentrations of nitrate in the public water supply of 88 municipalities of the Regional Health Care Network 13 of the São Paulo State, Brazil

RIALA6/1765

Sergio DOVIDAUSKAS\*, Isaura Akemi OKADA, Maria Helena IHA, Álvaro Gennari CAVALLINI

\*Endereço para correspondência: Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas, Centro de Laboratório Regional Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto VI. Rua Minas nº 877, Ribeirão Preto, SP, Brasil, CEP: 14085-410. Tel: 16 3625 5046. E-mail: [sergio.dovidauskas@ial.sp.gov.br](mailto:sergio.dovidauskas@ial.sp.gov.br)

Recebido: 19.03.2018 - Aceito para publicação: 28.12.2018

### RESUMO

Este trabalho apresenta as concentrações de nitrato e suas correlações com as demais variáveis obtidas da análise de 21 parâmetros físico-químicos em 4.347 amostras de águas de abastecimento público de 88 municípios da região nordeste do Estado de São Paulo, Brasil. Os parâmetros analisados foram temperatura, pH, cloro residual livre, cor aparente, turbidez, condutividade e concentrações de lítio, sódio, amônio, potássio, cálcio, magnésio, fluoreto, clorito, bromato, cloreto, brometo, clorato, nitrato, fosfato e sulfato. Análises de componentes principais, incluindo-se as variáveis condutividade e concentrações de nitrato, cloreto, cálcio e magnésio na água, indicaram um grupo de 15 municípios com concentrações relevantes de nitrato. Foi realizada a análise univariada, e foi sugerido o estabelecimento de estratégias no gerenciamento inicial de contaminações de águas subterrâneas. No planejamento de ações entre os diversos atores envolvidos com a gestão da água subterrânea destinada ao consumo humano da região e no monitoramento de sua qualidade, devem ser considerados os níveis de nitrato, assim como os perfis físico-químicos das águas e a complexidade dos sistemas de abastecimento. Estas ações incluem procedimentos para investigar e mitigar contaminações, para garantir a potabilidade da água consumida pela população.

**Palavras-chave.** nitrato, água potável, vigilância sanitária, análise de componentes principais.

### ABSTRACT

This paper presents the nitrate concentrations and their correlations with other variables obtained by analyzing 21 physical-chemical parameters in 4,347 samples from public water supply of 88 municipalities in the northeast region of the State of São Paulo, Brazil. The analyzed parameters were temperature, pH, free residual chlorine, apparent color, turbidity, conductivity, and concentrations of lithium, sodium, ammonium, potassium, calcium, magnesium, fluoride, chlorite, bromate, chloride, bromide, chlorate, nitrate, phosphate, and sulfate. The principal component analysis, involving the conductivity and the concentrations of nitrate, chloride, calcium, and magnesium, showed a group of 15 municipalities with relevant concentrations of nitrate. As for the univariate analysis it is suggested to apply strategies in the initial management of groundwater contaminations. It has been suggested to plan the actions among the various actors involved in the management of groundwater, which is intended for human consumption in the region, and for its quality monitoring. It has to consider not only the nitrate levels but also the water physical-chemical profiles and the complexity of the supply systems. These actions include the contaminants investigation and mitigation for ensuring the potability of the water consumed by the population.

**Keywords.** nitrate, drinking water, sanitary surveillance, principal component analysis.

## INTRODUÇÃO

O acesso à água potável é um direito humano e um dos principais fatores para o desenvolvimento de uma política eficiente de proteção à saúde<sup>1</sup>. Neste sentido, o Programa Nacional de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano (Vigiagua)<sup>2</sup> desenvolve ações de vigilância que garantam à população o acesso à água em quantidade suficiente e qualidade compatível com o padrão de potabilidade estabelecido na legislação vigente<sup>3</sup>. Entre estas ações estão o monitoramento contínuo da qualidade da água e a avaliação sistemática das informações obtidas.

No Estado de São Paulo, o monitoramento e a avaliação da qualidade da água são realizados por meio do Programa de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano (Proagua)<sup>4</sup>, que inclui as análises de oito parâmetros: temperatura, pH, cloro residual livre (CRL), cor aparente, turbidez, concentração de fluoreto, coliformes totais e *Escherichia coli*. No Proagua, as amostras são coletadas por agentes das Vigilâncias Sanitárias Municipais (VISA-M), que realizam também as medidas de temperatura, pH e CRL no momento da coleta. As amostras são então encaminhadas a laboratórios onde os demais parâmetros são analisados.

Em particular, neste Estado existe preocupação com relação à presença de nitrato em águas de abastecimento, uma vez que contaminações de mananciais subterrâneos tem sido reportadas, como as ocorridas nos municípios de Marília<sup>5</sup>, Presidente Prudente<sup>6</sup>, Monte Azul Paulista<sup>7</sup> e Severínia<sup>8,9</sup>. O interesse da Saúde Pública frente à presença deste íon em águas destinadas ao consumo humano deve-se à ocorrência de metemoglobinemia em crianças até três meses de idade (“síndrome do bebê azul”): segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS)<sup>1</sup>, estudos epidemiológicos não reportaram metemoglobinemia em áreas em que a água potável continha menos do que 50 mg L<sup>-1</sup> de nitrato, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (ou 11 mg L<sup>-1</sup>, se expresso como nitrogênio-nitrato, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). A legislação brasileira vigente<sup>3</sup> estabelece que o valor máximo permitido (VMP) de nitrogênio-nitrato em águas destinadas ao consumo humano é 10 mg L<sup>-1</sup> (neste trabalho, as concentrações de nitrato serão expressas em nitrogênio-nitrato).

É preciso ressaltar que a ingestão de nitrato não ocorre somente por meio da água, mas também pelo consumo de vegetais e carnes, sendo que, em

seres humanos, cerca de 25% do nitrato ingerido é recirculado na saliva e, dessa fração, 20% é convertido a nitrito pela ação de bactérias presentes na boca. Esta transformação nitrato-nitrito promovida por bactérias não ocorre significativamente no estômago, exceto em indivíduos com baixa acidez gástrica ou com infecções gastrointestinais. No sangue, a maior parte do nitrito gerado no organismo e daquele que foi ingerido diretamente a partir dos alimentos e da água, é oxidado a nitrato, mas uma parte pode reagir com a hemoglobina. Dessa maneira, a metemoglobinemia é consequência da reação de nitrito com a hemoglobina nas células vermelhas do sangue, produzindo a metemoglobina que se liga fortemente ao oxigênio sem o liberar posteriormente, prejudicando, assim, o seu transporte. Altos níveis de metemoglobina (maiores que 10%) podem ocasionar cianose: o risco é maior para as crianças até três meses de idade, uma vez que o sistema enzimático para o reparo metemoglobina-hemoglobina (metemoglobina redutase dependente de NADH) ainda está em formação e é alta a relação entre a ingestão de água e o peso corpóreo<sup>10</sup>.

Além da ocorrência de metemoglobinemia, também tem sido investigada uma possível correlação positiva entre risco de ocorrência de câncer e a ingestão de quantidades elevadas de nitrato/nitrito e de compostos nitrosáveis (como as aminas secundárias). A reação de nitrito com estes compostos poderia formar substâncias carcinogênicas<sup>10</sup>.

Neste contexto, e visando uma descrição mais detalhada da qualidade das águas de abastecimento público da região nordeste do Estado de São Paulo (Brasil), um estudo envolveu 88 municípios dos quatro departamentos Regionais de Saúde (Araraquara, Barretos, Franca e Ribeirão Preto) que fazem parte da Rede Regional de Atenção à Saúde 13. A estes departamentos estão vinculados os respectivos Grupos de Vigilância Sanitária que coordenam as ações das VISA-M, que são as responsáveis pelo encaminhamento periódico de amostras de águas para análise neste laboratório, após as medidas de pH, CRL e temperatura. No estudo, ampliou-se para 23 o número de parâmetros investigados pelo Proagua: além dos oito citados, durante um ano foram realizadas também medidas de condutividade e determinações das concentrações dos íons lítio, sódio, amônio, potássio, cálcio, magnésio, clorito, bromato, cloreto, brometo, clorato, nitrato, fosfato e sulfato. Os resultados das análises de

componentes principais (ACP) e de agrupamento hierárquico (AHA), considerando 12 variáveis físico-químicas, mostraram que os 88 municípios poderiam ser divididos em seis grupos, de acordo com as variáveis proeminentes que apresentavam: além de um grupo de um único elemento (o município de Ibitinga, cujas águas de abastecimento apresentaram um perfil físico-químico singular na região)<sup>11</sup>, observaram-se os grupos “típico” (este grupo não apresentou variáveis proeminentes no modelo utilizado), “lítio e sódio” (concentrações de lítio e sódio como variáveis proeminentes), “cloreto” (concentração de cloreto como variável proeminente), “sulfato” (concentração de sulfato como variável proeminente) e “nitrato” (concentração de nitrato como variável proeminente)<sup>12</sup>. O presente trabalho focaliza a atenção sobre as águas de abastecimento dos municípios deste último grupo (o “grupo do nitrato”), discutindo-as detalhadamente. Até o nosso conhecimento, essa discussão abrangente, que inclui a análise de componentes principais, é inédita para a região nordeste do Estado de São Paulo.

## MATERIAL E MÉTODOS

Objetivando investigar possíveis variações sazonais, a coleta e análise das amostras procurou abranger um período de baixa ocorrência de chuvas (seca, maio a outubro de 2015) e o período imediatamente posterior, historicamente de maiores precipitações de água (chuvas, novembro de 2015 a abril de 2016), totalizando 12 meses de aquisição de dados. Uma vez que as VISA-M são as responsáveis não somente pela coleta das amostras, mas também pelos planos de amostragem, procurou-se não interferir nestes planos. Embora no período total (maio/2015 a abril/2016) tenham sido recebidas, em nosso laboratório, 7.587 amostras do Proagua oriundas de 88 municípios, apenas 4.347 amostras puderam ser analisadas neste estudo em virtude do tempo requerido para cada análise cromatográfica (aproximadamente 38 minutos). Assim, foi necessário realizar uma segunda amostragem sobre as amostras recebidas das VISA-M, observando-se algumas condições: (i) dois foi o número mínimo de amostras por coleta por município; (ii) procurou-se manter uma relação mínima de 1/10.000 entre o número de amostras por mês e o número de habitantes do município; (iii) sempre que possível, amostras foram selecionadas de locais distantes entre si. As 4.347 amostras

analisadas dos 88 municípios envolvidos correspondem aproximadamente a uma população de três milhões de habitantes.

Os reagentes utilizados nas análises de laboratório eram de grau analítico (marcas Sigma-Aldrich<sup>®</sup> e Merck<sup>®</sup>). Na preparação das soluções aquosas utilizou-se água tipo I (sistema de purificação marca Millipore<sup>®</sup>, modelo Milli-Q Direct 8).

A cromatografia dos ânions (F<sup>-</sup>, ClO<sub>2</sub><sup>-</sup>, BrO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, ClO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> e SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) foi realizada em equipamento marca Metrohm<sup>®</sup> modelo 930 Compact IC Flex Oven/SeS/PP/Deg (condições: eluente, solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 3,6 mmol/L; supressor, solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100 mmol/L; vazão, 0,8 mL/min; temperatura 45°C; coluna marca Metrohm<sup>®</sup> modelo Metrosep A Supp 7 250/4.0). A cromatografia dos cátions (Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>) foi realizada em equipamento marca Metrohm<sup>®</sup> modelo 930 Compact IC Flex Deg (condições: eluente, solução de HNO<sub>3</sub> 1,7 mmol/L contendo 0,7 mmol/L de ácido dipicolínico; vazão, 0,9 mL/min; temperatura ambiente; coluna marca Metrohm<sup>®</sup> modelo Metrosep C4 150/4.0). As amostras foram filtradas em filtros 0,45 µm antes da análise cromatográfica. As demais medidas de laboratório foram realizadas nos seguintes equipamentos: cor aparente, equipamento marca Merck<sup>®</sup>, modelo Spectroquant Nova 400; turbidez, equipamento marca Micronal<sup>®</sup>, modelo B250; condutividade, equipamento marca Metrohm<sup>®</sup>, modelo 912.

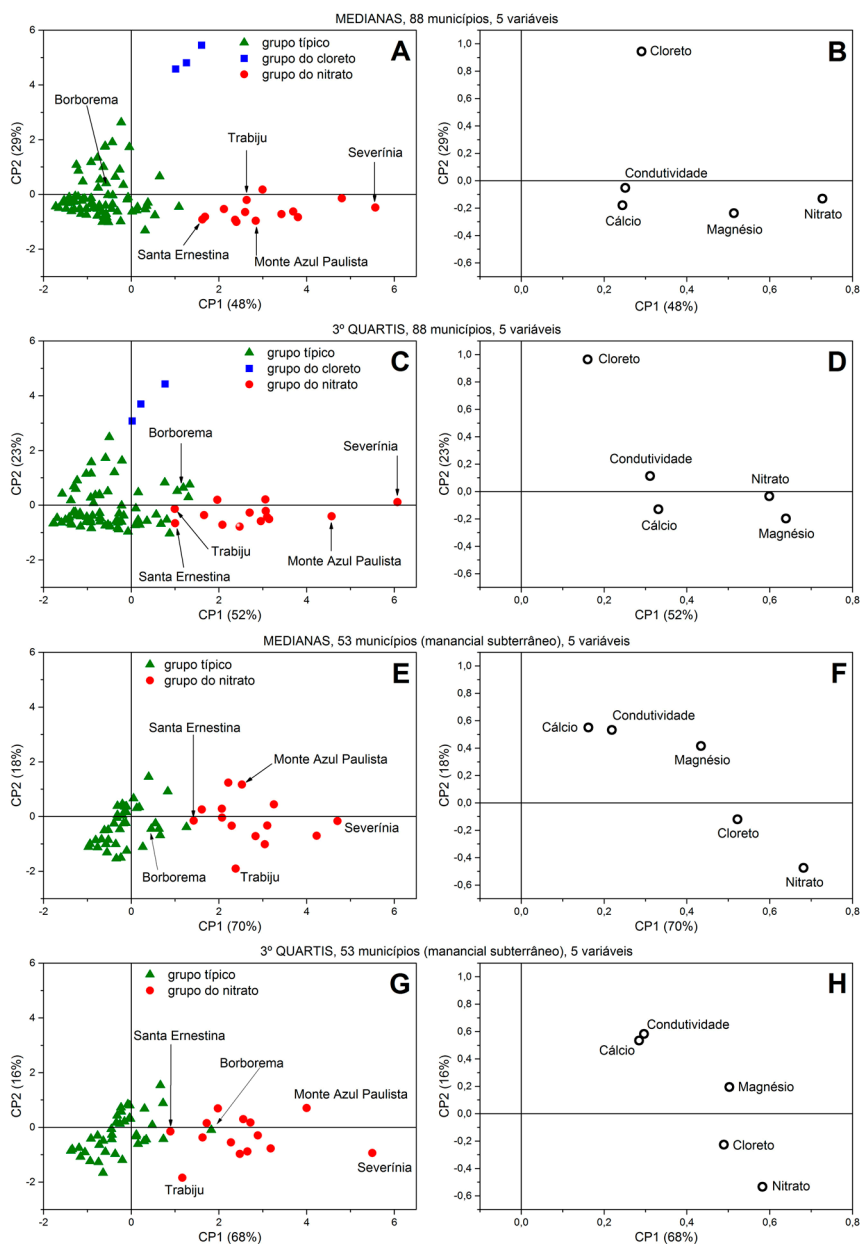
No tratamento e análise dos dados foram utilizados os softwares *Microsoft Excel*<sup>®</sup> 2013, *Origin*<sup>®</sup> 9.1Pro e *The Unscrambler*<sup>®</sup> X 10.3. Nos testes de hipóteses Kolmogorov-Smirnov, Shapiro-Wilk e Mann-Whitney utilizaram-se níveis de significância iguais a 0,05. Como parte do pré-tratamento para a análise multivariada, o número de amostras foi reduzido representando-se cada município pela respectiva série de medianas ou terceiros quartis nas 21 variáveis físico-químicas medidas para as amostras de água. Assim, a matriz de dados inicial 4.347 x 21 foi transformada em uma matriz 88 x 21 (88 municípios x 21 medianas ou terceiros quartis em cada variável).

## RESULTADOS

Resultados obtidos em estudo anterior<sup>12</sup> mostraram que a ACP de 88 municípios da região nordeste do Estado de São Paulo, representados pela série de medianas em cinco variáveis das suas águas de abastecimento (cálcio, cloreto,

condutividade, magnésio e nitrato), produziu um gráfico de escores em que um grupo de 14 municípios se estendeu ao longo da primeira componente principal (CP1, **Figura 1A**), fortemente influenciada pelas concentrações de nitrato e magnésio, conforme indica o gráfico de pesos na **Figura 1B** – este grupo foi denominado “grupo do nitrato”. Em adição, na **Figura 1A** pôde ser observada a formação de dois outros

grupos: um pequeno, de três elementos, em que cloreto foi a variável proeminente (“grupo do cloreto”), e o grupo maior, de 71 elementos, que não apresentaram variáveis proeminentes neste modelo (“grupo típico”). Na **Figura 1A** também estão destacados cinco municípios que serão discutidos com mais detalhes adiante, em virtude de seu comportamento frente a outras ACP realizadas (**Figuras 1C a 1H**).



**Figura 1.** Análises de componentes principais: A e B são os gráficos de escores e de pesos, respectivamente, da análise de 88 amostras (municípios) e 5 variáveis (medianas); C e D são os gráficos de escores e de pesos, respectivamente, da análise de 88 amostras (municípios) e 5 variáveis (terceiros quartis); E e F são os gráficos de escores e de pesos, respectivamente, da análise de 53 amostras (municípios que utilizam apenas manancial subterrâneo) e 5 variáveis (medianas); G e H são os gráficos de escores e de pesos, respectivamente, da análise de 53 amostras (municípios que utilizam apenas manancial subterrâneo) e 5 variáveis (terceiros quartis)

Tanto para o conjunto total de 4.347 amostras de águas analisadas, quanto para um conjunto incluindo apenas aquelas oriundas de manancial subterrâneo (2.247 amostras de 53 municípios), os dados para as cinco variáveis indicadas na **Figura 1B** (nitrato, cálcio, magnésio, cloreto e condutividade) não apresentaram distribuições de Gauss pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. No presente trabalho, este mesmo teste foi aplicado para as distribuições das concentrações de nitrato

nas águas de cada um dos municípios indicados na **Tabela 1**, que inclui Borborema e os 14 municípios do “grupo do nitrato” da **Figura 1A**. A inclusão de Borborema junto aos municípios do “grupo do nitrato” deve-se a sua posição na **Figura 1G**, que será discutida mais adiante. Dos dados exibidos na **Tabela 1**, não apresentaram distribuições de Gauss as concentrações de nitrato obtidas em um ano nas águas dos municípios de Altair, Borborema, Cajobi, Monte Azul Paulista, Severínia e Taquaral.

**Tabela 1.** Medianas e terceiros quartis de cinco variáveis (cálcio, magnésio, cloreto, nitrato e condutividade) dos municípios do grupo do nitrato<sup>12</sup> e de Borborema

Município	Nº hab. (a)	Medianas					Terceiros quartis				
		Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Cond	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Cond
1 Altair	3815	28,0	5,16	6,65	5,15	208,3	28,4	5,22	7,15	5,21	218,4
2 Borborema	14529	5,34	1,23	3,71	0,86	281,6	8,15	2,08	5,82	3,39	408,7
3 Cajobi	9768	16,3	4,26	3,26	3,18	232,8	31,9	6,77	4,06	3,57	242,1
4 Când.Rodrigues <sup>(b)</sup>	2668	18,1	9,27	3,31	1,01	237,7	18,3	9,44	3,54	1,05	238,9
5 Dobrada <sup>(b)</sup>	7939	19,7	3,92	3,95	4,74	187,3	21,9	4,85	4,53	5,41	196,5
6 Igarapava <sup>(b)</sup>	27952	17,0	5,99	3,75	2,04	163,7	17,2	6,07	4,30	2,33	169,3
7 Mte. Az. Paulista	18931	30,8	7,39	3,63	1,87	253,3	37,5	9,85	6,40	4,06	299,5
8 Santa Ernestina <sup>(b)</sup>	5568	20,1	4,18	1,95	2,18	166,4	20,5	4,21	2,12	2,21	173,5
9 Severínia	15501	26,8	7,50	6,56	5,21	251,7	37,9	8,47	8,78	8,80	281,0
10 Taiapu <sup>(b)</sup>	5894	16,4	4,58	3,56	4,19	211,3	20,3	5,61	4,00	5,72	221,3
11 Taiuva <sup>(b)</sup>	5447	18,3	5,93	2,66	1,56	174,1	21,1	7,26	3,26	2,06	193,9
12 Taquaral	2726	22,5	6,01	2,87	2,25	193,3	26,5	6,95	5,81	4,04	217,2
13 Terra Roxa <sup>(b)</sup>	8505	19,5	5,19	6,35	2,99	203,6	19,7	5,23	6,51	3,15	208,2
14 Trabiju <sup>(b)</sup>	1544	7,0	3,09	4,02	4,24	93,7	7,1	3,13	4,06	4,26	95,1
15 Vista A. do Alto <sup>(b)</sup>	6886	24,4	7,91	4,49	3,12	222,5	24,9	8,09	4,69	3,29	244,6

(a) O número de habitantes de cada município foi obtido no censo 2010 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística ([www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br))

(b) municípios cujas águas de abastecimento apresentaram concentrações de nitrato com distribuição de Gauss



Considerando inicialmente que os dados das 4.347 amostras não apresentavam distribuições de Gauss, o cálculo dos coeficientes de correlação de Spearman ( $r_s$ ) para as cinco variáveis físico-químicas da **Figura 1B** indicou que as correlações mais significativas das concentrações de nitrato ocorriam com as concentrações de magnésio e cloreto (segunda coluna da **Tabela 2**). Contudo, a ACP das **Figuras 1A e 1B** e de análises de estudos anteriores<sup>9</sup> indicaram correlação significativa também com os valores de condutividade e com as concentrações de cálcio. De fato, se calcularmos os coeficientes de correlação linear ( $r$ ) para as mesmas variáveis ( $n = 4.347$ ), verifica-se um aumento nos valores para as correlações do nitrato com cálcio, magnésio e condutividade, mas uma diminuição na correlação com o cloreto (terceira coluna da **Tabela 2**). Neste último caso, o baixo valor da correlação nitrato/cloreto pode ser atribuída, pelo menos em parte, a influência de amostras oriundas de mananciais superficiais. Para eliminar essa influência, recalcularam-se  $r_s$  e  $r$  para amostras de águas oriundas apenas de manancial subterrâneo, uma vez que a presença de nitrato é particularmente importante neste tipo de manancial<sup>10</sup>. Assim, para as 2.247 amostras de 53 municípios, os coeficientes de correlação de Spearman aumentaram para nitrato/magnésio, nitrato/cloreto e nitrato/condutividade em relação aos calculados para  $n$  igual a 4.347, mas o valor de  $r_s$  para nitrato/cálcio diminuiu (quarta coluna da **Tabela 2**); em contrapartida, os valores dos coeficientes de correlação linear entre nitrato/cálcio e nitrato/magnésio apresentaram apenas pequenas variações em relação aos valores calculados para  $n$  igual a 4.347, mas os valores de  $r$  entre nitrato/condutividade e entre nitrato/cloreto aumentaram (última coluna da **Tabela 2**); em particular, cite-se que o valor de  $r$  para nitrato/cloreto (igual a 0,806) é próximo ao valor que a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (Cetesb) informa para a mesma correlação no Aquífero Bauru (igual a 0,91)<sup>13</sup>, que é um dos aquíferos utilizados para o abastecimento da região. Dessa maneira, considerando os valores obtidos para as correlações, principalmente para nitrato/cálcio, resolveu-se utilizar o coeficiente

linear  $r$  nas considerações seguintes visto que essa expressão de correlação está mais ajustada ao que se observou nas ACP realizadas e em dados da Cetesb, com a ressalva de que os valores das variáveis podem não apresentar distribuições de Gauss.

**Tabela 2.** Valores dos coeficientes de correlação de Spearman ( $r_s$ ) e linear ( $r$ ) das concentrações de nitrato com os valores de condutividade e com as concentrações de cálcio, magnésio e cloreto

Variável	Coeficientes de correlação com a concentração de nitrato			
	Total de amostras <sup>a</sup> (n <sup>b</sup> = 4.347)		Manancial subterrâneo (n = 2.247)	
	$r_s$	$r$	$r_s$	$r$
Cálcio	0,103	0,337	0,065	0,336
Magnésio	0,378	0,586	0,455	0,600
Cloreto	0,474	0,208	0,707	0,806
Condutividade	0,165	0,273	0,213	0,379

a) Amostras de mananciais subterrâneo e superficial;

b)  $n$  = número de amostras

No intuito de verificar se as distribuições dos dados diferiam nos dois semestres de aquisição de dados (seca e chuvas), realizou-se o teste de Mann-Whitney para as cinco variáveis citadas no parágrafo anterior em três situações: (i) considerando o total de 4.347 amostras, constatou-se que apenas as concentrações de cloreto tinham distribuições significativamente diferentes, com o segundo semestre (chuvas) apresentando maiores valores de primeiro quartil, mediana, terceiro quartil e de valor máximo; (ii) considerando apenas as 2.247 amostras de manancial subterrâneo envolvendo 53 municípios, as cinco variáveis não apresentaram distribuições significativamente diferentes entre os dois semestres (registre-se que, realizando o mesmo teste nessas cinco variáveis considerando as 2.100 amostras de manancial superficial, observou-se novamente que apenas cloreto apresentou distribuições significativamente diferentes entre os dois semestres, com o segundo semestre (chuvas) apresentando maiores valores de mínimo, primeiro



quartil, mediana, terceiro quartil e de valor máximo); (iii) considerando separadamente as amostras de Monte Azul Paulista e Severínia, dois municípios com reconhecida contaminação do manancial subterrâneo por nitrato<sup>7,9</sup>, nenhuma das cinco variáveis apresentou distribuições significativamente diferentes entre os dois semestres.

Como uma alternativa a descrição dos municípios pelas respectivas séries de uma das medidas de tendência central (medianas em cada uma das cinco variáveis, mostrada nas **Figuras 1A e 1B**), neste estudo resolveu-se descrevê-los pelas respectivas séries de terceiros quartis, de modo similar ao realizado pela Cetesb na descrição da evolução da qualidade dos aquíferos<sup>13</sup>. Dessa maneira, procurou-se identificar alguma tendência para valores maiores de concentrações de nitrato tendo-se em mente que, conforme o mesmo estudo citado<sup>12</sup>, o 3º quartil das concentrações de nitrato do total de 4.347 amostras analisadas foi igual a 1,07 mg L<sup>-1</sup>, ou seja, 75% de todas as amostras analisadas apresentaram concentrações de nitrato menores ou iguais a 1,07 mg L<sup>-1</sup>. Assim, a **Figura 1C** exibe a ACP dos 88 municípios representados pelas respectivas séries de terceiros quartis nas cinco variáveis: neste caso, enquanto o município de Severínia permanece como o município de maior escore em CP1, Monte Azul Paulista desloca-se de uma posição central no “grupo do nitrato” obtida na ACP anterior (**Figura 1A**), para a posição correspondente ao segundo maior escore na mesma componente principal (CP1). Por outro lado, os municípios de Santa Ernestina e Trabiju do grupo do nitrato deslocam-se em sentido contrário, aproximando-se do grupo típico, enquanto Borborema parte aproximadamente do centro do grupo típico na parte negativa de CP1 (**Figura 1A**) para a periferia, no sentido positivo de CP1 e em direção ao grupo do nitrato. No que diz respeito aos pesos das variáveis nessa componente principal, a mudança da representação dos municípios de medianas (**Figura 1B**) para terceiros quartis (**Figura 1D**) provocou um aumento no peso da variável magnésio e um aumento na sua correlação  $r$  com a variável nitrato (de 0,58 a 0,64), enquanto os pesos das variáveis cloreto e nitrato diminuíram e os pesos das variáveis cálcio e condutividade sofreram um discreto aumento. Estes fatos estão de acordo com estudos anteriores envolvendo as águas

subterrâneas de Monte Azul Paulista<sup>14</sup> e Severínia<sup>9</sup> nos quais observou-se que a concentração de magnésio é uma variável importante na descrição dos níveis de nitrato em mananciais subterrâneos sofrendo contaminação.

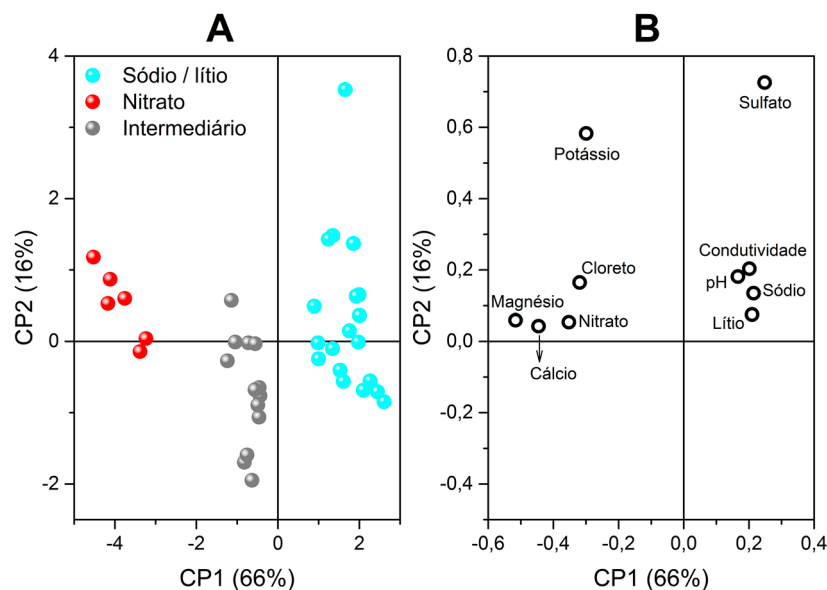
De modo geral, a poluição é particularmente importante no caso de mananciais subterrâneos: devido à lentidão da recarga com água não contaminada, um corpo de água subterrânea pode permanecer poluído por décadas<sup>10,15</sup>. Tendo isso em vista, resolveu-se estudar o grupo do nitrato dentro do conjunto de 53 municípios da região que fazem uso principalmente deste tipo de manancial e a **Figura 1E** exibe a ACP deste conjunto, cada município sendo representado pelas medianas nas mesmas cinco variáveis (condutividade e concentrações de cloreto, cálcio, magnésio e nitrato): pode ser observado que as distribuições dos grupos típico e nitrato é semelhante à da **Figura 1A**, mas o grupo do cloreto está ausente. Este grupo era formado por três municípios (Jaboticabal, Porto Ferreira e Santa Rita do Passa Quatro) que utilizam principalmente manancial superficial para o abastecimento e que, portanto, não foram incluídos na análise da **Figura 1E**. A **Figura 1F** exibe o respectivo gráfico de pesos. Neste gráfico pode-se observar uma mudança de posição da variável cloreto: enquanto as **Figuras 1B e 1D** indicam que essa variável é particularmente importante na definição da segunda componente principal (CP2), a **Figura 1F** mostra que, no modelo envolvendo apenas municípios de manancial subterrâneo, cloreto tem pouca importância em CP2 mas, em contrapartida, seu peso em CP1 torna-se o segundo maior, menor apenas que o peso da variável nitrato: neste modelo, essas duas variáveis estão positiva e fortemente correlacionadas ( $r = 0,86$ ). No que diz respeito ao magnésio, sua correlação com o nitrato neste modelo ( $r = 0,59$ ) é similar à respectiva correlação no modelo ilustrado pelas **Figuras 1A e 1B** (séries de medianas de 88 municípios,  $r = 0,58$ ).

Na **Figura 1G** observamos o gráfico de escores da ACP dos 53 municípios de manancial subterrâneo, agora representados pelas respectivas séries de terceiros quartis. Constata-se um gráfico semelhante ao da **Figura 1C** (sem a presença do grupo do cloreto), com Severínia e Monte Azul Paulista possuindo os maiores escores na CP1, no sentido

em que os pesos das variáveis nitrato, magnésio e cloreto são os maiores (**Figura 1H**); Santa Ernestina tende ao grupo típico, enquanto Trabiju ocupa uma posição intermediária entre os dois grupos (típico e nitrato); Borborema, neste modelo, pertence ao grupo do nitrato. O respectivo gráfico de pesos (**Figura 1H**) indica que permanecem significativas as correlações entre nitrato e cloreto ( $r = 0,82$ ) e entre nitrato e magnésio ( $r = 0,63$ ). A **Tabela 1** exhibe as medianas e terceiros quartis de Borborema e dos municípios do grupo do nitrato para as cinco variáveis consideradas nos quatro modelos exibidos na **Figura 1**. Os 15 municípios da Tabela utilizam manancial subterrâneo para o abastecimento e representam apenas 4,6% da população total dos 88 municípios investigados.

Em estudo anterior<sup>12</sup>, o município de Borborema foi classificado em um grupo cujas variáveis proeminentes eram lítio e sódio. Assim, no intuito de investigar o deslocamento deste município observado principalmente entre as **Figuras 1E e 1G**, realizou-se uma ACP das 38 amostras de Borborema envolvendo tanto as variáveis correlacionadas com a concentração de nitrato (cálcio, magnésio, cloreto e condutividade) como aquelas correlacionadas com a concentração de lítio (sódio, potássio, sulfato, pH e condutividade)<sup>12</sup>, ou seja, a ACP envolveu 38 amostras e 10 variáveis. Pôde ser observada a formação de três

grupos distintos no gráfico de escores (**Figura 2A**): (i) um grupo de seis amostras situa-se à esquerda do gráfico no sentido das variáveis nitrato, cloreto, cálcio e magnésio, conforme indica o gráfico de pesos (**Figura 2B**), e caracterizam-se principalmente por concentrações de nitrato mais elevadas, entre 6,51 e 7,86 mg L<sup>-1</sup> (ou seja, concentrações acima do valor de prevenção estabelecido pela Cetesb), e concentrações relativamente baixas de sódio (entre 13,4 e 15,1 mg L<sup>-1</sup>) e de lítio (entre um valor abaixo do limite de detecção do método<sup>11</sup>, igual a 0,002 mg L<sup>-1</sup>, e um valor máximo de 0,003 mg L<sup>-1</sup>); (ii) um segundo grupo de 19 amostras situa-se em lado oposto ao grupo anterior (**Figura 2A**), no sentido das variáveis sódio, lítio, pH e condutividade (**Figura 2B**), caracterizando-se principalmente pelas baixas concentrações de nitrato (valor máximo igual a 0,44 mg L<sup>-1</sup>), e teores de sódio e lítio mais elevados (entre 78,3 e 105,5 mg L<sup>-1</sup>, e entre 0,003 e 0,013 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente); (iii) um terceiro grupo de amostras ocorre em uma posição intermediária, caracterizado por concentrações intermediárias entre aquelas observadas nos dois grupos anteriores (nitrato, 1,29 a 5,24 mg L<sup>-1</sup>; sódio, 7,1 a 44,1 mg L<sup>-1</sup>; lítio, valor máximo igual a 0,005 mg L<sup>-1</sup>). A formação destes três grupos também foi observada na análise hierárquica de agrupamentos pelo método Ward.



**Figura 2.** Análises de componentes principais de 38 amostras de água de abastecimento público do município de Borborema, em 10 variáveis. A) Gráfico de escores. B) Gráfico de pesos

Focalizando apenas na concentração de nitrato, a **Tabela 3** exibe resumos numéricos das distribuições das concentrações de nitrato obtidas para os 15 municípios da **Tabela 1**. Embora com conteúdo menor de informações, este tipo de tabela pode ser interessante para o diagnóstico de possíveis contaminações por nitrato em águas de abastecimento, tendo em vista que as VISA-M / Laboratórios podem optar por essa abordagem no caso da impossibilidade da determinação simultânea de diversos parâmetros e considerando que concentrações de nitrato podem ser determinadas em ensaios simples de espectrofotometria na

região do ultravioleta<sup>16</sup>. Assim, observa-se nessa **Tabela** que duas concentrações, especificamente em Severínia e Monte Azul Paulista, estão acima do VMP (10 mg L<sup>-1</sup>), e outras 13 apresentam valores entre 5 e 10 mg L<sup>-1</sup>. No que diz respeito às dispersões dos dados representadas pelo intervalo interquartil, constata-se que os resultados de Trabiju e Santa Ernestina possuem apenas pequena variação quando comparados aos resultados de Borborema, por exemplo, como constatado na análise multivariada das **Figuras 1E** (modelo baseado em medianas) e 1G (modelo baseado em terceiros quartis).

**Tabela 3.** Descrição das distribuições das concentrações de nitrato dos 15 municípios do grupo do nitrato, dispostos em ordem decrescente de intervalo interquartil

Município	n <sup>(a)</sup>	mgN-N <sub>3</sub> O L <sup>-1</sup>					
		Mínimo	1º Quartil	Mediana	3º Quartil	Máximo	Interq <sup>(b)</sup>
Severínia	60	0,34	2,63	5,21	8,80	20,0	6,17
Altair	33	0,26	0,32	5,15	5,21	5,26	4,89
Taiacu	33	0,43	1,88	4,19	5,72	7,62	3,84
Borborema	38	< LD <sup>(c)</sup>	< LD <sup>(c)</sup>	0,86	3,39	7,86	3,36
Mte. Az. Paulista	76	0,56	1,17	1,87	4,06	12,7	2,89
Cajobi	25	0,68	0,75	3,18	3,57	3,72	2,82
Taquaral	36	1,33	1,64	2,25	4,04	8,32	2,40
Dobrada	28	0,31	3,27	4,74	5,41	7,61	2,14
Taiuva	32	0,8	1,1	1,56	2,06	6,25	0,96
Vista A. do Alto	34	0,76	2,66	3,12	3,29	7,52	0,63
Igarapava	57	1,77	1,93	2,04	2,33	2,62	0,40
Terra Roxa	30	2,91	2,94	2,99	3,15	3,24	0,21
Santa Ernestina	30	0,05	2,09	2,18	2,21	2,35	0,12
Când. Rodrigues	26	0,97	0,98	1,01	1,05	1,06	0,07
Trabiju	31	4,14	4,2	4,24	4,26	4,31	0,06

(a) n = número de amostras analisadas; (b) Interq = intervalo interquartil; (c) < LD significa “menor que o limite de detecção” (LD = 0,05 mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> L<sup>-1</sup>)<sup>11</sup>

## DISCUSSÃO

Comparando os coeficientes de correlação linear positivos indicados na **Tabela 2**, constata-se que a ocorrência do contaminante nitrato em águas subterrâneas está associada a valores maiores de condutividade e, principalmente, à presença de cloreto. Correlações elevadas entre nitrato e cloreto em amostras de águas do Aquífero Bauru foram reportadas pela Cetesb, e as concentrações elevadas foram atribuídas à atividade antrópica<sup>13</sup>. As correlações nitrato/cálcio e nitrato/magnésio sugerem que a contaminação é favorecida em determinados tipos de solo/manancial<sup>15</sup>.

As distribuições obtidas dos dados no âmbito regional das cinco variáveis (nitrato e as correlacionadas cloreto, cálcio, magnésio e condutividade) não são distribuições de Gauss, seja considerando todas as amostras, seja considerando apenas aquelas oriundas de manancial subterrâneo. Não obstante, observou-se que, em alguns casos, distribuições de Gauss podem ser obtidas quando as amostras se referem a um único município. Estas distribuições podem ser atribuídas, pelo menos em parte, à simplicidade e/ou estratégia dos sistemas de abastecimento, como será discutido mais adiante. Por outro lado, as distribuições indicam que modelos descrevendo ou analisando dados obtidos de águas de abastecimento da região devem utilizar ferramentas estatísticas robustas, como medianas, quartis e testes não paramétricos, por exemplo.

Águas oriundas de mananciais superficiais tendem a apresentar maiores variações em seus parâmetros físico-químicos, incluindo presença de contaminantes, do que mananciais subterrâneos, em função das chuvas uma vez que os subterrâneos demandam maior tempo para recarga dos aquíferos<sup>15</sup>. Contudo, das variáveis testadas, apenas a concentração de cloreto apresentou maiores concentrações no semestre de chuvas nas amostras oriundas de mananciais superficiais. Esta variação sazonal coincide com a previamente descrita para resultados positivos de microrganismos indicadores (coliformes totais e *Escherichia coli*), ou seja, o número de resultados positivos aumentou com o período de chuvas<sup>12</sup>.

Na ACP, no que diz respeito à mudança de

posição da variável cloreto nos gráficos de pesos observada entre os modelos envolvendo todos os 88 municípios (**Figuras 1B e 1D**) e os modelos envolvendo apenas municípios que utilizam principalmente manancial subterrâneo (nestes últimos as variáveis cloreto e nitrato estão positivas e fortemente correlacionadas, como indicam as **Figuras 1F e 1H**), é preciso considerar que parte do cloreto presente nas águas de abastecimento pode ter origem no tratamento das águas captadas para torná-las potáveis (desinfecção por cloração<sup>17</sup>, por exemplo) e parte pode ser oriunda de contaminação: a Cetesb, em seu último relatório da qualidade das águas subterrâneas no Estado, também descreve uma correlação positiva e significativa entre as concentrações de nitrato e cloreto, atribuindo os níveis elevados à atividade antrópica<sup>13</sup>. Dessa maneira, os resultados indicam que modelos multivariados considerando apenas municípios que usam manancial subterrâneo para o abastecimento ressaltam a correlação nitrato/cloreto, corroborando para a detecção de prováveis contaminações.

Em particular, a contaminação do manancial subterrâneo de Monte Azul Paulista já é reconhecida<sup>7</sup>, tendo sido constatado que, dos 30 poços utilizados para o abastecimento público, cinco apresentaram nitrato com concentrações acima do VMP e outros cinco continham concentrações entre 5 e 10 mg L<sup>-1</sup> (a concentração 5 mg L<sup>-1</sup> de nitrogênio-nitrato é considerado pela Cetesb como indicativo para a definição de ações preventivas e regras para aplicação de resíduos em solos agrícolas, nos processos de licenciamento e fiscalização ambiental, enquanto 10 mg L<sup>-1</sup> é o valor de intervenção para gerenciar áreas contaminadas<sup>13</sup>). Esta contaminação determinou a restrição da captação de água na área urbana daquele município a partir do ano de 2013, pelo Departamento de Águas e Energia Elétrica do Estado de São Paulo<sup>18</sup>. Já a contaminação do manancial subterrâneo em Severínia foi descrita recentemente<sup>9</sup> e, a princípio, revela-se de maior impacto ao abastecimento da população quando comparada à situação enfrentada por Monte Azul Paulista uma vez que, dos 16 poços utilizados para o abastecimento, cinco apresentaram concentrações de nitrato acima do VMP e três exibiram concentrações entre 5 e 10 mg L<sup>-1</sup>: desse modo, e

considerando que concentrações de nitrato acima de  $5 \text{ mg L}^{-1}$  revelam um manancial comprometido que requer ações preventivas ou interventivas (caso os níveis elevem-se a  $10 \text{ mg L}^{-1}$ ), verifica-se que 50% dos poços de Severínia estão comprometidos, enquanto em Monte Azul Paulista este índice é de 33%. Assim, as **Figuras 1C e 1G** sugerem que modelos multivariados baseados em terceiros quartis descrevem com mais precisão a situação de municípios que requerem ações interventivas no que se refere aos teores de nitrato em suas águas de abastecimento.

Os deslocamentos observados nas posições dos municípios de Santa Ernestina e Trabiju entre as **Figuras 1A e 1C**, e entre as **Figuras 1E e 1G**, é resultado das pequenas diferenças positivas entre as séries de terceiros quartis e de medianas dos respectivos municípios em relação às séries dos demais, conforme pode ser observado na **Tabela 1**. Essas diferenças relativamente pequenas são resultado, por sua vez, das pequenas dispersões que os resultados individuais apresentaram em função da simplicidade e/ou da estratégia dos sistemas de distribuição de água: segundo o “Atlas do Abastecimento de Água” da Agência Nacional de Águas<sup>19</sup>, o abastecimento em Trabiju é realizado a partir da captação de água de apenas um poço. Santa Ernestina, por sua vez, utiliza cinco poços para o abastecimento mas, de acordo com o mesmo Atlas, as águas captadas são reunidas para o tratamento e posterior reservação. Desse modo, a amostragem tende a representar os níveis de nitrato de uma única fonte de água em cada município, contribuindo para a pequena variabilidade dos dados.

No caso de Borborema, que se deslocou do interior do grupo típico (**Figuras 1A e 1E**, representado por medianas) para a periferia do grupo típico (**Figura 1C**, terceiros quartis) ou para o interior do grupo do nitrato (**Figura 1G**, terceiros quartis), ou seja, em sentido contrário aos deslocamentos observados para Santa Ernestina e Trabiju, o motivo de tal deslocamento é inverso ao destes dois municípios: a série de terceiros quartis apresenta diferenças positivas relativamente grandes em relação à série de medianas (**Tabela 1**), em função das grandes dispersões nos valores de concentrações e condutividades. Para interpretar essas dispersões nos resultados de Borborema, é preciso inicialmente considerar que, segundo a

Agência Nacional de Águas<sup>19</sup>, existem dois sistemas para a distribuição de água em Borborema: o primeiro realiza captação de água de descarga do aquífero (nascente), participando com 9% para o abastecimento, enquanto o segundo, constituído de oito poços, participa com os 91% restantes; existe um reservatório que é alimentado pelo primeiro sistema (água de nascente) e por dois poços do segundo sistema. A **Figura 2** mostra que a dispersão observada nos dados das amostras do município de Borborema pode ser atribuída principalmente à existência de, pelo menos, três perfis físico-químicos de águas de abastecimento diferentes entre si, especialmente no que diz respeito às concentrações de nitrato, sódio e lítio. Dois destes perfis podem estar relacionados aos dois sistemas de abastecimento existentes, enquanto o terceiro pode ser o resultado de uma mistura das águas dos dois sistemas (águas de nascente e de poços).

Na **Tabela 3** observa-se que, à semelhança de Trabiju e Santa Ernestina, pequenas dispersões de resultados foram observadas nas águas de abastecimento dos municípios de Taiuva, Vista Alegre do Alto, Igarapava, Terra Roxa e Cândido Rodrigues, que também podem ser atribuídas à simplicidade e/ou estratégia dos sistemas de distribuição de água (captação-mistura-tratamento-reservação). Neste subgrupo ressalte-se (i) Taiuva, que apresentou um resultado entre  $5$  e  $10 \text{ mgN-NO}_3^- \text{ L}^{-1}$ : o abastecimento neste município é realizado a partir da captação de um poço profundo e de uma bateria de seis poços, além de se utilizar uma nascente dependendo das necessidades (reserva técnica) – neste caso, seria importante determinar qual é a origem (o poço profundo ou a bateria de seis poços ou, ainda, a nascente) da concentração relativamente elevada ( $6,25 \text{ mgN-NO}_3^- \text{ L}^{-1}$ ); (ii) Vista Alegre do Alto que, além do valor indicado na **Tabela 3** ( $7,52 \text{ mgN-NO}_3^- \text{ L}^{-1}$ ), também apresentou três resultados muito próximos do limite de  $5 \text{ mgN-NO}_3^- \text{ L}^{-1}$ :  $4,99$ ,  $4,79$  e  $4,78 \text{ mgN-NO}_3^- \text{ L}^{-1}$  - sugere-se verificar as condições da bateria dos seis poços utilizada para o abastecimento, uma vez que recentemente a Cetesb registrou na área rural do município concentrações de nitrato acima de  $10 \text{ mgN-NO}_3^- \text{ L}^{-1}$  que foram associadas ao cultivo da cana-de-açúcar<sup>13</sup>; (iii) Cândido Rodrigues, que não apresentou valores maiores que  $1,06 \text{ mgN-NO}_3^- \text{ L}^{-1}$ ,



ou seja, apresentou valores muito abaixo do valor de prevenção da Cetesb e, não obstante, foi classificado no “grupo do nitrato” na abordagem multivariada – considerando que, para alguns parâmetros, as águas de abastecimento tendem a apresentar características físico-químicas semelhantes às do manancial subterrâneo que utilizam (como já discutido) e que existe um grau considerável de interdependência química e físico-química entre a água e o solo, definindo a qualidade das águas subterrâneas<sup>15</sup>, os dados sugerem que esta análise univariada não identificou uma situação potencial de contaminação como a sugerida pela análise de componentes principais (**Figura 1**) ou, em outras palavras, a ACP sugere que existem condições de solo e manancial (identificadas por meio do perfil físico-químico das águas de abastecimento de Cândido Rodrigues) para um possível permeamento do contaminante nitrato desde uma fonte (uma falha no saneamento, por exemplo) até o ponto de captação.

Os níveis de nitrato do município de Altair (**Tabela 3**) indicam pequena diferença entre a mediana e o 3º quartil, mas a segunda maior dispersão (4,89 mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> L<sup>-1</sup>). De acordo com o “Atlas do Abastecimento de Água” da Agência Nacional de Águas<sup>19</sup>, utilizam-se dois poços para o abastecimento e, à semelhança do município de Santa Ernestina, as águas captadas são reunidas para o tratamento e posterior reservação. Porém, no sítio eletrônico do responsável pelo abastecimento constam três poços utilizados em dois sistemas com dois reservatórios<sup>20</sup>; esta segunda descrição de abastecimento é coerente com a dispersão observada, uma vez que é possível dividir os 33 resultados obtidos em duas séries: a primeira, constituída de 11 resultados, apresenta concentrações variando de 0,26 a 0,32 mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> L<sup>-1</sup>, enquanto a segunda (22 resultados), apresenta níveis entre 5,05 e 5,26 mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> L<sup>-1</sup>. Aplicando o Teste de Shapiro-Wilk em cada uma dessas séries verificou-se que ambas podem ser consideradas como pertencentes a distribuições de Gauss (*p*-valores iguais a 0,31 e 0,056, respectivamente), sugerindo que cada série tenha sido amostrada de cada um dos dois sistemas. Desse modo, seria importante determinar qual sistema apresenta níveis de nitrato acima de 5 mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> L<sup>-1</sup> (o valor de prevenção da Cetesb) de modo que ações preventivas possam ser planejadas.

Cajobi apresentou distribuição de dados

similar à Altair: os 25 resultados de distribuição assimétrica (*p*-valor do teste Shapiro-Wilk = 1,1.10<sup>-5</sup>) puderam ser divididos em duas séries com distribuições de Gauss, com intervalos entre 0,68 e 0,86 mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> L<sup>-1</sup> (10 resultados, *p*-valor = 0,21) e entre 3,15 e 3,72 mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> L<sup>-1</sup> (15 resultados, *p*-valor = 0,053), sugerindo duas fontes a partir das quais as amostragens foram realizadas. Embora não se observasse ocorrências acima de 5 mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> L<sup>-1</sup>, é evidente que a segunda série foi amostrada em uma fonte com concentrações de nitrato muito superiores à primeira e, portanto, sugere-se que essa fonte seja monitorada quanto aos níveis do contaminante. Cite-se que a ACP realizada nas amostras de Cajobi revelou que, além de maiores concentrações de nitrato, a segunda série apresentou também maiores níveis de potássio, cálcio, magnésio e fosfato, e menores concentrações de lítio, sódio e sulfato, além de menores valores de pH. Uma possível interpretação para a diferença entre as fontes está relacionada ao abastecimento deste município, que é realizado por meio de 3 sistemas: Cajobi, Distrito de Monte Verde Paulista e Monsenhor (este último é operado somente nos dias de maior consumo de modo a atender ao bairro Monsenhor José Maria Soares Bezerra). No sistema Cajobi as águas são captadas de 5 poços em locais diferentes e transportada por tubulações até a estação de tratamento onde se misturam em dois reservatórios (o tratamento inclui desinfecção por hipoclorito de sódio e fluoretação por ácido fluossilícico), enquanto no sistema do Distrito de Monte Verde Paulista (distante 5,9 quilômetros de Cajobi) as águas são captadas de apenas dois poços<sup>21</sup>. Assim, essa estratégia de abastecimento sugere que a origem das maiores concentrações de nitrato está localizada ou no sistema Cajobi ou no sistema Distrito de Monte Verde Paulista.

Taquaral, Taiapu e Dobrada utilizam sistemas relativamente simples de abastecimento com quatro, seis e oito poços, respectivamente<sup>19</sup>, apresentando porcentagens de amostras com concentrações maiores que 5 mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> L<sup>-1</sup> relativamente elevadas (13,9, 27,3 e 46,4%, respectivamente), com dispersões significativas nos resultados como indica **Tabela 3**. Como os sistemas são simples, sugere-se uma investigação no sentido de constatar qual(is) poço(s) apresenta(m) as maiores concentrações, uma vez que os níveis máximos (Taquaral



8,32 mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>L<sup>-1</sup>, Taiaçu 7,62 mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>L<sup>-1</sup>, Dobrada 7,61 mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>L<sup>-1</sup>), podem se aproximar do VMP: variações de até +4,17 mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>L<sup>-1</sup> em um intervalo de quatro meses já foram observadas em poços contaminados por nitrato<sup>7</sup>.

De modo geral e em uma primeira abordagem, pode-se afirmar que os perfis físico-químicos das águas de abastecimento (**Figuras 1 e 2**) são resultantes de duas contribuições principais: **(a)** da qualidade do manancial antes da captação para o abastecimento resultante, por sua vez, de suas características naturais (incluindo, por exemplo, concentrações de íons, pH e condutividade) e de eventuais influências antropogênicas (por exemplo, contaminações provocadas por um saneamento deficiente nas áreas urbanas ou por uso inadequado de fertilizantes e agrotóxicos nas áreas rurais)<sup>15</sup>; **(b)** a segunda contribuição ocorre após a captação e se refere ao tratamento das águas visando a potabilidade e, neste caso, muitas substâncias químicas com características específicas podem ser utilizadas neste tratamento: por exemplo, apenas para o ajuste de pH podem ser usados o ácido clorídrico, o ácido sulfúrico, o óxido de cálcio, o hidróxido de cálcio, o carbonato de sódio, o dióxido de carbono ou o hidróxido de sódio<sup>17</sup>. Contudo, no caso de águas subterrâneas de boa qualidade (e a Cetesb considera essa a qualidade das águas subterrâneas do Estado de São Paulo)<sup>13</sup>, o tratamento pode se constituir apenas na desinfecção (usualmente realizada pela cloração por meio de hipoclorito de cálcio ou de sódio ou, ainda, de cloro gasoso) e na fluoretação (utilizando ácido fluossilícico ou fluossilicato de sódio)<sup>17</sup>. Este tratamento simples indica que nos perfis físico-químicos das águas de abastecimento que utilizam manancial subterrâneo (**Figuras 1E e 1G**), a contribuição das características físico-químicas antes da captação (em outras palavras, das características das águas dos poços antes do tratamento), é maior relativamente à respectiva contribuição nos perfis das águas de manancial superficial que, via de regra, exigem tratamento mais complexo. Isto implica que, em municípios que realizam o abastecimento exclusivamente a partir de manancial subterrâneo, a análise de amostras de águas pós-tratamento (potáveis) podem ser utilizadas para uma primeira avaliação da qualidade dos mananciais, pelo menos

para alguns parâmetros como a concentração de nitrato, por exemplo.

## CONCLUSÃO

A abordagem multivariada na análise dos dados descrita neste trabalho, com a consideração simultânea de diversas variáveis no intuito de descrever principalmente os perfis físico-químicos das águas de abastecimento de municípios da região nordeste do Estado de São Paulo, conduziu a uma visualização mais abrangente da qualidade das águas no que diz respeito às características físico-químicas, especialmente com relação à presença de nitrato. Neste particular, foi possível identificar 15 municípios cujas águas requerem atenção quanto à presença deste contaminante. Não obstante, demonstrou-se que a análise univariada, baseada apenas nas concentrações de nitrato, pode ser também utilizada na interpretação dos resultados tendo-se em mente que o conteúdo menor de informações conduz a uma interpretação mais limitada.

A apresentação e discussão sobre os resultados obtidos para as concentrações de nitrato nas águas de abastecimento dos 15 municípios deve permitir que ações sejam planejadas entre os diversos atores envolvidos não somente com a gestão da água destinada ao consumo humano da região (como as empresas de abastecimento e saneamento, e o Departamento de Águas e Energia Elétrica do Estado de São Paulo), mas também com o monitoramento de sua qualidade (Cetesb, Vigilâncias e Laboratórios de Saúde Pública), no sentido de investigar e mitigar possíveis contaminações dos mananciais subterrâneos utilizados, garantindo o padrão de potabilidade da água consumida pela população. Essas ações devem inicialmente considerar os níveis de nitrato em cada município e a complexidade do respectivo sistema de abastecimento, ressaltando-se que não é necessário esperar que o limite de 5 mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>L<sup>-1</sup> (proposto pela Cetesb) seja atingido para a definição de ações preventivas. A antecipação dessas ações pode auxiliar na proteção dos mananciais subterrâneos, evitando que ocorram ações interventivas como as descritas nos municípios de Monte Azul Paulista<sup>7</sup> e Severínia<sup>9</sup>.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro (Processo FAPESP nº 2014/10034-2) e pela bolsa concedida a A. G. Cavallini (Processo FAPESP nº 2015/02583-9).

## REFERÊNCIAS

1. WHO. World Health Organization. Guidelines for Drinking Water Quality. 4. ed. Geneva: WHO; 2011.
2. Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação Geral de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Vigilância em Saúde Ambiental Relacionada à Qualidade da Água Para Consumo Humano. Brasília, DF: Editora do Ministério da Saúde; 2005. 106p.
3. Ministério da Saúde (BR). Portaria de Consolidação MS nº 5 de 28/09/2017 - Anexo XX. Diário Oficial da União. 2017;03 out. Seção 1, Suplemento, p. 360. Disponível em: [https://www.normasbrasil.com.br/norma/portaria-de-consolidacao-5-2017\\_356387.html](https://www.normasbrasil.com.br/norma/portaria-de-consolidacao-5-2017_356387.html)
4. CVS-SES-SP. Centro de Vigilância Sanitária da Secretaria de Estado da Saúde. Programas e projetos / Água para consumo humano - Proágua. [acesso 2017 Out 20]. Disponível em: [http://www.cvs.saude.sp.gov.br/prog\\_det.asp?te\\_codigo=13&pr\\_codigo=132017](http://www.cvs.saude.sp.gov.br/prog_det.asp?te_codigo=13&pr_codigo=132017)
5. Varnier C, Iritani MA, Viotti M, Oda GH, Ferreira LMR. Nitrato nas águas subterrâneas do Sistema Aquífero Bauru, área urbana do município de Marília (SP). *Rev Inst Geológico*. 2010;31(1/2):1-21. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5935/0100-929X.20100001>
6. Godoy MCTF, Boin MR, Sanaiotti DC, Silva JB. Contaminação das águas subterrâneas por nitrato em Presidente Prudente-SP, Brazil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*. 2004;63(2):208-14. Disponível em: [http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/rial/2000/rial63\\_2\\_completa/998.pdf](http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/rial/2000/rial63_2_completa/998.pdf)
7. Dovidauskas S, Okada IA, Souza JAd, Novas MADJH, Rossato RA. A interação entre Vigilância Sanitária e Laboratório de Saúde Pública na detecção de contaminação por nitrato em água subterrânea. *Vigil sanit debate*. 2015;3(1):97-104. Disponível em: <https://doi.org/10.3395/2317-269x.00259>
8. Dovidauskas S, Okada IA, Iha MH, Oliveira MAd, Cavallini ÁG. Detecção de contaminação por nitrato em água de abastecimento público em município da região nordeste do Estado de São Paulo (Brasil). *Bol Inst Adolfo Lutz*. 2016;26(art 19). Disponível em: [http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/bial/bial\\_26/26u\\_art-19.pdf](http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/bial/bial_26/26u_art-19.pdf)
9. Dovidauskas S, Okada IA, Iha MH, Cavallini ÁG, Oliveira MAd. Abordagem na detecção de situação de risco potencial à saúde, relacionada à qualidade da água: um exemplo. *Tchê Quím*. 2018;15(29):123-35. Disponível em: [http://www.resag.org.br/downloads/abordagem\\_na\\_deteccao.pdf](http://www.resag.org.br/downloads/abordagem_na_deteccao.pdf)
10. WHO. World Health Organization. Nitrate and nitrite in drinking-water (WHO/FWC/WSH/16.52) - Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. Geneva: WHO; 2016.
11. Dovidauskas S, Okada IA, Iha MH, Cavallini ÁG, Okada MM, Briganti RdC. Parâmetros físico-químicos incomuns em água de abastecimento público de um município da região nordeste do Estado de São Paulo (Brasil). *Vigil. sanit. debate*. 2017;5(1):106-15. Disponível em: <https://doi.org/10.3395/2317-269X.00840>
12. Dovidauskas S, Okada IA, Iha MH, Cavallini ÁG, Okada MM, Briganti RdC,

- et al. Mapeamento da qualidade da água de abastecimento público no nordeste do Estado de São Paulo (Brasil). *Vigil. sanit. debate.* 2017;5(2):53-63. Disponível em: <https://doi.org/10.22239/2317-269x.00862>
13. CETESB. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Qualidade das águas subterrâneas do Estado de São Paulo 2013-2015. São Paulo: CETESB; 2016. 311p.
  14. Dovidauskas S, Okada IA, Iha MH, Cavallini ÁG, Okada MM, Briganti RdC. Análise multivariada para a descrição dos níveis de nitrato em águas de abastecimento público no nordeste do Estado de São Paulo. 2º Congresso Internacional RESAG - Rede de Saneamento e Abastecimento de Água. 2015. Disponível em: <http://www.resag.org.br/congressoresag2015/anais/>.
  15. Chilton J. Chapter 9 - Groundwater. In: D C, editor. *Water Quality Assessments - A Guide to Use of Biota, Sediments and Water in Environmental Monitoring* 2. ed. Cambridge: UNESCO/WHO/UNEP; 1996. p. 394-482.
  16. Souto MAM, Okada MM, Okada IA, Dovidauskas S. A determinação de nitrato em águas por espectrofotometria UV: usos e precauções. *Rev. Inst. Adolfo Lutz.* 2006;65(1):66-9. Disponível em: <http://periodicos.ses.sp.bvs.br/pdf/rial/v65n1/v65n1a14.pdf>
  17. Bernardo LD, Paz LPS. Seleção de Tecnologias de Tratamento de Água. São Carlos (SP), Brasil: Editora Ldibe Ltda; 2008.
  18. DAEE. Portaria DAEE-860, de 27/03/2017. Prorroga por mais dois anos os efeitos da Portaria DAEE-1066, de 27/03/2015, que prorrogou por dois anos a Portaria DAEE-965, de 27/03/2013 reti-ratificada em 13/04/2013, delimitando uma área de restrição e controle temporário para os usos ou interferências em recursos hídricos subterrâneos no município de Monte Azul Paulista. *Diário Oficial do Estado de São Paulo* 2017; 28 mar.
  19. ANA. Agência Nacional de águas - Atlas de Abastecimento Urbano de Água [acesso 2017 Set 04]. Disponível em: <http://www2.ana.gov.br>
  20. SABESP. Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo [acesso 14 Nov 2017]. Disponível em: <http://www.sabesp.com.br>
  21. Sandrini D, Furiotti LB, Silva JWF, Oliveira MRd. Plano de Gerenciamento Integrado de Resíduos Sólidos [acesso 2017 Dez 07]. Cajobi: SEMAE; 2012. Disponível em: <http://www.ambiente.sp.gov.br/cpla/residuos-solidos/planos-de-residuos-solidos/#1493128386266-14a1c452-2862.do> universo do censo demográfico 2010. Rio de Janeiro(RJ): IBGE; 2011. Avaliable in: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv54598.pdf>



# Padronização de teste para quantificar anticorpos anti-poliovírus utilizando vírus vacinal

## Standardization of a test for quantifying the antibodies against poliovirus using the vaccine virus

RIALA6/1768

Elaine dos Santos LIMA<sup>1</sup>, Maria Isabel de MORAES-PINTO<sup>2</sup>, Roberta Morozetti BLANCO<sup>1</sup>, Celso Francisco Hernandes GRANATO<sup>3</sup>, Eliete Caló ROMERO<sup>1\*</sup>

\*Endereço para correspondência: Núcleo de Doenças Entéricas e Infecções por Patógenos Especiais, Centro de Bacteriologia, Instituto Adolfo Lutz, Brasil, Av. Dr Arnaldo, 351, São Paulo, SP, Brasil, CEP: 01246-902. Tel: 11 3068 2897. E-mail: [eliete\\_romero@yahoo.com.br](mailto:eliete_romero@yahoo.com.br)

<sup>2</sup>Laboratório de Virologia, Divisão de Doenças Infecciosas Universidade Federal de São Paulo

<sup>3</sup>Laboratório de Pesquisas, Disciplina de Infectologia Pediátrica, Universidade Federal de São Paulo

Recebido: 11.07.2018 - Aceito para publicação: 15.03.2019

### RESUMO

A poliomielite é uma doença endêmica no Afeganistão e no Paquistão, apesar dos esforços para ser erradicada, representando uma ameaça para outros países principalmente devido às viagens internacionais. A Organização Mundial da Saúde (OMS) tem como objetivo erradicar a poliomielite causada pelo poliovírus selvagem no mundo. O requisito essencial para a erradicação da poliomielite é a eliminação da cepa do poliovírus selvagem, que é empregada no teste padrão-ouro. Com o intuito de auxiliar na erradicação do poliovírus selvagem, o objetivo deste estudo foi modificar o teste padrão-ouro usando o poliovírus derivado da vacina oral atenuada. Foram testados 63 soros pelo ensaio de neutralização utilizando-se antígenos vacinais. A concordância do sorotipo 1 ( $k=0,74$ ) foi considerada substancial, enquanto o sorotipo 2 ( $k=1,00$ ) e sorotipo 3 ( $k= 0,95$ ) foram consideradas quase perfeitas. A sensibilidade dos testes de soroneutralização utilizando os sorotipos 1, 2 e 3 foi de 94,83%, 100,00% e 100,00%, respectivamente. Em conclusão, o ensaio com antígenos vacinais pode ser usado como procedimento laboratorial seguro, especialmente em estudos de vigilância em larga escala.

**Palavras-chave.** poliovírus, poliovírus selvagem, poliomielite, poliovírus vacinal.

### ABSTRACT

Poliomyelitis is an endemic disease in Afghanistan and Pakistan in despite of the efforts to eradicate it, and it represents a threat to other countries mainly due to the international trips. The World Health Organization (WHO) aims at eradicating the polio disease worldwide. An essential requirement for eradicating the poliomyelitis is the elimination of the wild poliovirus strain, which is employed in the gold standard test. As a support for the eradication of wild poliovirus, the present study aimed at modifying the gold standard test by using poliovirus derived from the oral attenuated vaccine. Sixty-three sera samples were tested by neutralization assay using vaccine antigens. The degree of agreement of the serotype 1 ( $k=0.74$ ) was considered substantial, while the serotype 2 ( $k=1.00$ ) and 3 ( $k= 0.95$ ) showed almost perfect agreement. The sensitivity of serotypes 1, 2 and 3 was 94.83%, 100.00% and 100.00%, respectively. In conclusion, the assay with the vaccine antigens can be used as a safe application, especially for large-scale surveillance studies.

**Keywords.** poliovirus, wild poliovirus, poliomyelitis, poliovirus vaccine.

## INTRODUÇÃO

A poliomielite é uma doença que pode causar paralisia flácida dos membros inferiores, paralisia na via respiratória e óbitos. É causada pelo poliovírus, membro da família *Picornaviridae*, gênero *Enterovirus*<sup>1</sup>. Esses vírus possuem formato esférico, com o capsídeo constituído por quatro polipeptídios estruturais (VP1, VP2, VP3 e VP4), que se organizam com simetria icosaédrica e contém RNA acondicionado em seu interior<sup>2</sup>. Os poliovírus são classificados em sorotipos 1, 2 e 3 com base em diferentes determinantes antigênicos presentes no capsídeo viral<sup>2</sup>. Durante séculos, grande parte da população mundial foi atingida pela poliomielite e apenas após a introdução da vacina é que houve a redução do número de casos<sup>3</sup>.

Existem dois tipos de vacinas contra a poliomielite: a Sabin - vacina oral contendo vírus atenuados<sup>4</sup> e a Salk-vacina injetável contendo vírus inativados<sup>3</sup>. A vacina oral poliomielite (VOP) é mais fácil de ser administrada, porém, apesar de raro, pode ocorrer a reversão da virulência e causar paralisia associada aos vírus vacinais<sup>5,6</sup>. A reversão da virulência pode ocorrer também em pacientes com imunodeficiência primária, pois excretam o poliovírus vacinais por períodos extremamente prolongados, tornando-os capazes de causar infecção na população susceptível<sup>7,8</sup>. No Brasil estima-se que ocorra um caso em 5 milhões de reversão de virulência na primeira dose de vacinação e de um caso em 10 milhões, nas doses subsequentes<sup>9</sup>. Com o intuito de minimizar os riscos da paralisia associada à vacina, houve a alteração do esquema vacinal contra pólio em 2012, com a introdução da vacina inativada poliomielite (VIP), em esquema sequencial com três doses da VIP e duas doses da VOP<sup>10</sup>.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) permanece com a incumbência de efetuar o monitoramento e as diversas ações para conter os surtos. Porém, mesmo após décadas de campanhas de vacinação e de esforços globais para erradicar esses vírus, eles permanecem endêmicos no Afeganistão e Paquistão<sup>11</sup>. De janeiro de 2017 a maio de 2018, foram reportados 31 casos de poliomielite causados pelo poliovírus 1, sendo 22 casos no Afeganistão e 9 no Paquistão<sup>11</sup>. Atualmente o poliovírus tipo 1 é o único sorotipo selvagem em circulação<sup>12</sup>. Desde 1999 não se detecta o sorotipo 2<sup>12</sup>. O último caso de identificação do poliovírus selvagem tipo 3 ocorreu na Nigéria, em 2012<sup>13</sup>.

Esses surtos de poliomielite aumentam o risco de transmissão do poliovírus selvagem para outras áreas, e impedem a erradicação<sup>12</sup>. Além disso, há a possibilidade de disseminação do vírus de tipo selvagem, devido à sua manipulação em procedimentos laboratoriais<sup>14</sup>. Neste contexto, a OMS desenvolveu estratégias que visam a contenção dos poliovírus selvagem em todo o mundo, proibindo os laboratórios de utilizarem essa cepa no diagnóstico laboratorial da poliomielite<sup>14,15</sup>. A metodologia utilizada é o teste de soroneutralização que quantifica os anticorpos neutralizantes contra o poliovírus nas amostras de soro de pacientes<sup>15</sup>. Este é o teste padrão-ouro empregado para avaliar a resposta imune induzida pela administração oral ou parenteral de imunógenos, principalmente em situações em que são avaliados os pacientes com imunodeficiência<sup>16</sup>. Atualmente, não existem alternativas disponíveis para este fim. Uma possibilidade seria usar o poliovírus em sua forma atenuada, presente na vacina oral Sabin, como alternativa simples e segura em comparação ao procedimento tradicional. Desta forma, o diagnóstico e a avaliação imunológica dos pacientes não seriam prejudicados e a contenção laboratorial poderia ser concluída de forma segura.

Os objetivos deste estudo foram padronizar a técnica de soroneutralização utilizando-se os vírus atenuados vacinais provenientes da vacina oral Sabin; desenvolver a produção destes vírus atenuados a partir de cultura de células e comparar o resultado do teste de soroneutralização utilizando-se poliovírus vacinais (metodologia vacinal) com o do teste de soroneutralização, que emprega o antígeno selvagem (metodologia selvagem).

## MATERIAL E MÉTODOS

### Expansão dos antígenos vacinais em cultura de células para a técnica de soroneutralização

#### *Cultivo Celular*

O cultivo de células foi realizado seguindo-se as recomendações do Manual da Poliomielite<sup>15</sup>. Foram utilizadas as células HEp-2 cultivadas em meio RPMI (meio Roswell Park Memorial Institute - Gibco/Invitrogen-EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco/Invitrogen-EUA) e estreptomicina 0,1% (Gibco/Invitrogen-EUA), em garrafas plásticas estéreis de fundo chato e descartáveis. O meio de crescimento



foi removido das culturas e o tapete de células formado no fundo da garrafa foi lavado com 5 mL de solução salina de tampão fosfato (PBS) estéril. Após a remoção do PBS, foi adicionado 1 mL de reagente tripsina (Gibco/Invitrogen-EUA), para efetuar a dispersão celular; em seguida, a garrafa foi incubada por 5 minutos em temperatura ambiente. Para realizar a interrupção da atividade enzimática da tripsina sobre as células foram adicionados 20 mL de meio de cultura contendo 10% de SFB (soro fetal bovino). As suspensões de células obtidas foram homogeneizadas, e 10 mL transferidos para as respectivas garrafas (repique 1:2). As garrafas foram mantidas em estufa a 37 °C em atmosfera de CO<sub>2</sub>, e as células foram repicadas a cada dois dias.

#### *Inoculação de poliovírus vacinais 1, 2 e 3 em culturas de células HEp-2*

Para a inoculação dos vírus vacinais na cultura de célula HEp-2, foram utilizadas garrafas contendo células com formação de tapete no fundo da garrafa. O meio de crescimento foi descartado, e as células foram lavadas duas vezes com 5 mL de PBS estéril. Em seguida foram adicionados 100 µL de vacina oral de Sabin contendo concentração viral média de 7,6 log. Este procedimento foi repetido para cada um dos sorotipos virais. As garrafas foram incubadas durante 30 minutos a 37 °C e levemente agitadas a cada 10 minutos. Após o período de incubação e adsorção viral, foi adicionado 1 mL de meio RPMI contendo 1% de SFB. As garrafas foram novamente incubadas durante 24 horas.

Para favorecer o desenvolvimento celular e a multiplicação viral, foram feitas a troca do meio e o aumento da concentração do SFB para 5%. Os poliovírus, após a penetração nas células e multiplicação, ocasionaram alterações morfológicas e fisiológicas chamadas de efeito citopático. Como houve pouca expressão do efeito citopático após 24 horas de incubação, as garrafas foram incubadas novamente a 37°C por mais 24 horas, quando foi observado um intenso efeito citopático. O tapete celular contendo os vírus foi removido, e a suspensão de células foi homogeneizada com movimentos circulares. Em seguida, este material foi transferido para criotubos, que foram congelados em freezer a -80 °C, com o intuito de interromper o processo de destruição celular e manter a conservação dos vírus para a próxima etapa experimental.

#### **Quantificação de anticorpos neutralizantes do soro anti-poliiovírus**

Para efetuar a padronização da técnica utilizando-se os vírus vacinais, foi determinada a dose que infecta 50% das células (TCID<sub>50</sub>- *Tissue culture infective dose*), isto é, a menor quantidade de suspensão viral capaz de produzir a doença no hospedeiro susceptível ou de induzir o efeito citopático em culturas celulares. O cálculo da dose infectante com 50% de letalidade foi feito de acordo com Reed e Muench<sup>17</sup>. Como o Manual da Poliomielite<sup>15</sup> recomenda o uso de dose de 100 TCID<sub>50</sub>, esta quantidade foi utilizada no presente trabalho. Após a determinação de dose de 100 TCID<sub>50</sub> para cada sorotipo de poliovírus vacinal, o teste de soroneutralização foi processado usando-se os vírus vacinais e 63 amostras de soro de pacientes previamente avaliados pela metodologia padrão-ouro de soroneutralização e que apresentavam diferentes concentrações de anticorpos anti-poliiovírus selvagem. A análise foi realizada sem o conhecimento prévio dos resultados. Essas amostras de soro são oriundas do banco de soros do Fleury Diagnósticos e foram armazenadas em temperatura de -20 °C até o momento do uso.

Para efetuar esta técnica, os soros dos pacientes foram previamente inativados em banho-maria a 56°C por 30 minutos. Aliquotas de 25 µL de meio RPMI foram adicionadas nos poços da placa de microtitulação (Corning, EUA). Os soros dos pacientes, diluídos na razão 2 de 1:8 a 1:1024, foram distribuídos nas respectivas cavidades da placa. Em seguida, foram adicionados 100 µL de células 100 TCID<sub>50</sub>. Foram utilizados três poços para o controle negativo, contendo somente 25 µL de solução salina (PBS) e três poços como controle positivo, contendo somente 25 µL de 100 TCID<sub>50</sub> virais. Estes procedimentos foram repetidos para cada sorotipo de poliovírus estudado. A placa foi vedada e incubada em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C durante duas horas. Após esta etapa, as células HEp-2 foram acrescentadas na concentração de 200.000/mL. As placas foram incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C durante 48 horas. A leitura da reação foi realizada em microscópio óptico comum.

Os resultados foram considerados positivos quando os testes apresentaram títulos iguais ou superiores a 8 e negativos quando os títulos da reação foram menores do que 8. A presença de efeito citopático indica que o paciente não possui anticorpos capazes de neutralizar a ação do vírus (resultado <8). A ausência de efeito citopático significa que o paciente possui anticorpos capazes de neutralizar a ação viral (resultado ≥ 8).



Este estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP 1589/08).

### Análise estatística

Como a avaliação de desempenho de um teste diagnóstico depende da ausência de desvios ou viés, além da análise de confiabilidade do teste, foram calculados os seguintes parâmetros: índice Kappa, exatidão, sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e prevalência, além dos respectivos intervalos de confiança de 95%<sup>18-20</sup>. As análises estatísticas foram realizadas utilizando MedCalc para Windows, versão 15.1 (MedCalc Software, Ostend, Belgium). O índice Kappa foi calculado utilizando GraphPad QuickCalcs Web site.

## RESULTADOS

Os resultados da expansão dos vírus em cultura de células HEp-2 possibilitou a produção de vírus vacinais e o estoque deste material foi utilizado na padronização da metodologia vacinal. Foram avaliadas 63 amostras

previamente analisadas pela metodologia selvagem para detecção de anticorpos anti-poliovírus tipos 1, 2 e 3. A metodologia selvagem apresentou resultados negativos em 5 amostras para detecção de anticorpos anti-poliovírus tipo 1, em 3 amostras para o tipo 2 e em 15 amostras para o tipo 3. Avaliando os resultados da metodologia vacinal em comparação à metodologia selvagem, foi demonstrado que para o poliovírus 1, 22 amostras apresentaram títulos discordantes e os títulos concordantes foram detectados em 41 amostras. Para o poliovírus 2 houve 21 amostras discordantes e 42 concordantes, e para o poliovírus 3 foram 18 discordantes e 45 concordantes. Na avaliação dos títulos discordantes, a diferença encontrada na maioria das amostras não ultrapassou um título. Esta diferença é aceitável e pode ocorrer quando se trata de teste de neutralização. Desconsiderando a discordância das amostras que apresentaram somente um título de diferença, as metodologias apresentaram resultados concordantes em 57 amostras para o poliovírus 1 e em 61 amostras para os poliovírus 2 e 3. A comparação entre as duas metodologias, selvagem e vacinal, está demonstrada na **Tabela 1**.

**Tabela 1.** Resultados das metodologias selvagem e vacinal realizadas com 63 amostras de soro

Amostra	Reação de soroneutralização					
	Cepa selvagem			Cepa vacinal		
	Poliovírus tipo 1	Poliovírus tipo 2	Poliovírus tipo 3	Poliovírus tipo 1	Poliovírus tipo 2	Poliovírus tipo 3
1	64	256	256	64	512	256
2	64	128	128	64	128	256
3	8	16	8	16	16	8
4	128	1024	128	128	512	128
5	256	64	16	256	128	128
6	64	64	< 8	64	32	< 8
7	< 8	64	< 8	< 8	64	16
8	512	1024	512	512	1024	256
9	64	512	64	64	512	64
10	16	32	1024	128	512	1024
11	1024	1024	256	1024	1024	256
12	32	32	< 8	32	32	< 8
13	16	16	8	16	16	8
14	64	< 8	< 8	64	< 8	< 8
15	64	128	8	64	128	8
16	64	< 8	< 8	64	< 8	< 8
17	8	16	8	8	8	8
18	64	128	< 8	64	64	< 8

*Continua na página 5/9*

Amostra	Cepa selvagem			Cepa vacinal		
	Poliovírus tipo 1	Poliovírus tipo 2	Poliovírus tipo 3	Poliovírus tipo 1	Poliovírus tipo 2	Poliovírus tipo 3
19	32	64	32	32	64	32
20	128	64	256	64	64	128
21	< 8	8	< 8	< 8	8	< 8
22	256	64	256	128	64	256
23	1024	1024	256	1024	1024	512
24	512	256	128	512	128	256
25	16	64	< 8	16	64	< 8
26	512	128	16	512	128	16
27	8	16	16	16	8	16
28	8	16	8	8	16	8
29	32	64	64	32	64	128
30	8	128	16	< 8	128	8
31	32	64	128	64	64	256
32	16	64	< 8	16	64	< 8
33	128	64	256	128	64	128
34	32	64	64	16	32	64
35	64	256	128	64	128	64
36	32	64	32	16	32	16
37	16	64	< 8	< 8	64	< 8
38	64	8	32	32	8	16
39	1024	1024	1024	1024	1024	1024
40	128	128	128	128	128	256
41	128	1024	1024	128	1024	1024
42	64	128	< 8	64	16	< 8
43	512	128	16	512	64	32
44	< 8	< 8	< 8	< 8	< 8	< 8
45	1024	1024	1024	1024	512	1024
46	8	16	32	< 8	8	32
47	32	64	32	16	32	64
48	128	64	64	128	64	32
49	64	1024	32	16	1024	32
50	512	256	64	512	128	64
51	32	512	64	32	512	64
52	128	128	256	64	128	256
53	128	128	16	64	64	16
54	64	32	32	8	32	32
55	128	256	16	64	256	16
56	32	64	16	16	64	16
57	256	64	256	128	64	256

*Continua na página 6/9*

Amostra	Cepa selvagem			Cepa vacinal		
	Poliovírus tipo 1	Poliovírus tipo 2	Poliovírus tipo 3	Poliovírus tipo 1	Poliovírus tipo 2	Poliovírus tipo 3
58	1024	1024	256	1024	1024	256
59	< 8	8	< 8	< 8	16	< 8
60	< 8	64	< 8	< 8	32	< 8
61	256	128	32	128	128	32
62	256	64	32	256	64	32
63	16	8	< 8	8	8	< 8

Para fins de análises estatísticas foram calculados exatidão, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, prevalência e

os respectivos intervalos de confiança de 95%, utilizando-se a metodologia selvagem como referência. Os resultados encontrados estão apresentados na **Tabela 2**.

**Tabela 2.** Avaliação da metodologia vacinal

	Reação de soroneutralização		
	Poliovírus tipo 1	Poliovírus tipo 2	Poliovírus tipo 3
Exatidão	95,24%	100,00%	98,41%
(95%IC)	(86,71 a 99,01%)	(94,31 a 100,00%)	(91,47 a 99,96%)
Sensibilidade	94,83%	100,00%	100,00%
(95%IC)	(85,62 a 98,92%)	(94,04 a 100,00%)	(92,60 a 100,00%)
Especificidade	100,00%	100,00%	93,33%
(95%IC)	(47,82 a 100,00 %)	(29,24 a 100,00 %)	(68,05 a 99,83%)
Valor preditivo positivo	100,00%	100,00%	97,96%
(95%IC)	(100,00 a 100,00%)	(100,00 a 100,00%)	(87,84 a 99,69%)
Valor preditivo negativo	62,50%	100,00%	100,00%
(95%IC)	(35,64 a 83,38%)	(100,00 a 100,00%)	(100,00 a 100,00%)
Prevalência	92,06%	95,24%	76,19 %
(95%IC)	(82,44 a 97,37%)	(86,71 a 99,01%)	(63,79 a 86,02%)

O índice Kappa foi empregado para efetuar a análise da confiabilidade dos testes. Os valores obtidos foram de 0,74 (95% IC= 0,47-1,00) para o poliovírus tipo 1, 1,00 (95% IC= 1,00-1,00) para o tipo 2 e 0,95 (95% IC= 0,87-1,00) para o tipo 3.

## DISCUSSÃO

A contenção adequada do poliovírus selvagem nos laboratórios é fator importante para fins de erradicação. Por estas razões, em 2003 a Organização Mundial de Saúde publicou o Plano Mundial de Ação para a Contenção de Poliovírus Selvagem em Laboratórios, que

promove uma série de medidas de segurança, com escopo global para evitar a reintrodução de poliovírus selvagem na comunidade<sup>14</sup>. Na América Latina, os últimos casos de poliomielite do tipo selvagem ocorreram em 1989 no Brasil e em 1991 no Peru. Mesmo após receber o Certificado de Erradicação da Poliomielite, o Brasil mantém a vigilância para novos casos de paralisia flácida aguda<sup>21</sup>.

Com base nos requisitos da OMS e consciente da importância de utilizar um teste de sorodiagnóstico seguro, para a comunidade e para laboratoristas, o presente estudo avaliou um novo componente para padronizar o teste de soroneutralização, utilizando-se as estirpes de vacina. Todo o processo seguiu as diretrizes do Manual da Poliomielite<sup>15</sup>.

Pela análise do resultado do teste de soroneutralização empregando-se o poliovírus tipo 1 vacinal, foi demonstrada sua alta sensibilidade (94,83%), o que indica que o teste é adequado para detectar a presença de pequenas quantidades de anticorpos específicos. A especificidade para o poliovírus 1 foi de 100,00% não tendo apresentado nenhum resultado falso positivo. O valor preditivo negativo foi satisfatório (62,50%), porém o valor preditivo positivo (100,00%) e a prevalência (92,06%) apresentaram valores elevados, pois a maioria dos pacientes apresentou resultados positivos, confirmando-se o estado imunológico contra o poliovírus 1, que mostrou ser altamente imunogênico. O teste apresentou alta precisão, o que indica alta confiabilidade no resultado final e valida o procedimento em questão.

Ao avaliar o teste empregando-se a vacina de poliovírus tipo 2, o dado obtido foi muito próximo aos resultados de soroneutralização realizada com a cepa selvagem (exatidão, sensibilidade, especificidade e valores preditivos de 100%). O teste em estudo não apresentou reações falsamente positivas e/ou falsamente negativas, e os resultados obtidos foram muito semelhantes ao de teste de referência. Comparando-se os testes que utilizaram o poliovírus 3, observou-se maior número de resultados negativos, o que reduziu a soroprevalência (76,19%). O sorotipo 3 é considerado menos imunogênico em comparação ao poliovírus 1 e 2<sup>22</sup> e este fato foi confirmado no presente estudo. Para esse sorotipo, foram observadas alta sensibilidade (100,00%), especificidade (93,33%), valores preditivos positivos (97,96%) e negativos (100,00%) e exatidão (98,41%), apropriadas para teste laboratorial com bom desempenho. As comparações feitas por meio de índice Kappa permitiram concluir que há bom acordo entre os testes, variando-se de concordância substancial a quase perfeita.

Desde os primeiros estudos publicados sobre as técnicas de soroneutralização têm sido observadas pequenas diferenças entre os resultados obtidos do teste de neutralização utilizando-se diferentes estirpes de poliovírus. Paul e Trask<sup>23</sup> avaliaram duas diferentes estirpes selvagens e concluíram que havia diferença de aproximadamente 25% entre os testes de soroneutralização empregando-se diferentes cepas de poliovírus. Howitt<sup>24</sup> ao utilizar o teste de soroneutralização, para avaliar o estado imunológico de indivíduos saudáveis e doentes, mostrou a ausência de diferenças significativas no teste de neutralização, independentemente das estirpes utilizadas. O presente estudo apresentou alto grau de concordância entre o teste de referência e aquele que utiliza o vírus da vacina. As várias passagens em cultura celular das

estirpes selvagens utilizadas no laboratório de referência, que têm ocorrido ao longo dos últimos 30 anos, podem ter atenuado a ação viral, tornando muito próximo o desempenho dos testes de soroneutralização.

Diversos testes foram desenvolvidos com o objetivo de serem mais rápidos que o teste de soroneutralização e não utilizarem vírus vivos para sua realização, porém os resultados demonstraram menores valores de sensibilidade, principalmente em soros com títulos baixos, não sendo recomendada a substituição do teste de soroneutralização por estes testes<sup>25-28</sup>.

Baseando-se nos resultados obtidos no presente estudo, conclui-se que esta técnica poderia ser utilizada nos trabalhos de rotina de laboratórios clínicos. Esta conduta poderia proporcionar uma boa alternativa para substituir as cepas de tipo selvagem no atual procedimento de avaliação do estado vacinal e da resposta imunológica para os três sorotipos virais. A avaliação da imunidade é muito importante principalmente para os pacientes imunodeprimidos, como os pacientes HIV positivos e os indivíduos que realizaram transplante de medula óssea<sup>7</sup>. Para estes últimos pacientes, a reconstituição da imunidade é realizada por meio de revacinação. Desta forma, a dosagem periódica dos anticorpos anti-poliovírus é utilizada para verificar a eficácia do organismo em produzir proteção contra o poliovírus<sup>16</sup>.

Devido à alta cobertura vacinal brasileira para poliovírus, o estudo apresentou limitações quanto ao número de soros negativos utilizados nas análises estatísticas para avaliação do desempenho do teste estudado.

A utilização da metodologia vacinal permitiria o uso seguro do teste de soroneutralização em laboratórios de pesquisa e de diagnóstico, por mais alguns anos, até que a erradicação total do poliovírus seja realizada. Provavelmente, este fato ocorrerá quando qualquer manipulação de cepas de poliovírus, mesmo atenuadas, for futuramente proibida. Os resultados do presente estudo demonstram que o uso desta nova abordagem, baseada na soroneutralização do vírus atenuado da vacina oral Sabin, pode ser incorporado na prática em laboratórios para avaliar o estado de vacinação, além de ser apropriado nesta fase de erradicação global da poliomielite.

## AGRADECIMENTOS

Ao laboratório de Virologia-Unifesp, ao Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos da Fundação Oswaldo Cruz (Bio-Manguinhos/Fiocruz), por ceder as cepas vacinais, e

ao Fleury Diagnósticos, pela disponibilidade e cessão de amostras de soros dos pacientes e das células HEp-2. Financiamento da pesquisa: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP: 2008/58148-5)

## REFERÊNCIAS

1. Racaniello VR. The poliovirus receptor: a hook, or an unzipper? *Structure*. 1996;4(7):769-73. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(96\)00083-4](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(96)00083-4)
2. Hogle JM, Chow M, Filman DJ. The structure of poliovirus. *Sci Am*. 1987;256(3):42-9. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0387-42>
3. Salk JE. Studies in human subjects on active immunization against poliomyelitis. I. A preliminary report of experiments in progress. *J Am Med Assoc*. 1953;151(13):1081-98.
4. Sabin AB. Properties and behavior of orally administered attenuated poliovirus vaccine. *J Am Med Assoc*. 1957;164(11):1216-23. <https://doi.org/10.1001/jama.1957.62980110008008>
5. Friedrich F. Rare adverse events associated with oral poliovirus vaccine in Brazil. *Braz J Med Biol Res*. 1997;30(6):695-703. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X1997000600001>
6. Nkowane BM, Wassilak SG, Orenstein WA, Bart KJ, Schonberger LB, Hinman AR et al. Vaccine-associated paralytic poliomyelitis. United States: 1973 through 1984. *JAMA*. 1987;257(10):1335-40. <http://dx.doi.org/10.1001/jama.1987.03390100073029>
7. Costa-Carvalho BT, Sullivan KE, Fontes PM, Aimé-Nobre F, Gonzales IGS, Lima ES et al. Low rates of poliovirus antibodies in primary immunodeficiency patients on regular intravenous immunoglobulin treatment. *J Clin Immunol*. 2018;38(5):628-34. <https://doi.org/10.1007/s10875-018-0531-x>
8. Kew OM, Sutter RW, Nottay BK, McDonough MJ, Prevots DR, Quick L et al. Prolonged replication of a type 1 vaccine-derived poliovirus in an immunodeficient patient. *J Clin Microbiol*. 1998;36(10):2893-9.
9. Dias-Tosta E, Kückelhaus CS. Neurological morbidity in vaccine-associated paralytic poliomyelitis in Brazil from 1989 up to 1995. *Arq Neuropsiquiatr*. 2004;62(2):414-20. <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-282X2004000300008>
10. Ministério da Saúde - Brasil. Informe Técnico da introdução da vacina inativada poliomielite. [acesso 2018 Jun 22]. Disponível em: <http://www.sgc.goias.gov.br/upload/arquivos/2012-08/informe-tecnico-introducao-da-vacina-inativada-poliomielite-vip-2012.pdf>
11. Iniciativa de Erradicação Global da Pólio. Pólio hoje. [acesso 2018 Jun 05]. Disponível em: <http://polioeradication.org/polio-today/polio-now/this-week/>
12. World Health Organization - WHO. Polio Global Eradication Initiative-Polio Eradication & Endgame Strategic Plan 2013-2018.[acesso 2018 Jun 13]. Disponível em: [http://polioeradication.org/wp-content/uploads/2016/07/PEESP\\_EN\\_A4.pdf](http://polioeradication.org/wp-content/uploads/2016/07/PEESP_EN_A4.pdf)
13. World Health Organization - WHO. Weekly epidemiological record. 2016;91(19):249-256. [acesso 2018 Mai 28]. Disponível em: <http://www.who.int/wer/2016/wer9119/en/>
14. World Health Organization - WHO. Global action plan for laboratory containment of wild polioviruses. 2.ed. Geneva:WHO;2003. [acesso 2018 Mai 29]. Disponível em: [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/68205/WHO\\_V\\_03.11\\_eng.pdf;jsessionid=2900A123BAB08299F0BBC7A87BC1D51F?sequence=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/68205/WHO_V_03.11_eng.pdf;jsessionid=2900A123BAB08299F0BBC7A87BC1D51F?sequence=1)
15. World Health Organization - WHO. Polio laboratory manual. 2.ed. Geneva: WHO; 2004. [acesso 2018 Mai 29]. Disponível em: [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/68762/WHO\\_IVB\\_04.10.pdf?sequence](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/68762/WHO_IVB_04.10.pdf?sequence)



16. Machado CM. Reimmunization after bone marrow transplantation--current recommendations and perspectives. *Braz J Med Biol Res*. 2004;37(1):151-8. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2004000100021>
17. Reed L, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg*. 1938;27(3):493-7.
18. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977;33(1):159-74.
19. Fleiss JL. The measurement of interrater agreement. *In: Fleiss JL, Statistical Methods for Rates and Proportions*. New York: John Wiley;1981.p.212-36.
20. Siegel S, Castellan N. *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*. 2.ed. New York: McGraw-Hill;1988.
21. Sistema de Informação de agravos de Notificação – SINAM. Paralisia flácida aguda/Poliomielite. [acesso 2018 Jun 5]. Disponível em: <http://portalsinan.saude.gov.br/paralisia-flacida-aguda-poliomielite>
22. Barbosa V, Stewien KE, Rosenburg CP. Estado vacinal, tipo de habitação e nível cultural da mãe e sua relação com o estado imunitário à poliomielite, em uma amostra de escolares do município de São Paulo, Brasil. *Rev Saúde Pública*. 1977;11:330-7.
23. Paul JR, Trask JD. The neutralization test in poliomyelitis. Comparative results with four strains of the virus. *J Exp Med*. 1935; 61(4):447-64. <https://doi.org/10.1084/jem.61.4.447>
24. Howitt BF. Poliomyelitis: in vitro neutralization tests, using normal adult and convalescent human serums. *Cal West Med*. 1935;43(6):407-11.
25. Herremans MM, Reimerink JH, Ras A, Van Der Avoort HG, Kimman TG, Van Loon AM et al. Evaluation of a poliovirus-binding inhibition assay as an alternative to the virus neutralization test. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1997;4(6):659-64.
26. Hashido M, Horie H, Abe S, Doi Y, Hashizume S, Agboatwalla M et al Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay based on binding inhibition for type-specific quantification of poliovirus neutralization-relevant antibodies. *Microbiol Immunol*. 1999;43(1):73-7. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1999.tb02375.x>
27. Ivanov AP, Dragunsky EM. ELISA as a possible alternative to the neutralization test for evaluating the immune response to poliovirus vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2005;4(2):167-72. <https://doi.org/10.1586/14760584.4.2.167>
28. Schepp RM, Berbers GAM, Ferreira JA, Reimerinka JH, Van der Klis FR. A novel multiplex poliovirus binding inhibition assay applicable for large serosurveillance and vaccine studies, without the use of live poliovirus. *J Virol Methods*. 2017;241:15-23. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.12.006>



# Eficiência da pasteurização lenta do leite de cabra em diferentes binômios tempo/temperatura

## Efficiency of slow pasteurization of goat milk in the different time/temperature binomials

RIALA6/1769

Quelson Prestes COSTA<sup>1\*</sup>, Bruna Samara dos Santos REKOWSKY<sup>1</sup>, Marion Pereira COSTA<sup>1</sup>, Nelson de Carvalho DELFINO<sup>2</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Laboratório de Inspeção e Tecnologia de Leite e Derivados, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, Av. Adhemar de Barros, 500, Ondina, Salvador, BA, Brasil, CEP: 40170-110. Tel: 71 3283 6700. E-mail: [quelsonpc@hotmail.com](mailto:quelsonpc@hotmail.com)

<sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia

Recebido: 27.06.2018 - Aceito para publicação: 19.03.2019

### RESUMO

O presente estudo analisou um binômio de tempo-temperatura alternativo para ser utilizado na pasteurização lenta sobre a inativação da fosfatase alcalina no leite caprino. Sua eficiência foi demonstrada pela contagem padrão em placas, e foi feita a comparação no processamento de leite refrigerado e congelado. Foram utilizados 18 tratamentos em leite caprino cru (nove em leite refrigerado e nove em leite congelado). Estes foram acondicionados em frascos de 300 mL, pasteurizados a 60, 63 e 65°C durante 10-20-30 minutos, e testadas às enzimas fosfatase alcalina e peroxidase. A contagem padrão em placas (CPP) e coliformes a 35 e 45°C foi feita nas amostras cruas e em cada tratamento, em duplicata. Após a pasteurização, todos os tratamentos apresentaram: não crescimento de microrganismos mesófilos, coliformes com <0,3 NMP/mL, prova de fosfatase negativa e peroxidase positiva. A pasteurização foi eficiente para melhorar a qualidade microbiológica do leite tanto refrigerado quanto congelado. Todos os binômios avaliados apresentaram resultados satisfatórios para alcançar os parâmetros preconizados em legislação, sugerindo-se o menor binômio (60°C por 10 min). Não houve diferença entre as formas de armazenamento das amostras: refrigerada ou congelada.

**Palavras-chave.** fosfatase alcalina, lactoperoxidase, mesófilos, coliformes, pasteurização, leite caprino.

### ABSTRACT

The objective of this study was to investigate an alternative time-temperature binomial to be used in the slow pasteurization on the alkaline phosphatase inactivation in the goat milk. Its efficiency was demonstrated with the standard counting in plates, and also refrigerated and the frozen milks processing were compared. Eighteen treatments were used in the raw goat milk (nine refrigerated milk and nine frozen milk). They were packed in 300 mL-flasks, pasteurized at 60-63-65°C for 10, 20, 30 minutes, and then tested for alkaline phosphatase and peroxidase enzymes. The standard counts in plates (CPP) and coliforms at 35°C and 45°C were performed in the raw samples and in the every treatment, in duplicate. After the pasteurization process, all of the treatments showed: no growth of mesophilic microorganisms, coliforms with <0.3 MPN / mL, negative phosphatase and positive peroxidase tests. The pasteurization was efficient to improve the microbiological quality of the milk either refrigerated or frozen. All of the evaluated binomials presented satisfactory results to reach the recommended parameters preconized in the legislation, suggesting the smaller binomial (60°C for 10 min). There was no difference between the samples storage form, either refrigerated or frozen.

**Keywords.** alkaline phosphatase, lactoperoxidase, mesophiles, coliforms, pasteurization, goat milk.

## INTRODUÇÃO

O Brasil produziu 153.659 toneladas de leite de cabra em 2014<sup>1</sup>, com destaque para a região Nordeste do país, a qual detém 92% do rebanho caprino brasileiro<sup>2</sup>. O leite caprino apresenta algumas características nutricionais e terapêuticas que o diferenciam do leite de outras espécies e que fazem desse produto uma alternativa na dieta de crianças, idosos e alérgicos ao leite bovino<sup>3-5</sup>. Tem ainda como características de destaque o teor de proteínas de alto valor nutritivo e a excelente digestibilidade, além de ser um produto hipoalergênico<sup>6</sup>. Apesar de possuir diversas características benéficas, o leite de cabra é um produto ainda pouco explorado<sup>7</sup>.

O leite de cabra é o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de animais da espécie caprina sadios, bem alimentados e descansados<sup>8</sup>. Tendo como principal beneficiamento na região Nordeste a pasteurização com direcionamento para fabricação de subprodutos, como queijo e iogurte<sup>9,10</sup>. A pasteurização é um dos tratamentos térmicos ao qual o leite pode ser submetido para eliminação da sua microbiota, a fim de destruir os microrganismos patogênicos que possam contaminar o mesmo. Quanto maior o total de contagens bacterianas, maior o risco de surto de doenças veiculadas por alimentos ou comprometimento do processo de manufatura de derivados lácteos. Assim, para que o leite não se torne um produto nocivo ao consumo humano, além de reduzir a carga bacteriana a limites aceitáveis, a pasteurização promove mínimas modificações químicas, físicas, sensoriais e nutricionais<sup>11</sup>.

O tratamento térmico do leite deve ser eficiente ao nível de atender às combinações tempo/temperatura requeridas para obter um produto com qualidade higiênica satisfatória e prolongar a vida útil do mesmo, sem causar prejuízos decorrentes do calor às suas posteriores tecnologias de beneficiamento<sup>12</sup>.

Um dos processos de pasteurização permitidos pela legislação é a pasteurização lenta, que consiste no aquecimento indireto do leite entre 63°C e 65°C pelo período de trinta minutos, mantendo-se o leite sob agitação mecânica, lenta, em aparelhagem própria<sup>8</sup>. O leite, quando devidamente pasteurizado não pode conter fosfatase alcalina, pois esta é uma enzima sensível à pasteurização e sua presença no produto

final indica a ineficiência desse processo térmico. Logo, esta enzima é pesquisada para comprovar que o tempo e a temperatura aplicados na pasteurização foram efetivos<sup>13</sup>. A verificação da atividade residual da FA como indicador da eficiência da pasteurização é amplamente utilizada no país e no mundo<sup>14</sup>, existem vários relatos na literatura que verificaram a adequação da pasteurização do leite bovino<sup>15</sup>. Contudo, não se tem estudos que demonstrem com precisão o tempo e a temperatura necessários para a inativação da atividade da fosfatase alcalina no leite de cabra, que naturalmente contém níveis diferentes da enzima quando comparado com o leite bovino. Apesar do teste de fosfatase alcalina ser bastante confiável para o leite de vaca, não se tem clareza de sua aplicação para verificar a adequação da pasteurização para o leite caprino dentro dos padrões atuais<sup>16</sup>. Sendo a atividade da fosfatase em leite caprino cerca de 2 a 5 vezes menor que no leite de vaca<sup>17</sup>.

Quanto mais se eleva a temperatura no processo térmico, mais profundas são as transformações físico-químicas no leite. Estas alterações afetam o equilíbrio das substâncias nitrogenadas e dos sais minerais, assim como do conteúdo vitamínico<sup>18</sup>. Isso faz com que o produto final da fabricação de derivados do leite caprino seja prejudicado. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar através de parâmetros microbiológicos e teste colorimétrico qualitativo a eficiência da inativação da fosfatase alcalina após pasteurização lenta no leite de cabra em diferentes temperaturas e tempos, verificar qual o melhor tratamento para o leite dessa espécie e comparar a eficiência do tratamento térmico do leite refrigerado e congelado.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Obtenção da matéria-prima

O leite foi obtido de um rebanho de cabras Saanen, situado na cidade de Camaçari, Bahia. Foram coletados 5 litros de leite refrigerado e 5 litros de leite congelado (10 litros no total). Posteriormente, o material foi acondicionado em garrafas plásticas específicas de 500 mL, dentro de isopor com gelo e mantas sob refrigeração em temperatura não superior a 7 °C e transportadas imediatamente para o Laboratório de Inspeção e Tecnologia de Leite e Derivados (LaITLácteos) da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Bahia.

## Processo de pasteurização

Para realizar o tratamento térmico, as amostras foram colocadas em frascos de vidro de 300 mL, identificadas, levadas ao tanque de banho-maria e aquecidas gradativamente a 60°C (T1), 63°C (T2) e 65°C (T3). Foram utilizados dois tipos de amostras, uma contendo leite refrigerado e outra congelado, ambos pasteurizados através de nove tratamentos. Os tratamentos consistiam em variação da temperatura (T1, T2 e T3) em três períodos de tempo (10, 20 e 30 min), totalizando 18 tratamentos.

A **Tabela 1** apresenta as amostras com seus respectivos tratamentos. O experimento foi conduzido em triplicata experimental, e as análises foram realizadas em duplicata analítica.

**Tabela 1.** Amostras de leite caprino com seus respectivos tratamentos

Tratamento	Tipo de leite	
	Congelado	Refrigerado
60°C/10 min	T <sub>1</sub> C <sub>10</sub>	T <sub>1</sub> R <sub>10</sub>
60°C/20 min	T <sub>1</sub> C <sub>20</sub>	T <sub>1</sub> R <sub>20</sub>
60°C/30 min	T <sub>1</sub> C <sub>30</sub>	T <sub>1</sub> R <sub>30</sub>
63°C/10 min	T <sub>2</sub> C <sub>10</sub>	T <sub>2</sub> R <sub>10</sub>
63°C/20 min	T <sub>2</sub> C <sub>20</sub>	T <sub>2</sub> R <sub>20</sub>
63°C/30 min	T <sub>2</sub> C <sub>30</sub>	T <sub>2</sub> R <sub>30</sub>
65°C/10 min	T <sub>3</sub> C <sub>10</sub>	T <sub>3</sub> R <sub>10</sub>
65°C/20 min	T <sub>3</sub> C <sub>20</sub>	T <sub>3</sub> R <sub>20</sub>
65°C/30 min	T <sub>3</sub> C <sub>30</sub>	T <sub>3</sub> R <sub>30</sub>

T<sub>1</sub>= 60°C; T<sub>2</sub>= 63°C; T<sub>3</sub>= 65°C

## Teste da fosfatase alcalina e lactoperoxidase

A determinação da fosfatase alcalina (FA) permite avaliar a eficiência do processo de pasteurização. Com essa finalidade, foi aplicado um teste colorimétrico comercial (Cap-Lab<sup>®</sup>), no qual a tira reagente determinou qualitativamente esta enzima. A técnica baseia-se na hidrólise de p-nitrofenilfosfato em p-nitrofenol e fosfato, na presença de íons magnésio e fosfatase alcalina, cujo nitrofenol formado possui coloração amarela indicando prova positiva. Logo após o tratamento térmico das amostras, foi imerso uma tira reagente em cada uma delas durante 10 segundos, posteriormente foi realizada a leitura passados dois minutos.

A determinação da lactoperoxidase permite avaliar a eficiência do processo de pasteurização.

Com essa finalidade, também foi aplicado um teste colorimétrico comercial (Cap-Lab<sup>®</sup>), no qual a tira reagente determinou qualitativamente esta enzima. A lactoperoxidase é uma enzima presente naturalmente no leite e a técnica de sua determinação baseia-se na inativação da mesma se o leite for aquecido acima de 80°C por alguns segundos. Imediatamente após a pasteurização o produto processado deve apresentar teste positivo para a peroxidase. Após o tratamento térmico das amostras, foi imerso uma tira reagente em cada uma delas durante 10 segundos e posteriormente foi realizada a leitura depois de dois minutos.

## Análises microbiológicas

As análises microbiológicas dos leites refrigerado e congelado foram realizadas seguindo a Instrução Normativa nº 62 recomendada pelo Ministério da Agricultura<sup>19</sup>. As amostras foram submetidas à determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes a 35°C, coliformes a 45°C e contagem padrão em placas (CPP) no leite cru refrigerado e congelado e posteriormente nos tratamentos. No entanto, a legislação brasileira estabelece padrões microbiológicos para o leite de cabra cru apenas para contagem global<sup>8</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da análise de fosfatase alcalina mostraram que todos os tratamentos da pasteurização foram eficientes na inativação da mesma, demonstrado pela coloração da fita utilizada no teste de fosfatase. A coloração amarela intensa significa que há a presença da fosfatase, observada na análise de leite cru. Após os tratamentos térmicos em seus respectivos tempos, todas as tiras do teste apresentaram a coloração amarelo pálido, a qual resulta da inativação da FA após a pasteurização. Essa análise foi realizada em tempo zero, imediatamente após a pasteurização, segundo Rankin et al<sup>20</sup> esse tipo de conduta fornece resultados mais precisos para provas de FA. O fundamento da pasteurização está na correta utilização do binômio tempo-temperatura, a fim de provocar a eliminação da microbiota patogênica e possibilitar a segurança alimentar do produto. Durante o processo todas as partículas devem ser aquecidas até uma determinada temperatura mínima por um tempo específico<sup>21</sup>. Esse aquecimento destrói grande parte da flora microbiana e inativa sistemas enzimáticos,

esse fato pode ser observado neste trabalho através da relação dos resultados do crescimento bacteriano com a ausência da fosfatase alcalina, nos quais todos os tratamentos demonstraram o não crescimento bacteriano, ou o crescimento dentro dos padrões preconizados por legislação (Amostra T<sub>1</sub>R<sub>10</sub>). Todas as amostras foram aquecidas com temperaturas inferiores a 80°C, que é a temperatura mínima para inativação da lactoperoxidase, por esse motivo apresentaram resultados positivos para essa enzima.

Estes resultados estão de acordo com o estudo de Wilińska et al<sup>22</sup>, os quais examinaram a estabilidade térmica da FA no leite bovino e caprino na faixa de temperatura entre 54-69°C e verificaram que todas as amostras demonstraram grandes taxas de inativação. Vamvakaki et al<sup>23</sup> também encontraram redução da atividade da fosfatase alcalina mais rápida em leite caprino e ovino em comparação com o leite bovino na temperatura de 59°C. Outro binômio inferior estabelecido pela legislação brasileira foi aplicado por Lorenzen et al<sup>24</sup> em leite caprino, no qual o tratamento térmico de 62°C por 30 minutos conseguiu resultados satisfatórios para o limiar de fosfatase alcalina. Isso demonstra que o leite caprino necessita de uma menor temperatura para inativação da fosfatase que o

leite bovino, permitindo a inferência de que a temperatura de pasteurização do leite de cabra pode ser menor que a já descrita.

A determinação da atividade da enzima lactoperoxidase foi realizada para verificação de superaquecimento do leite durante a pasteurização. Nesse experimento, observou-se que o teste de peroxidase foi positivo para todos os tratamentos realizados, o que demonstra que não ocorreu temperatura excessiva durante a execução do estudo, uma vez que a enzima ainda se encontrava presente na amostra.

A contagem de mesófilos neste experimento teve 6,2 x 10<sup>4</sup> UFC/mL para o leite congelado e 9,5 x 10<sup>4</sup> UFC/mL para o leite refrigerado antes da pasteurização (**Tabela 2**). Souza et al<sup>5</sup> ao avaliar três lotes de leite cru, encontraram valores superiores ao do presente estudo, variando de 1,15 x 10<sup>5</sup> e 1,18 x 10<sup>5</sup> UFC/mL. Os resultados das análises microbiológicas de leite cru no presente estudo demonstraram uma possível falha no processo de ordenha do leite, uma vez que foi observada a presença de coliformes no leite sem a pasteurização (110 NMP), conforme a **Tabela 2**.

**Tabela 2.** Resultados das análises do leite caprino pré e pós tratamento térmico

Amostras	Coliformes (NMP.mL <sup>-1</sup> )		Mesófilos (Log UFC.mL <sup>-1</sup> )		Fosfatase		Lactoperoxidas	
	Congelado	Resfriado	Congelado	Resfriado	Congelado	Resfriado	Congelado	Resfriado
Cru	110	110	4,79	4,97	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
60°C/10min	<0,3	<0,3	0	2,29	Negativa	Negativa	Positiva	Positiva
60°C/20min	<0,3	<0,3	0	0	Negativa	Negativa	Positiva	Positiva
60°C/30min	<0,3	<0,3	0	0	Negativa	Negativa	Positiva	Positiva
63°C/10min	<0,3	<0,3	0	0	Negativa	Negativa	Positiva	Positiva
63°C/20min	<0,3	<0,3	0	0	Negativa	Negativa	Positiva	Positiva
63°C/30min	<0,3	<0,3	0	0	Negativa	Negativa	Positiva	Positiva
65°C/10min	<0,3	<0,3	0	0	Negativa	Negativa	Positiva	Positiva
65°C/20min	<0,3	<0,3	0	0	Negativa	Negativa	Positiva	Positiva
65°C/30min	<0,3	<0,3	0	0	Negativa	Negativa	Positiva	Positiva



Ao analisar a composição microbiana do leite de cabra, Foschino et al<sup>25</sup> observaram constante presença de coliformes no leite cru. Segundo Andrade et al<sup>26</sup>, a pesquisa de bactérias do grupo dos coliformes é importante devido à sua relação com a higiene durante a produção, na qual em seu estudo foi encontrada apenas uma amostra de leite cru com coliformes termotolerantes (0,4 NMP/mL).

Em relação aos resultados microbiológicos após a pasteurização, estes foram satisfatórios para todos os tratamentos térmicos, não apresentando contagem de microrganismos mesófilos (Log UFC.mL<sup>-1</sup>) e coliformes <0,3 NMP/mL. Em todas as amostras de leite pasteurizado analisadas, não houve a detecção de coliformes totais e termotolerantes, estando de acordo ao preconizado na legislação<sup>8</sup>. Souza et al<sup>5</sup> ao utilizarem a pasteurização lenta (63-65°C por 30 min) obtiveram semelhante eficiência na redução microbiana do leite caprino. Costa et al<sup>27</sup> também observou a redução de mesófilos e coliformes no leite de cabra após o processo de pasteurização (62-65°C por 30 min), além disso, verificou ainda a redução de *Staphylococcus* coagulase positiva e a ausência de *Salmonella* spp.

Ao comparar a duplicata de leite refrigerado com o leite congelado, observou-se resultados equivalentes em todas as análises antes e após o tratamento térmico de ambos os tipos de leite. Isso mostra que o congelamento anterior à pasteurização do leite caprino não interfere no processo de inativação da fosfatase alcalina

## CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que todos os tratamentos foram suficientes para alcançar os parâmetros preconizados na Instrução Normativa nº 37 de 31/10/2000, podendo-se utilizar o menor binômio de tempo-temperatura (60°C por 10 min), não existindo diferença entre a forma de armazenamento das amostras, refrigerada ou congelada.

## REFERÊNCIAS

1. Food and Agriculture Organization – FAO. FAOSTAT; 2014. [acesso 2018 Mai 16]. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL>
2. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. IBGE. Cidades. 2014. [acesso 2018 Mai 16]. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2014/default.shtm>
3. Ribeiro AC, Ribeiro SDA. Specialty products made from goat milk. *Small Rumin Res*. 2010;89(2):225-33. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.12.048>
4. Garcia RV, Travassos AER. Aspectos gerais sobre o leite de cabra: uma revisão. *Rev Inst Latic Cândido Tostes*. 2012;67(386):81-8. <https://doi.org/10.5935/2238-6416.20120039>
5. Souza AK, Fiorini JE, Moraes ALL, Oliveira NDMS, Clareto SS, Nascimento LC. Características microbiológicas e físico-químicas do leite de cabra submetido à pasteurização e ao congelamento, comercializado na cidade de Alfenas-MG. *Rev Univ Vale Rio Verde*. 2013;11(1):224-33. Disponível em: [http://periodicos.unincor.br/index.php/revistaunincor/article/view/946/pdf\\_23](http://periodicos.unincor.br/index.php/revistaunincor/article/view/946/pdf_23)
6. Santos KMO, Bomfim MAD, Vieira ADS, Benevides SD, Saad SM, Buriti FCA et al. Probiotic caprine Coalho cheese naturally enriched in conjugated linoleic acid as a vehicle for *Lactobacillus acidophilus* and beneficial fatty acids. *Int Dairy J*. 2012;24(2):107-12. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.12.001>
7. Bomfim M, Santos KMO, Queiroga RCRE, Cordeiro PC, Oliveira LS. Produção e qualidade do leite de cabra no Brasil. XXIII Congresso Brasileiro de Zootecnia; maio de 2013; Foz do Iguaçu: Zootecnia do futuro: Produção Animal Sustentável. p.4711-18.
8. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BR) – MAPA. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 37, de 31 de outubro de 2000. Aprova o Regulamento técnico de identidade e qualidade do leite de cabra. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 08 nov2000. Seção I, p.23.
9. Rohenkohl JE, Corrêa GF, Azambuja DF, Ferreira FR. O agronegócio de leite de ovinos e caprinos. *Indic Econ FEE*. 2011;39(2):97-114. Disponível em:

- <https://revistas.fee.tche.br/index.php/indicadores/article/view/2510/2975>
10. Perdigão NROF, Oliveira SL, Cordeiro AGPC. Sistemas de Produção de Caprinos Leiteiros. XIII workshop sobre produção de caprinos na região da mata atlântica; 2016; Coronel Pacheco: Embrapa Gado de Leite. p.11-35. [acesso 2018 Mai 29]. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1051053/1/CNPC2016Doc119.pdf>
  11. Raynal-Ljutovac K, Park YW, Gaucheron F, Bouhallab S. Heat stability and enzymatic modifications of goat and sheep milk. *Small Rumin Res*. 2007;68(1):207-20. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.09.006>
  12. Blel M, Guingamp MF, Gaillard JL, Humbert G. Improvement of a method for the measurement of lactoperoxidase activity in milk. *Int Dairy J*. 2001;11(10):795-9.
  13. Tamanini R, Silva LCC, Monteiro AA, Magnani DF, Barros MAF, Beloti V. Avaliação da qualidade microbiológica e dos parâmetros enzimáticos da pasteurização de leite tipo “C” produzido na região norte do Paraná. *Semina: Ciên Agrár*. 2007;28(3):449-54. Disponível em: <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/2968/2514>
  14. Seixas FN, Fagnani R, Rios EA, Pereira JR, Tamanini R, Beloti V. Comparação de métodos para detecção de fosfatase alcalina e peroxidase em leite. *Rev Inst Latic Cândido Tostes*. 2014;69(1):17-24. <https://doi.org/10.14295/2238-6416.v69i1.302>
  15. Ranieri ML, Boor KJ. Bacterial ecology of high-temperature, short-time pasteurized milk processed in the United States. *J Dairy Sci*. 2009;92(10):4833-40. <https://dx.doi.org/10.3168/jds.2009-2181>
  16. Klotz V, Hill A, Warriner K, Griffiths M, Odumeru J. Assessment of the colorimetric and fluorometric assays for alkaline phosphatase activity in cow's, goat's, and sheep's milk. *J Food Prot*. 2008;71(9):1884-8. <https://dx.doi.org/10.4315/0362-028X-71.9.1884>
  17. Sharma R, Kaur S, Rajput YS, Kumar R. Activity and thermal stability of indigenous enzymes in cow, buffalo and goat milk. *Milchwissenschaft*. 2009;64(2): 173.
  18. Souza AK. Características microbiológicas e físico-químicas do leite de cabra submetido à pasteurização e ao congelamento comercializado em Alfenas [dissertação de mestrado]. Alfenas (MG): Universidade José do Rosário Vellano; 2012. Disponível em: <http://tede2.unifenas.br:8080/jspui/bitstream/jspui/131/1/AlanKardecdeSouza-dissertacao.pdf>
  19. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (BR)–MAPA. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, 18 set 2003. Seção1, p.14.
  20. Rankin SA, Christiansen A, Lee W, Banavara DS, Lopez-Hernandez A. Invited review: the application of alkaline phosphatase assays for the validation of milk product pasteurization. *J Dairy Sci*. 2010;93(12):5538-51. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3400>
  21. National Advisory Committee On Microbiological Criteria For Foods - NACMCF. Requisite scientific parameters for establishing the equivalence of alternative methods of pasteurization. *J Food Prot*. 2006;69(5):1190-1216. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.5.1190>
  22. Wilińska A, Bryjak J, Illeova V, Polakovič M. Kinetics of thermal inactivation of alkaline phosphatase in bovine and caprine milk and buffer. *Int Dairy J*. 2007;17(6):579-86. <https://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.08.008>
  23. Vamvakaki AN, Zoidou E, Moatsou G, Bokari M, Anifantakis E. Residual alkaline phosphatase activity after heat treatment of ovine and caprine milk. *Small Rumin Res*. 2006;65(3):237-41. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.06.025>

24. Lorenzen PC, Martin D, Clawin-Rädecker I, Barth K, Knappstein K. Activities of alkaline phosphatase,  $\gamma$ -glutamyltransferase and lactoperoxidase in cow, sheep and goat's milk in relation to heat treatment. *Small Rumin Res*. 2010;89(1):18-23. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.11.013>
25. Foschino R, Invernizzi A, Barucco R, Stradiotto K. Microbial composition, including the incidence of pathogens, of goat milk from the Bergamo region of Italy during a lactation year. *J Dairy Res*. 2002; 69(2):213-25. <https://doi.org/10.1017/S0022029902005459>
26. Andrade PVD, Souza MR, Penna CFAM, Ferreira JM. Características microbiológicas e físico-químicas do leite de cabra submetido à pasteurização lenta pós-envase e ao congelamento. *Cien Rural*. 2008;38(5):1424-30. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782008000500036>
27. Costa MP, Silva HLA, Balthazar CF, Franco RM, Cortez MAS. Economic performance and sensory analysis of probiotic “minas frescal” cheese produced using bovine and caprine milk. *Encicl Biosf*. 2013;9(17):2306-14. Disponível em: <http://www.conhecer.org.br/enciclop/2013b/CIENCIAS%20AGRARIAS/RENDIMENTO%20ECONOMICO.pdf>



# Perfil sorológico dos pacientes com suspeita clínica de paracoccidiodomicose avaliados pelo Instituto Adolfo Lutz no ano de 2016

## Serological profile of patients with clinical suspicion of paracoccidiodomycosis evaluated by Instituto Adolfo Lutz in 2016

RIALA6/1770

Camila Mika KAMIKAWA, Karolina Rosa Fernandes BERALDO, Lúcia Cupertino BARRETO, Mayra Simioni ZAPAROLI, Adriana Pardini VICENTINI\*

\*Endereço para correspondência: Centro de Imunologia, Instituto Adolfo Lutz, Avenida Dr. Arnaldo, 355, São Paulo, SP, Brasil, CEP: 01246-000. Fone/Fax: +55 11 3068 2898.  
E-mail: [adriana.vicentini@ial.sp.gov.br](mailto:adriana.vicentini@ial.sp.gov.br)

Recebido: 07.03.2018 - Aceito para publicação: 28.03.2019

### RESUMO

Oitenta por cento dos casos de paracoccidiodomicose (PMC) ocorrem no Brasil. As regiões brasileiras com maior número de casos são: sul, sudeste e centro-oeste, sendo emergente no norte e nordeste. A imunodifusão dupla em gel de agarose assume grande importância no diagnóstico, por permitir o monitoramento da doença e por oferecer subsídios para levantamentos soroepidemiológicos. O objetivo deste trabalho foi de avaliar e caracterizar os pacientes atendidos no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, em 2016. Trata-se de um estudo retrospectivo realizado utilizando-se dados secundários e avaliando-se as seguintes informações: idade, sexo, procedência do pedido médico, resultado e histórico sorológico dos pacientes. Dos 1.408 pacientes, 12,8% apresentaram reatividade sorológica para *Paracoccidioides brasiliensis*. Destes, 42,5% não possuíam histórico sorológico, sendo considerados como casos novos da doença. A classificação dos pacientes reagentes por gênero demonstrou que 83,4% eram do sexo masculino, com razão de masculinidade de 5:1. A faixa etária variou de um (1) a 92 anos, e aproximadamente 40% dos pacientes eram da faixa etária de 41 a 60 anos. Este estudo demonstra e reforça a importância da implementação dos estudos soroepidemiológicos como ferramenta auxiliar para nortear as ações de vigilância e políticas em saúde na PCM.

**Palavras.** *Paracoccidioides brasiliensis*, paracoccidiodomicose, imunodiagnóstico.

### ABSTRACT

Eighty percent of paracoccidiodomycosis (PMC) cases occur in Brazil. The highest numbers occur in south, southeast and center-west region, being emergent in the north and northeast areas. The double immunodiffusion in agarose gel is valuable for its diagnosis, as it allows the monitoring of the disease and offers subsidies for the seroepidemiological surveys. This study evaluated and characterized the patients attended in 2016 at the Mycoses Immunodiagnosis Laboratory of Adolfo Lutz Institute of São Paulo. This retrospective study, based on the secondary data, evaluated the information: age, sex, medical request origin, result and serological history of the patients. Of 1,408 patients, 12.8% presented positive serological reactivity for *Paracoccidioides brasiliensis*. Of them, 42.5% had no serological history and they were considered as new cases. The classification of reactive patients by gender showed that 83.4% were males, being the masculinity ratio of 5:1. The age range was one (1) to 92 years old, and  $\pm 40\%$  of the patients were of age ranging from 41-60 years old. This study reinforces the importance of the implementation of the seroepidemiological studies as to guide the surveillance actions and the public health politics in PCM.

**Keywords.** *Paracoccidioides brasiliensis*, paracoccidiodomycosis, immunodiagnosis.

## INTRODUÇÃO

A paracoccidiodomicose (PCM), causada por fungos do gênero *Paracoccidioides*: *P. brasiliensis* e *P. lutzii* é micose de alta endemicidade na América do Sul, entretanto, aproximadamente 80% dos casos são registrados no Brasil, particularmente nos estados de São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás e Rondônia<sup>1,2</sup>.

A PCM acomete predominantemente indivíduos do sexo masculino com faixa etária entre 30 a 50 anos, residentes em áreas rurais ou periurbanas, que exercem ou exerceram atividades relacionadas à agropecuária<sup>1-3</sup>. Estima-se que, a cada ano, a taxa de incidência na população brasileira seja de 1 a 3 casos por 100.000 habitantes<sup>4</sup>. Contudo, deve-se ressaltar que a PCM pode ter seu diagnóstico clínico confundido com outros processos infecciosos causados por *Leishmania* spp. e *Mycobacterium tuberculosis*, além de apresentar índices expressivos de letalidade estimados entre 2 a 23% nos casos graves, podendo alcançar 30% quando associada a AIDS<sup>5</sup>. Até 2002, a micose figurava como oitava causa de morte por doença, entre as infecciosas e parasitárias<sup>6</sup>. Dados registrados durante o período de 2010 a 2015, junto ao sistema de informações sobre mortalidade, do Ministério da Saúde, revelam que a infecção por *P. brasiliensis* ainda é considerada a principal causa de mortalidade entre as micoses no país, apresentando média de 133,4 óbitos/ano<sup>7</sup>.

O diagnóstico de certeza da PCM deriva da demonstração e do reconhecimento do agente etiológico em preparados histológicos, exame a fresco ou em cultivo<sup>2,4</sup>. No entanto, em algumas situações entre as quais pode-se citar o estado físico ou clínico dos pacientes, torna-se impossível o acesso ao local da lesão, impedindo assim a coleta do material biológico.

Desta forma, técnicas imuno-sorológicas são de grande valia uma vez que permitem inferir o diagnóstico com certo grau de certeza, otimizando o tempo utilizado para se obter resultados, aliando sensibilidade à especificidade<sup>8,9</sup>.

A técnica sorológica amplamente utilizada para o imunodiagnóstico da PCM é a imunodifusão dupla em gel de agarose (ID), apresentando baixo custo operacional, alta especificidade e sensibilidade

variando de 65 a 100%; sendo de fácil execução, não necessitando de automação, assumindo grande importância por permitir o monitoramento da doença bem como por oferecer subsídios para levantamentos soroepidemiológicos<sup>8,10</sup>.

Kamikawa<sup>11</sup> e Kamikawa et al<sup>3</sup> demonstraram que 60% dos municípios do estado de São Paulo apresentaram ao menos um paciente com anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis*, detectados por imunodifusão dupla em gel de agarose. Os autores observaram que a maioria dos pacientes sorologicamente reagentes para *P. brasiliensis* concentrava-se nas macro-regiões de Campinas, São Paulo e Grande São Paulo, Sorocaba e São João da Boa Vista, enquanto as maiores taxas de reatividade foram observadas nos municípios de Piracicaba, Franca, Araçatuba e Presidente Prudente. Contudo, os autores ressaltaram que os resultados estão subestimados, uma vez que não foram incluídas no estudo, amostras de pacientes atendidos nos serviços de referência de importantes pólos endêmicos da doença como Botucatu, Ribeirão Preto, Araraquara e Bauru.

Segundo Pinto et al<sup>12</sup> no período de 2008 a 2011, 166 casos da micose foram notificados à Divisão de Tuberculose e outras Pneumopatias do Centro de Vigilância Epidemiológica Prof. Alexandre Vranjac de São Paulo. Os autores alertam que apesar da recomendação de notificação dos casos de PCM no estado de São Paulo, os dados apresentados encontram-se subnotificados, visto que das doze unidades de referência para atendimento da PCM, apenas quatro notificaram ao sistema de vigilância epidemiológica estadual, dificultando portanto, quaisquer iniciativas visando a prevenção, diagnóstico e melhorias no tratamento da mesma<sup>6,13</sup>.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar e caracterizar retrospectivamente, os pacientes atendidos no ano de 2016, pelo Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do Centro de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo.

## MATERIAL E MÉTODOS

O Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do Centro de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo (LIM-IAL-SP), de janeiro a dezembro de 2016, analisou, pela



reação de imunodifusão dupla em gel de agarose (provas qualitativa e semi-quantitativa), amostras biológicas de 1.408 pacientes com suspeita clínica de paracoccidiodomicose quanto à presença ou não de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis*.

Todo paciente cuja amostra foi enviada ao LIM-IAL-SP para realização de diagnóstico presuntivo e/ou confirmatório, foi registrado no Banco de Dados construído com a ajuda do software Microsoft-Access 2000. O banco de dados foi alimentado com informações extraídas das requisições de exame (número de amostra, unidade requisitante, procedência, matrícula, número do IAL, nome, sexo, idade, suspeita clínica, exame solicitado, nome e registro profissional do médico, data de coleta). Além destas, o banco contém informação referente ao resultado sorológico dos pacientes bem como um campo destinado ao acompanhamento laboratorial dos mesmos.

### Imunodifusão dupla em gel de agarose

Para a pesquisa de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis*, o LIM-IAL-SP, emprega-se rotineiramente a reação de imunodifusão dupla em gel de agarose (ID), proposta por Ouchterlony<sup>14</sup>. Toda amostra foi primeiramente avaliada pela prova qualitativa e no caso de reatividade frente a antígeno de *P. brasiliensis* (filtrado de cultura do isolado Pb B-339) a mesma foi avaliada, diluindo-se a amostra biológica na razão dois (2), pela prova semi-quantitativa a fim de determinar-se o título de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis*.

Resumidamente, lâminas de vidro (26x75mm) foram primeiramente revestidas com 1,0 mL de solução de ágar a 1% (p/v). Estas foram então recobertas com 3,0 mL de solução de agarose-citrato e deixadas em câmara úmida, a 4°C, até a solidificação da agarose. O gel foi escavado com auxílio de molde em forma de roseta (Bioficina-Indústria e Comércio de Aparelhos Laboratoriais, São Paulo-Brasil), contendo um orifício central e seis laterais, sendo o excesso do gel retirado empregando-se pipeta Pasteur acoplada à bomba de vácuo (DIA-PUMP Compressor, FANEN, São Paulo, Brasil). Após a aplicação dos imunobiológicos (antígeno de *P. brasiliensis* e anticorpo policlonal anti-antígeno de *P. brasiliensis*) e soros de pacientes com suspeita clínica de PCM nos orifícios, as lâminas foram

incubadas em câmara úmida, à temperatura ambiente, por 48 horas. Após esse período, com o auxílio de negatoscópio, realizou-se a leitura para verificação da presença ou não de linhas de precipitação. As lâminas de vidro foram lavadas por 45 minutos em solução citrato de sódio 5% (p/v), seguindo-se de sucessivas lavagens, por 24 horas, em solução salina 0,85%. Ao fim desta etapa, os orifícios foram recobertos com solução de ágar 1% (p/v) e as lâminas levadas para secar em estufa a 60°C (FANEN, São Paulo-Brasil). Após secagem, as lâminas foram coradas pelo Coomassie Brilliant Blue R (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA), durante 5 minutos e em seguida descoradas por aproximadamente 10 minutos, utilizando-se solução descorante (10% de ácido acético glacial, 45% de álcool etílico, 45% de água destilada). A leitura definitiva foi então realizada, por dois observadores distintos e os resultados registrados no banco de dados.

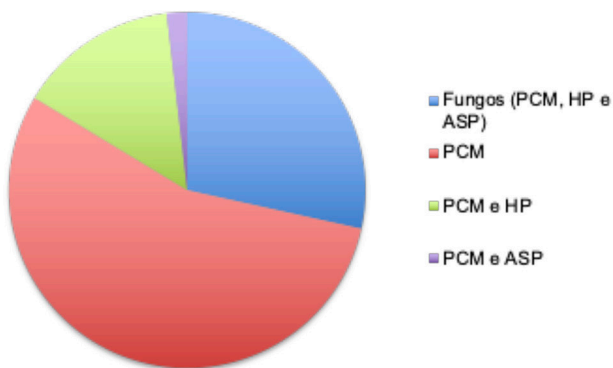
### Aspectos éticos

Para a condução deste estudo, não houve necessidade da obtenção de termo de consentimento livre e esclarecido, visto tratar-se de análise retrospectiva cujos resultados foram encaminhados aos serviços públicos solicitantes e informados ao paciente pelo seu médico, assegurando-se assim o acompanhamento, tratamento ou orientação do sujeito da pesquisa. Durante a tabulação dos dados foram respeitados e preservados o anonimato dos sujeitos da pesquisa e a confidencialidade das informações. O projeto foi aprovado pelos Comitês Científico e de Ética do IAL (CTC 68H/2015 e CAAE 39480814.1.3001.0059).

### RESULTADOS

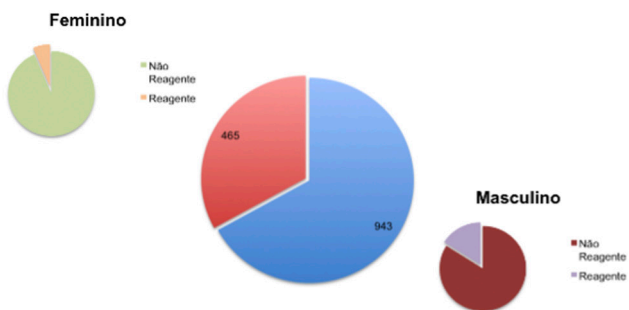
O Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do Instituto Adolfo Lutz realizou no ano de 2016, 1.408 avaliações sorológicas visando a pesquisa de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis*. A análise da porcentagem de requisições de exames recebidas revelou que: 55,2% corresponderam à solicitação de pesquisa de anticorpos circulantes para *P. brasiliensis*; 14,5% para *P. brasiliensis* e

*Histoplasma capsulatum*; 1,8% para *P. brasiliensis* e *Aspergillus fumigatus* e 28,5% das requisições solicitaram sorologia para fungos, ou seja, sorologia para *P. brasiliensis*, *H. capsulatum* e *A. fumigatus* (Figura 1).



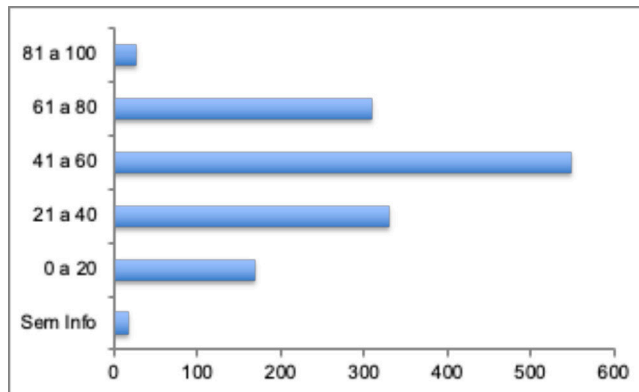
**Figura 1.** Distribuição das requisições de exames, no período de janeiro a dezembro de 2016, visando a pesquisa de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis*, anti-*P. brasiliensis* e anti-*H. capsulatum*, anti-*P. brasiliensis* e anti-*A. fumigatus* e anti-*P. brasiliensis*, anti-*H. capsulatum* e anti-*A. fumigatus*. Onde PCM: paracoccidiodomicose, HP: histoplasmose e ASP: aspergilose

Observou-se que 67% (943/1.408) dos pacientes com suspeita clínica de paracoccidiodomicose eram do sexo masculino e 33% (465/1.408) do feminino (Figura 2). Verificou-se ainda, que entre os indivíduos do sexo masculino, 16% (151/943) apresentaram reatividade sorológica para *P. brasiliensis* enquanto 6,5% (30/465) das amostras reagentes eram de pacientes do sexo feminino.



**Figura 2.** Distribuição dos pacientes segundo gênero, no período de janeiro a dezembro de 2016, com reatividade sorológica para *P. brasiliensis*

Em relação à faixa etária, verificou-se que a mesma variou de um (1) a 92 anos e, independentemente do sexo, a maioria dos indivíduos apresentou idade entre 41 a 60 anos (Figura 3).



**Figura 3.** Distribuição dos pacientes com suspeita clínica de PCM, segundo a faixa etária, registrados no ano de 2016

Dos 1.408 exames realizados no ano de 2016, visando a pesquisa de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis*, 181 (12,9%) apresentaram reatividade para *P. brasiliensis* e 1.227 (87,1%) apresentaram ausência de reatividade pela técnica de imunodifusão dupla em gel de agarose. Com relação ao acompanhamento sorológico dos mesmos, 350 pacientes apresentaram pelo menos uma observação neste campo do banco de dados, com o histórico mais antigo datando de 1994. Entre os pacientes com reatividade sorológica, 77 (42,5%) não possuíam registro de acompanhamento sorológico anterior em nosso banco de dados, sendo assim, considerados casos novos da doença.

Verificou-se que dos 645 municípios do estado de São Paulo, 149 enviaram, para análise sorológica, amostras de soro de pacientes com suspeita clínica para PCM. Destes, aproximadamente 41% (61 municípios) apresentaram pelo menos um paciente com reatividade sorológica para *P. brasiliensis*. As cidades com maior taxa de reatividade foram: São Paulo (22/337), Jundiaí (18/57), Sorocaba (18/119) e Campinas (15/99).

## DISCUSSÃO

O Instituto Adolfo Lutz, como Laboratório Central de Saúde Pública do estado de São Paulo, baseado nas diretrizes da Lei nº 8.080/1990 é responsável no estado pelo diagnóstico laboratorial da PCM sendo considerado Laboratório de Referência Estadual.

Contudo, por não ser doença de notificação compulsória em todos os estados da federação, os dados relacionados à real prevalência e taxas de mortalidade e morbidade da doença não são precisos<sup>2,13,15</sup>. As informações disponíveis na literatura baseiam-se principalmente em inquéritos epidemiológicos bem como na experiência de serviços de referência no atendimento de pacientes com a doença, tornando-se, portanto, difícil a comparação de nossos resultados com os demais trabalhos existentes<sup>16-24</sup>.

A análise das informações dos 1.408 pacientes com suspeita clínica da doença demonstrou que 67% (943) dos indivíduos eram do sexo masculino e 33% (465) do feminino sendo a razão de masculinidade de 2:1, sugerindo que o gênero não apresenta relação com a suspeita clínica da doença. Porém ao analisarmos os 181 pacientes com presença de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis* verificou-se que 83,4% (151/181) eram do sexo masculino e 16,6% (30/181) do feminino, demonstrando razão de masculinidade de 5:1, corroborando com os dados da literatura, onde Pinto et al<sup>12</sup> encontraram razão de masculinidade de 4:1; Bellissimo-Rodrigues et al<sup>25</sup> de 6:1; Moreto<sup>26</sup> de 7,2:1; Blotta et al<sup>23</sup> de 5,4:1; Marques et al<sup>18</sup> de 10,7:1; por outro lado, Vieira et al<sup>27</sup>, na região amazônica obtiveram relação entre pacientes masculino:feminino de 14:1; Paniago et al<sup>28</sup> no Mato Grosso do Sul obtiveram relação de 10:1; Telles-Filho et al<sup>29</sup> em Curitiba obtiveram relação de 9,1:1 e Almeida et al<sup>30</sup> demonstraram que esta razão foi de 10,2:1.

A distribuição da faixa etária entre os pacientes, tanto com suspeita clínica quanto os reagentes para PCM, mostrou que a maioria dos indivíduos apresentou idade entre 41 a 60 anos, corroborando com trabalhos anteriormente

realizados pelo Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses<sup>3,11,12</sup> e de outros grupos<sup>27,28</sup>. Vale ressaltar que os poucos trabalhos existentes avaliando a faixa etária dos pacientes, são baseados na avaliação da resposta imune celular (Reação de Hipersensibilidade do Tipo Tardio) e na avaliação sorológica de grupos de pacientes classificados segundo a forma clínica da doença, ou seja, PCM aguda/juvenil ou PCM crônica/adulto, porém empregando reações sorológicas e/ou antígenos diferentes ou ainda pelos estudos de mortalidade.

Além dos fatores de predisposição e modulação, como gênero e faixa etária, descritos anteriormente, Martinez<sup>1</sup> cita que a progressão da doença está intimamente relacionada à: a) características demográficas; b) condições e estilo de vida do hospedeiro (tabagismo e etilismo); c) etnia (negros e mulatos apresentam lesões disseminadas da forma aguda/subaguda da doença mais frequentemente que brancos); d) exposição rural (também atribuída a fatores hormonais); e) doenças de base (infecções crônicas, câncer e AIDS) e; f) tipo de resposta imunológica, influenciada principalmente por sua variabilidade genética (a comparação do sistema de histocompatibilidade de pacientes de diferentes regiões endêmicas sugere que a expressão clínica e progressão da infecção variam conforme a base genética dos mesmos).

O percentual de reatividade para *P. brasiliensis* das amostras encaminhadas ao LIM-IAL-SP foi de 12,4% e não apresentou grande diferença com a taxa de reatividade obtida em avaliação anterior realizada entre os anos de 1999 à 2010<sup>3</sup>. Existem algumas possíveis explicações para esta baixa reatividade sorológica, entre elas pode-se citar: a) falhas na avaliação clínica do paciente, visto que a patologia pode ter seu diagnóstico clínico confundido com outros processos infecciosos causados por *Leishmania* spp. e *Mycobacterium tuberculosis*<sup>5</sup>; b) os pacientes apresentarem grandes quantidades de IgG2, imunoglobulina não precipitante, contribuindo assim, para a liberação de resultado falso negativo<sup>31</sup>; c) os pacientes apresentarem níveis de anticorpos circulantes abaixo do limite de detecção da reação de imunodifusão dupla em gel

de agarose<sup>32</sup>; e d) os pacientes terem sido infectados por um isolado que não expresse e secrete quantidades suficientes da glicoproteína de 43 kDa (gp43), considerada o antígeno imunodominante de *P. brasiliensis*<sup>33</sup>.

Por outro lado, merece especial atenção os 77 pacientes classificados neste estudo como casos novos, que apresentaram reatividade sorológica para *P. brasiliensis* pela primeira vez no ano de 2016, resultando numa incidência de 5,37/100.000 habitantes/ano. Martinez em 2015<sup>34</sup> observou incidência estimada de 0,71 a 2,70/100.000 habitantes/ano em levantamento bibliográfico de estudos nas regiões sul e sudeste do Brasil. A revisão realizada avaliou artigos científicos de casos comprovados de PCM, porém o mesmo autor, ao revisar estudos soropidemiológicos, descreve somente avaliações em doadores de sangue e população indígena, que apresenta baixa taxa de reatividade, dificultando sua comparação com o presente trabalho e enfatizando a escassa bibliografia disponível na área epidemiológica da doença. A detecção de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis* em pacientes sem histórico sorológico indica fortemente que a doença é endêmica no estado de São Paulo e que *P. brasiliensis* ainda infecta indivíduos susceptíveis. Importante salientar que do ponto de vista de Saúde Pública, esta micose representa um importante problema, pelo seu alto potencial incapacitante e pelo número de mortes prematuras que provoca, quando não diagnosticada e tratada precocemente<sup>35,36</sup>.

É importante citar que mais 273 pacientes também apresentaram histórico sorológico em nosso banco de dados. Apesar da ausência de reatividade como resultado do exame, tais pacientes foram reagentes há alguns anos, ressaltando a importância do acompanhamento sorológico durante o tratamento realizado pelo paciente. Além disso, o histórico mantido no Laboratório permite ajudar os Programas de Vigilância, Manuais e Consenso em Paracoccidiodomicose que são publicados e atualizados sempre, visando: a) capacitar médicos, enfermeiros e laboratoristas para atender o Programa de Paracoccidiodomicose

no que se refere a tratamento e diagnóstico dos pacientes acometidos por este agravo; b) diagnosticar precocemente os pacientes acometidos com paracoccidiodomicose; c) disponibilizar e uniformizar o diagnóstico laboratorial (micológico e sorológico); d) disponibilizar anti-fúngicos de 1ª e 2ª linhas; e) promover ações de capacitação permanente de recursos humanos, diagnóstico clínico/epidemiológico e laboratorial, tratamento e monitoramento dos pacientes e avaliação do programa; f) determinar a real magnitude/prevalência da doença; g) caracterizar as formas clínicas; h) avaliar a distribuição geográfica; i) estimar os índices de letalidade e mortalidade e j) apoiar e promover o desenvolvimento técnico-científico.

Vale salientar também que os resultados obtidos sobre a taxa de reatividade das amostras de soro não representam exatamente a taxa de reatividade do estado de São Paulo, pois os diagnósticos micológico, imunológico e patológico de inúmeros indivíduos com suspeita clínica de PCM e/ou com a doença em atividade e/ou em acompanhamento, são absorvidos por outros serviços, especialmente aqueles vinculados às Universidades Estaduais e Hospitais Escola (Hospital das Clínicas) como no caso das cidades de Botucatu, Campinas, Ribeirão Preto ou ainda Clínicas Odontológicas ligadas às Universidades Estaduais com curso de odontologia como no caso das cidades de Araraquara, Bauru, Campinas e Ribeirão Preto.

Ao se avaliar a distribuição dos pacientes com suspeita clínica da doença nos diferentes municípios do estado de São Paulo, observou-se que esta se dá de forma heterogênea. Diversos estudos epidemiológicos sugerem que diferentes fatores, nas diferentes regiões, para cada fungo em particular (temperatura, salinidade, presença de substratos orgânicos, altitude, pluviosidade, umidade, clima, tipo de vegetação, etc) podem ser determinantes para a permanência ou manutenção transitória ou definitiva dos mesmos, caracterizando suas reserváreas<sup>1,34,37</sup>.

Assim, a ação conjunta dos hospitais,



Centro de Vigilância Epidemiológica e Instituto Adolfo Lutz como Laboratório de Referência Estadual, no Programa de Controle e Vigilância da Paracoccidiodomicose, contribuirá significativamente para a melhor compreensão e/ou conhecimento da doença no âmbito estadual. O conjunto de informações revela claramente que os pacientes infectados necessitam de suporte laboratorial e acompanhamento sorológico, reforçando ainda, a importância da manutenção constante da vigilância epidemiológica da doença.

### AGRADECIMENTOS

Agradecemos o suporte financeiro do Instituto Adolfo Lutz. Camila Mika Kamikawa e Karolina Rosa Fernandes Beraldo são bolsistas da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

### REFERÊNCIAS

1. Martinez R. New trends in paracoccidiodomycosis epidemiology. *J Fungi*. 2017; 3(1). pii: E1. <https://doi.org/10.3390/jof3010001>
2. Shikanai-Yasuda MA, Mendes RP, Colombo AL, Queiroz-Telles F, Kono ASG, Paniago AMM et al. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidiodomycosis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2017;50(5):744. <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0230-2017>
3. Kamikawa CM, Kohara VS, Passos AN, Vicentini AP. Retrospective seroepidemiologic analysis of patients with suspicion of paracoccidiodomycosis in the São Paulo State. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2012;18(3):254-71. <http://dx.doi.org/10.1590/S1678-91992012000300003>
4. Queiroz-Telles F, Fahal AH, Falci DR, Caceres DH, Chiller T, Pasqualotto AC. Neglected endemic mycosis. *Lancet Infect Dis*. 2017;(11):e367-e377. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30306-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30306-7)
5. Coutinho ZF, Da Silva D, Lazéra M, Petri V, De Oliveira RM, Sabroza PC et al. Paracoccidiodomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad Saúde Pública*. 2002;18(5):1441-54. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2002000500037>
6. Ministério da Saúde (MS). Informações de Saúde - Tabnet. [Internet]. 2017 Ago [acesso em 07 set 2017]. Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=02>
7. Souza W. Doenças Negligenciadas. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências; 2010. Disponível em: <http://www.abc.org.br/IMG/pdf/doc-199.pdf>
8. Da Silva JF, Oliveira HC, Marcos CM, Assato PA, Fusco-Almeida AM, Mendes-Giannini MJS. Advances and challenges in paracoccidiodomycosis serology caused by Paracoccidiodomycosis species complex: an update. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016; 84(1):87-94. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.06.004>
9. Silva-Ferreira C, de Castro Ribeiro EM, Miranda Góes AD, Melo Silva BD. Current strategies for diagnosis of paracoccidiodomycosis and prospects of methods based on gold nanoparticles. *Future Microbiol*. 2016;11:973-85. <https://doi.org/10.2217/fmb-2016-0062>
10. Camargo ZP. Serology of paracoccidiodomycosis. *Mycopathologia*. 2008;165(4-5):289-302. <https://doi.org/10.1007/s11046-007-9060-5>
11. Kamikawa CM. Distribuição da paracoccidiodomicose no estado de São Paulo pela avaliação sorológica das amostras enviadas ao Instituto Adolfo Lutz. [Monografia]. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz – Secretaria de Estado da Saúde; 2011.
12. Pinto VS, Galesi VMN, Fukasava S, Vicentini AP. Vigilância Epidemiológica da Paracoccidiodomicose no Estado de São Paulo. *BEPA, Bol Epidemiol Paul*. 2012;9(103):4-15. Disponível em: <http://periodicos.ses.sp.bvs.br/pdf/bepa/v9n103/v9n103a01.pdf>



13. Millington MA, Nishioka SA, Martins ST, Santos ZMG, Lima Junior FEF, Alves RV. Paracoccidiodomicose: abordagem histórica e perspectivas de implantação da vigilância e controle. *Epidemiol Serv Saude*. 2018; 27(núm esp): e0500002. <http://dx.doi.org/10.5123/s1679-49742018000500002>
14. Ouchterlony O. Antigen-antibody reactions in gels. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1949; 26(4):507-15. <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1949.tb00751.x>
15. Shikanai-Yassuda MA, Telles-Filho FQ, Mendes RP, Colombo AL, Moretti M et al. Consenso em paracoccidiodomicose. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006;39(3):297-310. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822006000300017>
16. Lacaz CS, Passos-Filho MCR, Fava-Netto C, Macarron R. Contribuição para o estudo da Blastomicose-infecção: inquérito com paracoccidiodina. Estudo sorológico e clínico radiológico dos paracoccidiodinos-positivos. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1959; 1:245-259.
17. Londero AT. Epidemiologia. In: Del Negro G, Lacaz CS, Fiorillo A. *Paracoccidiodomicose (Blastomicose sul-americana)*. São Paulo: Sarvier-Edusp; 1982. p.85-90.
18. Marques SA, Franco MF, Mendes RP, Silva NC, Baccili C, Curcelli ED et al. Aspectos epidemiológicos da paracoccidiodomicose na área endêmica de Botucatu (São Paulo – Brasil). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1983; 25:87-92.
19. Wanke B, Londero AT. Epidemiology and paracoccidiodomycoses infection. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo A, Del Negro G. (eds.). *Paracoccidiodomycosis: an update*. Boca Raton: CRC Press; 1994. p.109-17.
20. Mangiaterra B, Alonso J, Galvan M. Histoplasmin and paracoccidiodin skin reactivity infantile population of northern Argentina. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1996;38(5):349-53. <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46651996000500005>
21. Silva-Vergara ML. Contribuição ao estudo epidemiológico da paracoccidiodomicose: estudo em área de cultura de café [tese doutorado]. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 1996. Resumo disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v30n1/0669.pdf>
22. Fava SC, Fava-Netto C. Epidemiologic surveys of histoplasmin and paracoccidiodin sensitivity in Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1998; 40(3):155-64. <http://dx.doi.org/10.1590/s0036-46651998000300005>
23. Blotta MH, Mamoni RL, Oliveira SJ, Nouér SA, Papaiordanou PM, Gouveia A et al. Endemic regions of paracoccidiodomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. *Am J Trop Med Hyg*. 1999; 61(3):390-4. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.1999.61.390>
24. Fornajeiro N, Maluf MLF, Takahachi G, Svidzinski TIE. Inquérito epidemiológico sobre a paracoccidiodomicose utilizando a gp43 em dois municípios do noroeste do Paraná, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005; 38(2):191-3. <http://dx.doi.org/10.1590/s0037-86822005000200014>
25. Bellissimo-Rodrigues F, Machado AA, Martinez R. Paracoccidiodomycosis epidemiological features of a 1,000-cases series from a hyperendemic area on the southeast of Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2011;85(3):546-50. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.11-0084>
26. Moreto TC. Diagnóstico da paracoccidiodomicose em pacientes atendidos em serviços de rotina de hospital universitário [dissertação de mestrado]. Botucatu(SP):Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, 2010. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/89945>
27. Vieira GD, Alves TC, Lima SM, Camargo LM, Sousa CM. Paracoccidiodomycosis in a western Brazilian Amazon State: clinical-epidemiologic profile and spatial distribution of the disease. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2014;47(1):63-8. <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0225-2013>

28. Paniago AM, Aguiar JI, Aguiar ES, Cunha RV, Pereira GR, Londero AT et al. Paracoccidiodomicose: estudo clínico e epidemiológico de 422 casos observados no Estado de Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003;36:455-9. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822003000400004>
29. Telles-Filho FQ, Brandão HE, Boscardin R, Macedo E, Barros JA, Marquetti JL et al. Alguns aspectos clínicos e epidemiológicos da paracoccidiodomicose no Estado do Paraná. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1986; 19(supl I):93.
30. Almeida F, Lacaz CS, Cunha AA. Dados estatísticos sobre a granulomatose paracoccidíóica (Blastomicose sul-americana ou Paracoccidiodomicose). *Rev Bras Med*. 1946;3(2):91-4.
31. Neves AR, Mamoni RL, Rossi CL, Camargo ZP, Blotta MH. Negative immunodiffusion test results obtained with sera of paracoccidiodomycosis patients may be related to low-avidity immunoglobulin G2 antibodies directed against carbohydrate epitopes. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003;10(5):802-7. <http://dx.doi.org/10.1128/CDLI.10.5.802-807.2003>
32. Do Valle AC, Costa RL, Fialho Monteiro PC, Von Helder J, Muniz MM, Zancopé-Oliveira RM. Interpretation and clinical correlation of serological tests in paracoccidiodomycosis. *Med Mycol*. 2001; 39(4):373-7. <http://dx.doi.org/10.1080/mmy.39.4.373.377>
33. Machado GP, Moris DV, Arantes TD, Silva LRF, Theodoro RC, Mendes RP et al. Cryptic species of *Paracoccidioides brasiliensis*: impact on paracoccidiodomycosis immunodiagnosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013;108(5):637-43. <http://dx.doi.org/10.1590/0074-0276108052013016>
34. Martinez R. Epidemiology of paracoccidiodomycosis. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2015;57(Suppl 19):11-20. <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652015000700004>
35. Santo AH. Tendência da mortalidade relacionada à paracoccidiodomicose, Estado de São Paulo, Brasil, 1985 a 2005: estudo usando causas múltiplas de morte. *Rev Panam Salud Publica*. 2008;23(5):313-24. Disponível em: <https://www.scielosp.org/pdf/rpsp/2008.v23n5/313-324/pt>
36. Souza SP, Jorge VM, Xavier MO. Paracoccidiodomycosis in southern Rio Grande do Sul: a retrospective study of histopathologically diagnosed cases. *Braz J Microbiol*. 2014;45(1):243-7. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822014000100035>
37. Coutinho ZF, Wanke B, Travassos C, Oliveira RM, Xavier DR e Coimbra CE Jr. Hospital morbidity due to paracoccidiodomycosis in Brazil (1998-2006). *Trop Med Int Health*. 2015; 20(5):673-680. <https://doi.org/10.1111/tmi.12472>



# Environmental risk factors of leishmaniasis in Bahia State, Brazil using NASA Earth observation satellites

## Fatores de risco ambientais para leishmanioses no estado da Bahia, Brasil, utilizando satélites da NASA de observação da Terra

[RIALA6/1775](#)

Moara de Santana Martins RODGERS<sup>1,2</sup>, Maria Emilia BAVIA<sup>3</sup>, Bernard Eichold II<sup>1</sup>, Claire SHIPMAN<sup>1</sup>, Nathan OWEN<sup>1</sup>, Hunter WINSTANLEY<sup>1</sup>, Margaret GORDON<sup>1</sup>, Marine KARAPETYAN<sup>1</sup>, Marta Mariana Nascimento SILVA<sup>3</sup>, Deborah Daniela Madureira Trabuco CARNEIRO<sup>3</sup>, Luciana Lobato CARDIM<sup>3</sup>, Elivelton da Silva FONSECA<sup>2</sup>, John Brooks MALONE<sup>2\*</sup>

\*Correspondence to: <sup>2</sup>School of Veterinary Medicine, Louisiana State University, Skip Bertman Dr, Baton Rouge, Louisiana, 70803, United States. Tel: +1 225 578 9692, Fax: +1 225 578 9710. Email: [vtmalon@lsu.edu](mailto:vtmalon@lsu.edu)

<sup>1</sup>NASA DEVELOP Program, Mobile County Health Department, 251 North Bayou St., Mobile, AL, 33306 United States, <sup>2</sup>Louisiana State University, School of Veterinary Medicine, Skip Bertman Drive, Baton Rouge, LA, 70803 United States

<sup>3</sup>Universidade Federal da Bahia, Av. Ademar de Barros 500, Ondina, 40170-000, Salvador, BA, Brasil

Recebido: 17.09.2018 - Aceito para publicação: 28.12.2018

### ABSTRACT

NASA's Earth Observing Satellites (EOS) were used to calculate three vegetation indices, extract precipitation and elevation data, and then evaluate their applicability for assessing risk of visceral leishmaniasis (VL) and cutaneous leishmaniasis (CL) in Bahia State, Brazil. Regression models showed that either form of leishmaniasis can be predicted by NDVI, NDMI, NDWI data products and TRMM precipitation data ( $R^2 = 0.370$ ;  $p < 0.001$ ). Elevation was not significantly associated with the distribution of either VL or CL. In areas of high annual precipitation, CL was 3.6 times more likely to occur than VL. For vegetative moisture (NDMI), CL was 2.11 times more likely to occur than VL. Odds of CL occurrence increased to 5.5 times when vegetation (NDVI) and 13.5 times when liquid water content of vegetation canopies (NDWI) was considered. Areas at risk of CL and VL were mapped based on the selected explanatory variables. Accuracy of models were assessed using area under the receiver operating characteristic curve (AUC=0.72). We propose that statewide scale risk models based on use of EOS products will be a useful tool at 1 km<sup>2</sup> spatial resolution to enable health workers to identify and target high risk areas to prevent transmission of leishmaniasis.

**Keywords.** earth observing satellites, leishmaniasis, vegetation index, risk assessment.

### RESUMO

Os satélites de observação da Terra (SOT) da NASA foram usados para calcular três índices de vegetação, extrair dados de precipitação e elevação e avaliar sua aplicabilidade para identificar o risco para leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar (LT) no Estado da Bahia, Brasil. Modelos de regressão mostraram que ambas as formas de leishmaniose podem ser preditas pelos NDVI, NDMI, NDWI e precipitação TRMM ( $R^2 = 0,370$ ;  $p < 0,001$ ). A elevação não foi significativamente associada à distribuição de LV ou LT. Em áreas de alta precipitação anual, a LT foi 3,6 vezes mais provável de ocorrer do que a LV. Para a umidade vegetativa (NDMI), a LT apresentou 2,11 maior probabilidade de ocorrer do que a LV. As chances de ocorrência de LT aumentaram para 5,5 vezes em relação com a vegetação (NDVI) e 13,5 vezes quando o conteúdo de água líquida dos dosséis da vegetação (NDWI) foi considerado. Áreas em risco de LT e LV foram mapeadas com base nas variáveis explicativas selecionadas. A precisão dos modelos foi avaliada usando a área sob curva característica de operação do receptor (Curva COR=0,72). Propusemos que os modelos de risco em escala estadual baseados no uso de produtos SOT são uma ferramenta útil na resolução espacial de 1 km<sup>2</sup> por permitir que profissionais de saúde identifiquem e direcionem áreas de alto risco para evitar a transmissão da leishmaniose.

**Palavras-chave.** Satélites de observação da Terra, leishmanioses, índices de vegetação, avaliação de risco.

## INTRODUCTION

The use of satellite remote sensing technology has shown promise for assessing the risk of vector-borne diseases at multiple spatial scales. Although remote sensing products do not identify the vectors themselves, they can be used to characterize the environment in which the vectors thrive. Earth observing satellite measurements of environmental conditions have distinct advantages over ground measurements because they can be collected repeatedly, automatically, and they are considerably faster to obtain over broad synoptic coverage areas. For the present study, NASA satellite data were used to generate three different vegetation indices and to extract precipitation and elevation information that was then correlated with incidence of leishmaniasis in Bahia State, Brazil.

In Latin America, the risk of cutaneous leishmaniasis (CL) or visceral leishmaniasis (VL) has been associated with proximity to woodlands, elevation, and temperature<sup>1</sup>. Annual rainfall is an important predictive variable for the prevalence and annual incidence of VL<sup>2</sup> the distribution of the vector, and presence of reservoir hosts by affecting the vegetation, the diurnal temperature range, and the relative humidity of a given area.

NASA EOS provides a potentially useful tool to identify favorable environmental conditions for the transmission of leishmaniasis in Bahia, Brazil<sup>3</sup>. The capability of identifying and monitoring risk areas using remote sensing allows for the efficient use of available resources to prevent leishmaniasis transmission by providing fast and affordable identification of areas in need of targeted control practices. The objective of this study was to investigate the usefulness of data products from NASA Earth Observing Systems (EOS) and their applicability in surveillance and response systems for leishmaniasis in Bahia, Brazil.

## MATERIAL AND METHODS

### Study Area

Bahia state occupies an area of 567,295 Km<sup>2</sup> on the northeastern Atlantic coast of Brazil with a tropical, semi-arid climate and average temperatures between 19.2 to 26.6 °C. Bahia is composed of 417

municipalities and has a population of 14.5 million<sup>4</sup>. The study period for this project included data collected at five-year intervals, 2001, 2006, and 2011. All twelve months were included in each study year so that wet and dry season patterns could be analyzed. The five-year intervals within the study period were chosen, rather than each year, so that any climatic/environmental effects could be analyzed over the past decade.

### Data Acquisition

Leishmaniasis data was provided by the Bahia State Secretary of Health and Surveillance (SESAB) (Secretaria de Saúde do Estado de Bahia, 2012). It included VL and CL cases per municipality per month for the study period. Data products from the MODIS sensor were downloaded from the USGS Global Visualization Viewer (Glovis <http://glovis.usgs.gov/>). The temporal resolution of the product was 8-days and the spatial resolution of the imagery was 250 meters<sup>5</sup>. The Tropical Rainfall Measuring Mission (TRMM) product used for this study was obtained through the NASA Goddard Space Flight Center's release Giovanni (TRMM Online Visualization and Analysis System - TOVAS) ([http://disc.sci.gsfc.nasa.gov/gesNews/version\\_7\\_tmpa-rt](http://disc.sci.gsfc.nasa.gov/gesNews/version_7_tmpa-rt)). This product uses a combination of the monthly multi-satellite product and rain gauge data to estimate monthly rainfall (Huffman, 2007; Liu et al., 2012). Shuttle Radar Topography Mission (SRTM) data were downloaded from the DIVA-GIS web site as a digital elevation model product for Brazil (<http://www.diva-gis.org>).

### Data Processing

After imagery processing, three environmental vegetation indices were calculated as follows (Figure 1):

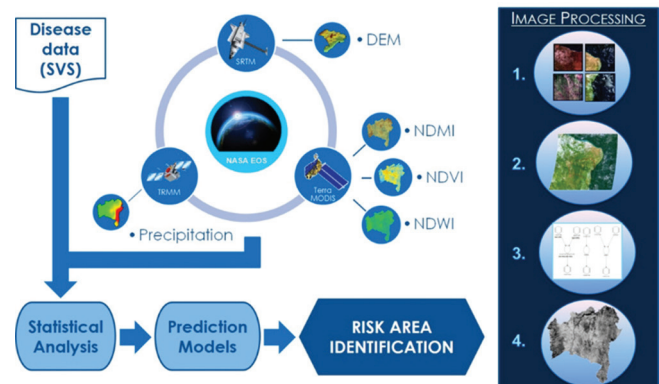


Figure 1. Schematic of Data Processing and Analysis. Areas at risk of CL and VL were mapped using the probability of having either CL or



VL, considering elevation (SRTM), precipitation (TRMM), moisture (NDMI), vegetation (NDVI) and water content of vegetation (NDWI). The multiple stepwise regression model developed showed that the occurrence of both VL and CL was influenced by NDMI, NDVI, NDWI and precipitation ( $R^2= 0.370$ ;  $p<0.001$ ). The accuracy of VL and CL prediction models were assessed using the area under the receiver operating characteristic curve (AUC=0.72)

1) *Normalized Difference Vegetation Index (NDVI)*: using the near infrared band ( $0.86\mu\text{m}$ ) and the visible red band ( $0.66\mu\text{m}$ ) to determine changes in greenness on the earth's surface based on the density of green chlorophyll in vegetation<sup>6</sup>.

2) *Normalized Difference Moisture Index (NDMI)*: a moisture index that measures the amount of moisture by sensing characteristic differences between the very reflective near infrared band ( $0.86\mu\text{m}$ ) and the water absorbed short-wavelength infrared band ( $1.64\mu\text{m}$ ). This index highlights areas of healthy green vegetation with high moisture content and disturbed areas of vegetation with low moisture content using values also ranging from +1 and -1<sup>7,8</sup>.

3) *The Normalized Difference Water Index (NDWI)* detects liquid water content in vegetation. Using the near-infrared band ( $0.86\mu\text{m}$ ) and a particular short-wave infrared band ( $1.24\mu\text{m}$ ), NDWI measures vegetative liquid water in the canopy<sup>9</sup>.

TRMM accumulated rainfall totals were derived for each month during the years 2001, 2006, and 2011, for the area encompassing the state of Bahia. The data were interpolated using an ordinary exponential kriging technique in ArcGIS 10.1 to create a raster file displaying the rainfall distribution across the study area.

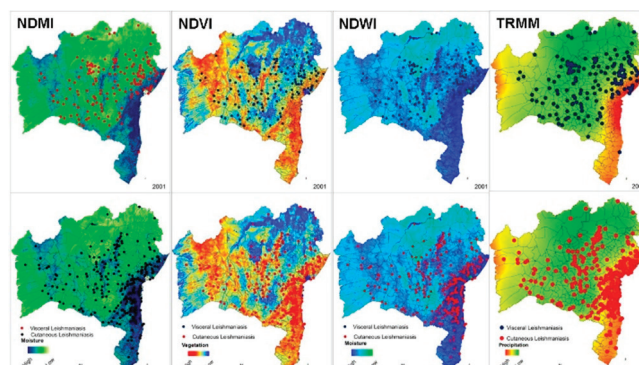
## Data Analysis

Pearson's correlation and logistic regression were used to analyze the variables that most influenced the occurrence of VL and CL in the state. Analysis of variance (ANOVA) was used to identify significant differences over time. The probability of occurrence of VL and CL was calculated, and the accuracy of the prediction model was assessed using the area under the receiver operating characteristic curve (ROC). Statistical analyses were performed

using SPSS<sup>®</sup> version 18.0 (SPSS Inc., Chicago, 2009) and SAS<sup>®</sup> version 9.1.3 (SAS Institute Inc., Cary, 2004).

## RESULTS

In the years 2001, 2006 and 2011, SESAB recorded a total of 12,456 cases of leishmaniasis of which 10,782 were for CL of this disease and 1,674 were for VL. VL was reported in approximately 59% of the municipalities in Bahia State, while CL was present in approximately 70% of the municipalities. VL was concentrated in the north and central region of the state while CL was mainly concentrated along the coast and only sparsely occurred in the southern part of the state (Figure 2).



**Figure 2.** Maps represent annual averages for vegetation indices (NDMI, NDVI and NDWI), annual precipitation derived from TRMM, and cutaneous and visceral leishmaniasis case incidence from 417 municipalities in Bahia state. The maps show areas ranging from highest to lowest values of vegetation indices derived from MODIS imagery. Each map represents an annual composite for moisture content, vegetation abundance and water content of vegetation in Bahia State and disease incidence data for visceral leishmaniasis (VL) (black circles) or cutaneous leishmaniasis (CL) (red circles). The annual precipitation map was derived from TRMM. A risk map of CL and VL in Bahia state was later calculated by the probability of incidence of CL or VL based on significantly associated environmental features using Maxent software

A significant difference between the number of cases reported each year was observed ( $p= 0.0201$ ). It was also observed a peak in the number of cases of both CL and VL in January, February and March in all three years studied ( $p=0. 0158$ ).



The mean NDMI was 0.084 (SEM±0.004). The mean NDVI was 0.561 (SEM±0.004) and the NDWI mean of -0.064 (SEM±0.001). No significant oscillation between months, years and mean values of the three indices was observed, which suggests the potential of some transmission throughout the year.

Pearson's correlation indicated that both forms of disease increased when NDMI ( $r=0.23$ ;  $p<0.001$ ), NDVI ( $r=0.17$ ;  $p<0.001$ ), NDWI ( $r=0.25$ ;  $p<0.001$ ), and precipitation ( $r=0.21$ ;  $p<0.001$ ) were greatest. June and December were the wettest months in all three years studied, with the highest precipitation observed between 200 and 276 mm/month ( $p<0.05$ ). An inverse relationship of elevation and VL and CL cases was observed, with leishmaniasis decreasing as elevation increased.

The multiple stepwise regression model developed showed that the occurrence of both VL and CL was influenced by NDMI, NDVI, NDWI and precipitation ( $R^2=0.370$ ;  $p<0.001$ ). In areas with high precipitation, CL was 3.6 times more likely to occur than VL. When considering vegetative moisture (NDMI), CL was 2.11 times more likely to occur than VL. The odds of CL occurrence increased 5.5 times when vegetation (NDVI) and increased 13.5 times as compared to VL when liquid water content of vegetation canopies (NDWI) was considered.

Areas at risk of CL and VL were mapped using the probability of having either CL or VL, considering elevation, precipitation, moisture (NDMI), vegetation (NDVI) and water content of vegetation (NDWI) (**Figure 2**). It was observed that for CL, coastal areas are at higher risk, but there was also high risk at a specific area on the northwest region of the state. For VL, areas at higher risk included the north and southwest regions of the state. Although specific areas for occurrence of one or the other form of the disease were identified, both forms of leishmaniasis can overlap, and, even within a municipality, the risk levels may differ. The accuracy of VL and CL prediction models were assessed using the area under the receiver operating characteristic curve (AUC=0.72).

## DISCUSSION

Bahia State is affected by both the cutaneous and visceral forms of leishmaniasis (**Figure 2**). Cutaneous leishmaniasis is widespread in Bahia with existence of foci of infection in all geographic regions (SUVISA, 2013). For VL, areas of occurrence in Bahia are expanding, especially in the semi-arid areas of the north and west regions of the state. Occurrence of VL in these areas has been associated with the implementation of agricultural projects<sup>10</sup>. Increasing incidence in municipalities in the east region of the state, especially north of the state capital Salvador, has been attributed to a progressive increase in human population density. Bahia State had more municipalities with reported cases of CL than VL and an increase of both forms of the disease in the state has been observed, especially towards the west region; this has been proposed to be a consequence of environmental changes associated with the development of soybean and rice production<sup>10</sup>.

The climate in Bahia state is tropical with stable and elevated temperatures throughout the year and two distinct wet seasons. A tropical climate is predominant in the coastal areas, while in the interior areas, which occupy most of the land area, the climate is predominantly semi-arid. The wet season for the coastal area is from April to July, but rainfall is observed throughout the year. In the semi-arid region, the annual rainfall never exceeds 24 mm and the dry season is from April to October. In the semi-arid northeast region, where most records of both CL and VL are reported, dry and rainy seasons are clearly defined and there is evidence that vector density is low during the dry season and increases after the end of the rainy season (December–April), reaching its highest density level around May. These observations support reports of peak numbers of Leishmaniasis cases in the months of January, February and March when an increase in vector density favors transmission<sup>11</sup>.

**NDMI** - The NDMI gives an indication of the wetness of the land surface. It detects the different content of humidity from the landscape elements, especially soil, rocks and vegetation. This index is also a good indicator of dryness<sup>5</sup>. High NDMI values indicate the existence of greater soil surface moisture and low values indicate low soil surface moisture

content. The mean NDMI observed in the present study indicates dry soils are prevalent in areas in the interior classified as a semi-arid environment. By contrast, high moisture is observed throughout the coast where a tropical climate predominates. NDMI has been proven reliable in measuring moisture from soil, vegetation and even predicting surface temperatures<sup>5</sup>. Soil moisture plays a significant role in leishmaniasis incidence<sup>12</sup>. Vegetated areas have a greater abundance of sand flies than exclusively urban environments<sup>13</sup>. The impact of moisture and small water bodies as a source of moisture in the environment on the occurrence of VL indicates that NDMI is useful for identifying areas that provide suitable conditions for vector development<sup>12</sup>.

**NDVI** – NDVI has been widely used for environmental studies on parasites as a remote sensing surrogate of precipitation and surface hydrologic regime. Areas of recent interaction between population growth and NDVI in urban areas have been shown to be risk factors for VL in Piauí State, Brazil, and demonstrated the impact of recent, rapid occupation of periurban areas on risk of VL<sup>14</sup>. Population growth in an area that is already urbanized has a much smaller impact on VL incidence than the same level of growth in an area with heavy vegetation cover; NDVI can thus be a useful tool in identifying pockets of dense or scarce vegetation coverage. Vegetation in endemic areas provide shelter sites for sand flies as well carbohydrates, which is the main energy source for sand flies.

**NDWI** - NDWI values exhibit a quicker response to drought conditions than NDVI<sup>5</sup>. This index was associated with increased probability of having VL or CL in the state. Although little utilized thus far in studying diseases, NDWI can be a useful tool in the public health sphere by either identifying water bodies or a considerable quantity of water in vegetation and isolated water bodies<sup>15</sup>. Since NDWI is also a good indicator for drought, it is important to note that droughts have been shown to favor the development of epidemics in Latin American countries. Prolonged droughts in semi-arid north-eastern Brazil have provoked rural-urban migration of subsistence farmers, and a re-emergence of VL. Such outbreaks could be the result of human migration due to drought, environmental degradation or economic reasons and may lead to

the spread of diseases in unexpected ways, and new breeding sites for vectors. The vector of VL in Bahia, *Lu. longipalpis*, has been often found inside residences during drought periods<sup>3</sup>. Prolonged drought periods can impact vector density and contribute to a gradual increase in the potential risk of some related epidemiologic factors, such as waning population immunity and increase in the susceptible population in the endemic areas<sup>10</sup>. According to Wilson and Sader<sup>16</sup>, NDWI and NDMI are theoretically similar to each other for detection of spatial variation of surface wetness. However, NDWI performed better than other indices in identifying wetland surface water in Bihar, India and detected more pixels with water and water features in the Sahara-Sahel transition zone<sup>2</sup>.

**TRMM Precipitation** - Precipitation is an important risk factor for CL and VL, and each form of disease, and their respective vectors, have unique environmental suitability requirements related to moisture. Precipitation plays an indirect role in the incidence of leishmaniasis by providing a suitable habitat for vector development in terms of humidity.

**SRTM** - Topographic influences, especially in landscapes where major altitude relief occurs, is of particular importance in predicting disease risk. Elevation by itself may not represent a crucial factor in the incidence of leishmaniasis but may influence other factors such as distance to water bodies, low vegetation, soil rich in organic matter, which are basic requirements for development and maintenance of the sand fly vectors. Bhunia et al<sup>2</sup> observed that altitude had a relatively strong influence on the distribution of Phlebotomus vectors in India where Kala-azar incidence is concentrated at low altitudes with fewer cases in the highlands. These results indicate that a higher incidence should be expected at low elevation as was found to be the case in Bahia State. The results of the current study in Bahia State agreed with studies by Bavia<sup>3</sup> in which an inverse relationship between leishmaniasis and altitude was observed. Elnaïem et al<sup>17</sup>, observed that although the elevation did not correlate with VL incidence in Sudan in their preliminary analysis, it appeared as an important variable when used in multivariate analysis indicating that in the final analysis, elevation integrates the effects of many other factors, including distance from rivers. Such results are in agreement with other authors regarding the requirements and

environmental preferences of vectors of *Leishmania* parasites. However, it is necessary to take into consideration the differences between different geographic areas as well as sand fly species.

## CONCLUSION

The present study indicated that risk models based on use of environmental data generated from NASA EOS can be used to identify and specifically target interventions in areas for control of transmission of leishmaniasis. Knowledge of the timing of the transmission cycle and associated environmental features is important so that intervention measures, such as insecticide spraying, can be directed to areas at risk. The cutaneous form of leishmaniasis was more sensitive to environmental factors and NDWI was the index that best depicted occurrence of both forms of leishmaniasis in Bahia. NASA EOS data products can be an effective tool in identifying the environmental features that influence CL and VL distribution and abundance in Bahia State, Brazil as part of operational surveillance and response systems for control and elimination of neglected tropical diseases. Results of comparisons of classical NDVI measurements calculated by NIR and red wavelengths of the electromagnetic spectrum with more recent NDMI and NDWI indices calculated from the NIR and SWIR wavelengths, suggest further studies are needed to better define the usefulness of NDMI and NDWI as compared to NDVI on suitability of the environment for leishmania and other vector-borne diseases.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the NASA DEVELOP Program for supporting this project and providing scientific consultancy under contract NNL11AA00B.

## REFERÊNCIAS

1. Valderrama-Ardila C, Alexander N, Ferro C, Cadena H, Marín D, Holford TR et al. Environmental risk factors for the incidence of American cutaneous leishmaniasis in a sub-andean zone of Colombia (Chaparral, Tolima). *Am J Trop Med Hyg*. 2010;82(2):243–50. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0218>
2. Bhunia GS, Kesari S, Jeyaram A, Kumar V, Das P. Influence of topography on the endemicity of Kala-azar: a study based on remote sensing and geographical information system. *Geospat Health*. 2010;4(2):155–65. <http://dx.doi.org/10.4081/gh.2010.197>
3. Bavia ME, Carneiro DDMT, Gurgel HC, Madureira Filho C, Barbosa MGR. Remote sensing and geographic information systems and risk of American Visceral Leishmaniasis in Bahia, Brazil. *Parasitologia*. 2005;47(1):165–9.
4. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Estudos e pesquisas: informação demográfica e socioeconômica, 28. Indicadores sociais municipais: uma análise dos resultados do universo do censo demográfico 2010. Rio de Janeiro(RJ): IBGE; 2011. Available in: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv54598.pdf>
5. Gu Y, Hunt E, Wardlow B, Basara JB, Brown JF, Verdin JP. Evaluation of MODIS NDVI and NDWI for vegetation drought monitoring using Oklahoma Mesonet soil moisture data. *Geophys Res Lett*. 2008;35(22). <http://dx.doi.org/10.1029/2008GL035772>
6. Hayes D, Cohen W, Sader S, Irwin D. Estimating proportional change in forest cover as a continuous variable from multi-layer MODIS data. *Remote Sens Environ*. 2008;112:735–49. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rse.2007.06.003>
7. Elith JH, Graham CP, Anderson R, Dudík M, Ferrier S, Guisan A et al. Novel methods improve prediction of species' distributions from occurrence data. *Ecography*. 2006;29(2):129–51. <http://doi.wiley.com/10.1111/j.2006.0906-7590.04596.x>
8. Jin S, Sader SA. Comparison of time series tasseled cap wetness and the normalized difference moisture index in detecting forest disturbances. *Remote Sens Environ*.

- 2005;94(3):364–72. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2004.10.012>
9. Gao BC. NDWI - A normalized difference water index for remote sensing of vegetation liquid water from space. *Remote Sens Environ*. 1996;58(3):257–66. Available in: [http://ceeserver.cce.cornell.edu/wdp2/cee6150/Readings/Gao\\_1996\\_RSE\\_58\\_257-266\\_NDWI.pdf](http://ceeserver.cce.cornell.edu/wdp2/cee6150/Readings/Gao_1996_RSE_58_257-266_NDWI.pdf)
  10. Franke CR, Staubach C, Ziller M, Schlüter H. Trends in the temporal and spatial distribution of visceral and cutaneous leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil, from 1985 to 1999. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2002;96(3):236–41. [http:// dx.doi.org/10.1016/s0035-9203\(02\)90087-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0035-9203(02)90087-8)
  11. Bavia ME, Hale LF, Malone JB, Braud DH, Shane SM. Geographic information systems and the environmental risk of schistosomiasis in Bahia, Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 1999;60(4):566–72. [http:// dx.doi.org/10.4269/ajtmh.1999.60.566](http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.1999.60.566)
  12. Bhunia GS, Kesari S, Chatterjee N, Pal DK, Kumar V, Ranjan A et al. Incidence of visceral leishmaniasis in the Vaishali district of Bihar, India: spatial patterns and role of inland water bodies. *Geospat Health*. 2011;5(2):205–15. <http://dx.doi.org/10.4081/gh.2011.173>
  13. Saraiva L, Andrade Filho JD, Falcão AL, de Carvalho DA, de Souza CM, Freitas CR et al. Phlebotominae fauna (Diptera: Psychodidae) in an urban district of Belo Horizonte, Brazil, endemic for visceral leishmaniasis: characterization of favored locations as determined by spatial analysis. *Acta Trop*. 2011;117(2):137–45. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.11.007>
  14. Cerbino Neto J, Werneck GL, Costa CH. Factors associated with the incidence of urban visceral leishmaniasis: an ecological study in Teresina, Piauí State, Brazil. *Cad Saude Publica* . 2009;25(7):1543–51. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2009000700012>
  15. McFeeters SK. Using the normalized difference water index (NDWI) within a geographic information system to detect swimming pools for mosquito abatement: a practical approach. *Remote Sens*. 2013;5(7):3544–61. <https://doi.org/10.3390/rs5073544>
  16. Wilson EH, Sader SA. Detection of forest harvest type using multiple dates of Landsat TM imagery. *Remote Sens Environ*. 2002;80:385–96. [https://doi.org/10.1016/S0034-4257\(01\)00318-2](https://doi.org/10.1016/S0034-4257(01)00318-2)
  17. Elnaiem DEA, Schorscher J, Bendall A, Obsomer V, Osman ME, Mekkawi AM et al. Risk mapping of visceral leishmaniasis: the role of local variation in rainfall and altitude on the presence and incidence of kala-azar in eastern Sudan. *Am J Trop Med Hyg*. 2003;68(1):10–7. [http:// dx.doi.org/10.4269/ajtmh.1999.60.566](http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.1999.60.566)



# Sobrevivência e desenvolvimento de *Pseudomonas aeruginosa* em água mineral experimentalmente contaminada

## Survival and growth of *Pseudomonas aeruginosa* in experimentally contaminated mineral water

RIALA6/1777

Ana Paula de SOUZA, Ruth Estela Gravato ROWLANDS, Cecília Geraldine MARTINS, Ana Paula Ramalho de PAULA, Christiane Asturiano RISTORI\*

\*Endereço de correspondência: Núcleo de Microbiologia, Centro de Alimentos, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, Cerqueira César, São Paulo, SP, CEP: 01246-902. E-mail: [car@alumni.usp.br](mailto:car@alumni.usp.br)

Recebido: 03.10.2018 - Aceito para publicação: 02.07.2019

### RESUMO

*Pseudomonas aeruginosa*, agente patogênico oportunista, é frequentemente encontrado em águas minerais e pode causar infecções em indivíduos imunocomprometidos. Neste estudo foi avaliada a sobrevivência e/ou a multiplicação de *P. aeruginosa* em amostras de água mineral em embalagens plásticas de 1,5 L e 20 L, experimentalmente contaminadas, armazenadas a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $4 \pm 2^\circ\text{C}$  e em temperatura ambiente ( $20\text{-}25^\circ\text{C}$ ), durante o período de validade do produto. Nas amostras de água mineral em garrafa plástica de 1,5 L, armazenadas a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  e  $4 \pm 2^\circ\text{C}$ , a população de *P. aeruginosa* manteve-se viável durante 370 e 100 dias, respectivamente. O maior aumento da população bacteriana ocorreu nas amostras de água mineral em galão de 20 L, armazenadas entre 20 a  $25^\circ\text{C}$ , que passou de 3,8 para 6,6  $\log_{10}$  UFC/mL em um período de sete dias. Portanto, os galões de 20 L merecem atenção especial, pois além de serem retornáveis, normalmente são armazenados à temperatura ambiente. Os resultados reforçam a necessidade das empresas de águas minerais implantarem e implementarem as Boas Práticas de Fabricação (BPF) e o sistema Análise de Perigo e Pontos Críticos de Controle (APPCC) para eliminar ou minimizar os riscos do consumo deste produto.

**Palavras-chave.** *Pseudomonas aeruginosa*, água mineral, sobrevivência, qualidade da água.

### ABSTRACT

*Pseudomonas aeruginosa*, an opportunistic pathogen, is often found in bottled waters and capable of infecting the immunocompromised patients. The present study aimed at evaluating the survival and/or the growth of *P. aeruginosa* strain in 1,5 L and 20 L bottled mineral water samples experimentally contaminated, stored at  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $4 \pm 2^\circ\text{C}$ , and at room temperature (from 20 to  $25^\circ\text{C}$ ) during the product shelf-life period. In the mineral water samples contained in 1.5 L bottles, stored at  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  and  $4 \pm 2^\circ\text{C}$ , *P. aeruginosa* remained viable for 370 and 100 days, respectively. The major increase in the bacterial population occurred in mineral water samples in 20 L bottles stored at 20 to  $25^\circ\text{C}$ , being from 3.8 to 6.6  $\log_{10}$  CFU/mL, in a period of seven days. Therefore, the 20 L bottles deserve a special attention because, in addition of being returnable, they are usually stored at room temperature. The results reinforce the need of the mineral water companies in implementing the Good Manufacturing Practice (GMP) and the HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) to eliminate and to minimize the risks of consuming the contaminated product.

**Keywords.** *Pseudomonas aeruginosa*, mineral water, survival, water quality.



## INTRODUÇÃO

O aumento considerável no consumo de água engarrafada tem sido observado mundialmente, devido à percepção do consumidor em relação ao produto como uma alternativa saudável à água de abastecimento público<sup>1</sup>. Neste cenário, o Brasil destaca-se como o quarto maior produtor de água engarrafada, segundo a Associação Brasileira da Indústria de Água Mineral (ABINAM)<sup>2</sup>.

Entretanto, a água mineral não é um produto estéril e pode apresentar micro-organismos autóctones como *Pseudomonas aeruginosa* e os organismos alóctones, não provenientes da fonte que podem aparecer nas etapas de pré-engarrafamento e processamento<sup>3</sup>. Durante as etapas de processamento, o número de bactérias pode aumentar de  $10^3$  para  $10^6$  UFC/mL<sup>4,5</sup>, provavelmente devido ao aumento do nível de oxigênio<sup>5</sup> ou pelo contato com compostos orgânicos que podem estar presentes em tubulações, reservatórios ou nas embalagens e tampas<sup>6</sup>.

A presença de *P. aeruginosa* em águas minerais já foi relatada em vários países, incluindo o Brasil<sup>7-14</sup>, indicando que a fonte está poluída por material orgânico ou que o produto foi contaminado durante o processo de engarrafamento<sup>15</sup>.

O consumo de águas minerais contaminadas com *P. aeruginosa* pode representar um risco potencial para indivíduos imunocomprometidos<sup>16</sup> devido à característica oportunista deste micro-organismo e sua capacidade em desenvolver multirresistência a agentes antimicrobianos<sup>17</sup>. Este micro-organismo é uma das principais causas de infecções hospitalares com alta taxa de mortalidade<sup>18</sup>, podendo causar infecção do trato urinário, infecção do sistema respiratório, dermatites, infecção de tecidos moles, bacteremia e uma variedade de infecções sistêmicas, particularmente em pacientes queimados e imunocomprometidos<sup>19</sup>. *P. aeruginosa* possui a capacidade de formar biofilmes que representam sérios problemas para as empresas de água mineral e, principalmente, em ambientes hospitalares<sup>20</sup>. Além disso, podem sobreviver e se multiplicar em condições adversas como ambientes com poucos nutrientes<sup>15, 20, 21</sup>.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a sobrevivência e/ou multiplicação de *P. aeruginosa*

em amostras de água mineral em embalagens de 1,5 L e 20 L, experimentalmente contaminadas e armazenadas a  $4 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  e em temperatura ambiente ( $20$  a  $25^\circ\text{C}$ ), durante o período de validade do produto.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Cepa

A cepa de *P. aeruginosa* utilizada no experimento foi isolada de uma amostra de água mineral analisada pelo Núcleo de Microbiologia, do Instituto Adolfo Lutz Central e mantida em ágar gelose conservação à temperatura ambiente até o momento da realização dos experimentos.

### Amostras

Os experimentos foram realizados em nove amostras de água mineral acondicionadas em embalagem original, sendo seis amostras em embalagem de 1,5 L em garrafas de polietileno tereftalato (PET), com prazo de validade de 12 meses, e três em galões de 20 L de cloreto de polivinila (PVC), com validade de três meses. As amostras foram adquiridas no comércio da cidade de São Paulo e eram todas do mesmo lote de acordo com a embalagem.

### Metodologia

#### Preparação do inóculo

O inóculo foi preparado de acordo com Legnani et al<sup>15</sup>, com modificações. A cepa de *P. aeruginosa* foi reativada em caldo BHI (Brain Heart Infusion Broth) e incubada a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24 h. Em seguida uma alíquota de 0,1 mL desta cultura foi transferida para 3 mL de solução tampão fosfato estéril (pH 7,2), homogeneizada e centrifugada à 1166 g (5000 rpm) por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram adicionados 3 mL de solução tampão fosfato, sendo este o inóculo inicial ( $10^0$ ) utilizado para contaminação das amostras de água mineral de 1,5 L.

Para as amostras de água mineral em galões de 20 L, realizou-se o mesmo procedimento descrito acima, utilizando-se uma alíquota de 0,4 mL da cultura em 12 mL de solução tampão fosfato e após centrifugação e descarte do sobrenadante,

adicionou-se 12 mL de solução tampão fosfato, sendo este o inoculo inicial ( $10^0$ ).

A concentração final de micro-organismo em cada amostra, após a inoculação, foi de aproximadamente  $10^3$  UFC/mL.

### Contaminação Experimental

Antes das análises microbiológicas e contaminação experimental, as embalagens foram lavadas, externamente, com água e sabão e desinfetadas com solução de álcool 70%.

Em seis amostras de água mineral de 1,5 L, inoculou-se uma alíquota de 1 mL do inoculo inicial, com auxílio de uma seringa estéril. O mesmo procedimento foi realizado para as três amostras de água mineral em galões de 20 L, sendo que o volume utilizado para contaminação foi de 10 mL.

Após contaminação experimental de cada amostra, procedia-se a homogeneização, no mínimo 25 vezes, por inversão. Três amostras de água mineral de 1,5 L foram mantidas em estufa bacteriológica a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ , as outras três amostras em refrigerador a  $4 \pm 2^\circ\text{C}$  e as três amostras de água mineral em galões de 20 L foram mantidas à temperatura ambiente ( $20$  a  $25^\circ\text{C}$ ).

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os dados foram expressos com a média da contagem microbiana dos mesmos.

### Análises microbiológicas

Aleatoriamente escolheu-se uma amostra controle (não contaminada experimentalmente), do mesmo lote de cada embalagem, de 1,5 L e 20 L, para realização das análises microbiológicas, de acordo com os parâmetros estabelecidos pela Resolução RDC nº 275, de 22 de setembro de 2005, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)<sup>22</sup>: coliformes totais, coliformes termotolerantes<sup>23</sup>, enterococos<sup>24</sup>, clostridio sulfito redutor<sup>25</sup> e *P. aeruginosa*<sup>26</sup>, além da contagem de bactérias heterotróficas<sup>27</sup>.

Após a contaminação experimental, as amostras de água mineral de 1,5 L eram analisadas em intervalos de tempo pré-estabelecidos: 0 h, 3 h, 6 h, 24 h, 48 h, 3 dias, 5 dias, 7 dias, 9 dias, 11 dias, 22 dias, 70 dias, 100 dias, 130 dias, 160 dias, 190 dias, 220 dias, 250 dias, 280 dias, 310 dias, 340 dias e 370 dias. As amostras em galões de 20 L

eram analisadas nos seguintes intervalos de tempo: 0 h, 7 dias, 15 dias, 25 dias, 40 dias e 60 dias.

Alíquotas retiradas de cada amostra eram submetidas à contagem de bactérias heterotróficas. Após a contagem das placas, cinco colônias eram isoladas em ágar IAL (Instituto Adolfo Lutz)<sup>28</sup> e incubadas a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24 h. As colônias características de *P. aeruginosa* eram isoladas em tubos contendo ágar nutriente e incubadas a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24 h para serem submetidas às seguintes provas bioquímicas confirmatórias: citrato de Simmons, produção do pigmento pocianina e oxidase.

### Microscopia Eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada no Laboratório de Filmes Finos do Instituto de Física da Universidade de São Paulo. Após o período de experimentação foram realizados recortes, de aproximadamente 3 x 4 mm, das garrafas de 1,5 L e dos galões de 20 L e esses fixados em suportes metálicos (*stubs*) e posteriormente secos em ambiente com sílica-gel. Com o equipamento de *Sputtering*, *Sputter SCD 004*, foi realizado um revestimento com carbono e posteriormente com ouro. As amostras foram analisadas e fotografadas em Microscópio Eletrônico de Varredura SEM JEOL JSM - 6460LV.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

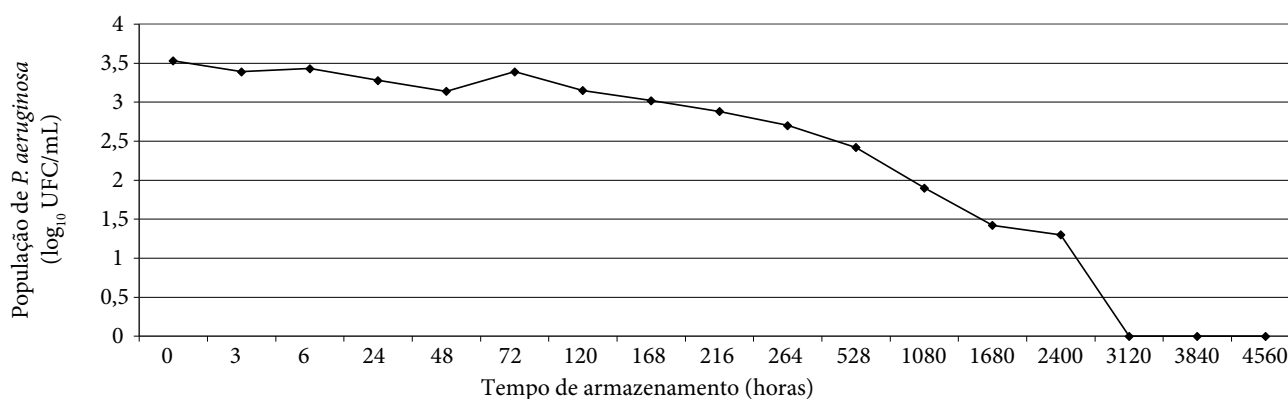
As amostras de água mineral não contaminadas experimentalmente (controle) estavam em conformidade com a Resolução RDC nº 275/2005<sup>22</sup> (coliformes totais  $<1$  UFC/mL, coliformes termotolerantes  $<1$  UFC/mL, enterococos  $<1$  UFC/mL, clostridio sulfito redutor  $<1$  UFC/mL e *P. aeruginosa*  $<1$  UFC/mL) e não apresentavam bactérias heterotróficas ( $<1$  UFC/mL).

O armazenamento da água mineral no comércio e nos pontos de consumo é realizado, geralmente, em temperatura ambiente. No Brasil, como o clima é tropical e variável nas diferentes regiões, podendo apresentar temperaturas acima de  $30^\circ\text{C}$ , optou-se por submeter às amostras a incubação nas temperaturas de  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  e de  $20$  a  $25^\circ\text{C}$ . Além disso, pela possibilidade da água mineral de 1,5 L ser armazenada e comercializada sob refrigeração, realizou-se o experimento a  $4 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Os resultados do presente estudo mostram que a temperatura de armazenamento do produto é um fator relevante para a sobrevivência e multiplicação de *P. aeruginosa*.

A população inicial de *P. aeruginosa* foi de  $3,5 \log_{10}$  UFC/mL, no tempo 0 h após contaminação experimental, nas amostras de água mineral em garrafas de 1,5 L armazenadas a  $4 \pm 2^\circ\text{C}$ . Nestas amostras, até o 3º dia (72 horas) de armazenamento, não houve alteração significativa da população que

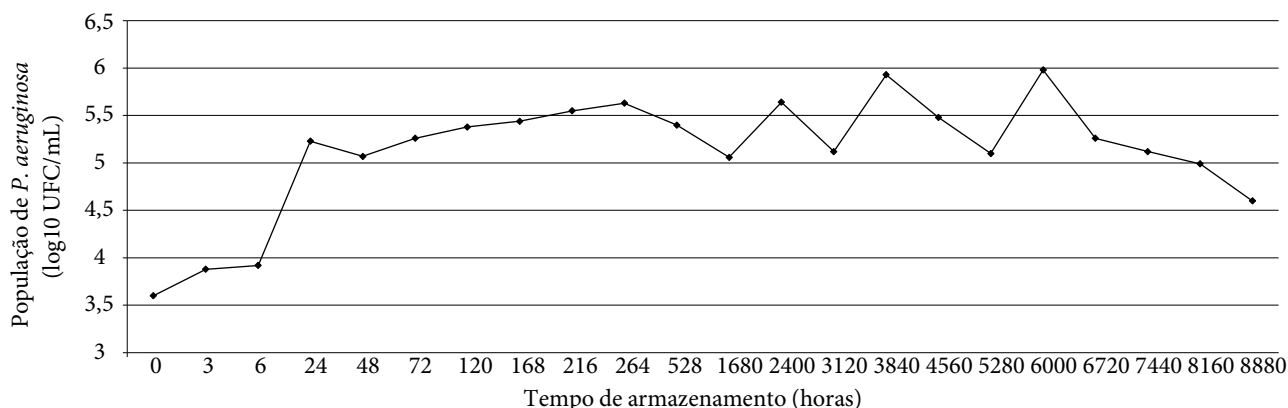
variou de 3,4 a  $3,6 \log_{10}$  UFC/mL. A partir do 3º dia de incubação houve o declínio da população de *P. aeruginosa*, com redução acentuada entre o 3º e 22º dia (528 horas) de armazenamento. Entretanto, observou-se que o micro-organismo, mesmo estando sob condições desfavoráveis para o seu desenvolvimento, se manteve viável pelo período de 100 dias (2400 horas) (Figura 1). Khan et al<sup>29</sup> demonstraram que *P. aeruginosa* pode sobreviver em água destilada por até seis meses a  $4^\circ\text{C}$ .



**Figura 1.** Perfil de desenvolvimento de *P. aeruginosa* em amostras de água mineral de 1,5 L armazenadas em temperatura de  $4 \pm 2^\circ\text{C}$  por 190 dias (4560 h)

Em relação às amostras de água mineral em garrafas de 1,5 L, armazenadas a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ , a população inicial de *P. aeruginosa* foi de  $3,6 \log_{10}$  UFC/mL. Nas primeiras 24 h de armazenamento houve um aumento da população ( $5,2 \log_{10}$  UFC/mL) que atingiu a concentração microbiana máxima em 160 dias (3840 h)

( $5,9 \log_{10}$  UFC/mL). Após este período, iniciou-se a redução da população bacteriana que atingiu  $4,6 \log_{10}$  UFC/mL em um ano de armazenamento (Figura 2). Resultados similares foram observados por Legnani et al<sup>15</sup> que detectaram população de *P. aeruginosa* de  $4,46 \log_{10}$  UFC/mL pelo mesmo período de tempo.



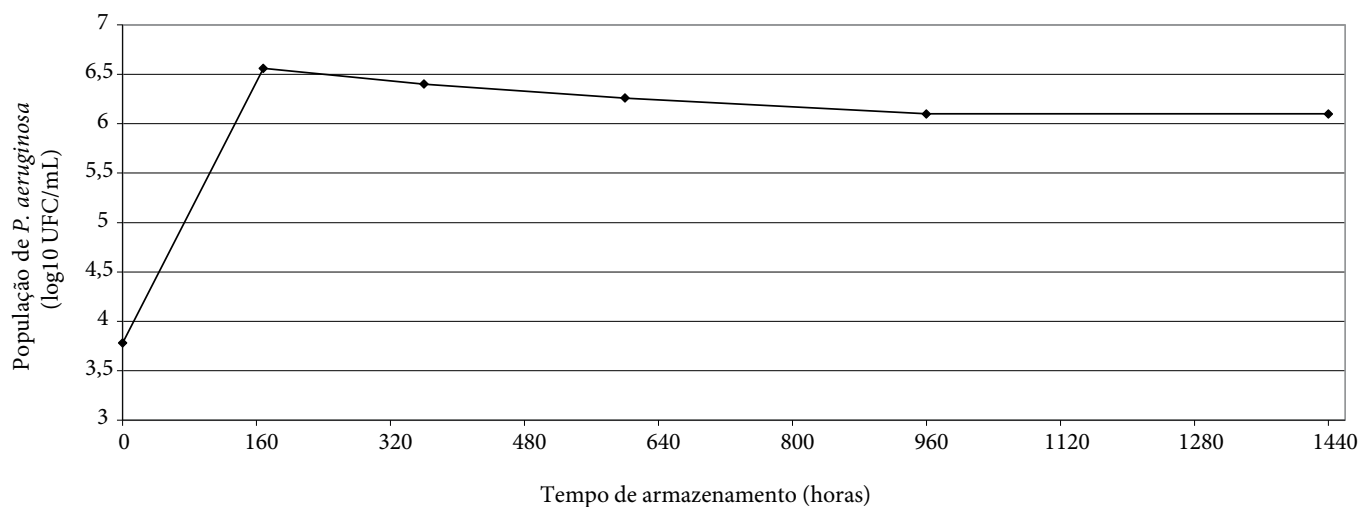
**Figura 2.** Perfil de desenvolvimento de *P. aeruginosa* em amostras de água mineral de 1,5 L armazenadas em temperatura de  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  por 370 dias (8880 h)

Nas amostras de água mineral de 20 L, mantidas a 20-25°C por 60 dias (1440 horas), verificou-se a multiplicação do micro-organismo nos primeiros dias de armazenamento. A população inicial de *P. aeruginosa* era de 3,8 log<sub>10</sub> UFC/mL e, nos sete primeiros dias de incubação, aumentou para 6,6 log<sub>10</sub> UFC/mL. A partir do 40° dia (960 horas), a população se manteve estável (6,1 log<sub>10</sub> UFC/mL) até o término do ensaio no 60° dia (Figura 3). Resultado similar foi relatado por Leclerc e Moreau<sup>30</sup> em que a população bacteriana máxima em amostras de água mineral foi observada, geralmente, quando estocadas à temperatura ambiente (aproximadamente 20°C). Por outro lado, em estudo realizado por Khaniki et al<sup>21</sup>, o maior aumento da população de *P. aeruginosa* foi verificado em amostras incubadas a 37°C.

Lewenza et al<sup>31</sup> demonstraram que *P. aeruginosa* pode sobreviver por longos períodos

na água sem nutrientes por se adaptar a este ambiente, reduzindo seu metabolismo, alterando a permeabilidade e composição da membrana, diminuindo tamanho da célula e condensando seu DNA.

Deve-se ressaltar que as amostras utilizadas nos experimentos não apresentaram micro-organismos mesófilos, o que pode ter facilitado o desenvolvimento e sobrevivência de *P. aeruginosa* nas águas minerais. Tamagnini e Gonzáles<sup>32</sup> isolaram *P. aeruginosa* de águas minerais em garrafas plásticas, estocadas por 30 dias e observaram que quando a microbiota natural não era encontrada havia uma elevada multiplicação da bactéria. Os autores verificaram que o tempo de geração do micro-organismo era de 26,1 h nas amostras apresentando microbiota competidora e de 3,6 h na ausência de outras bactérias.

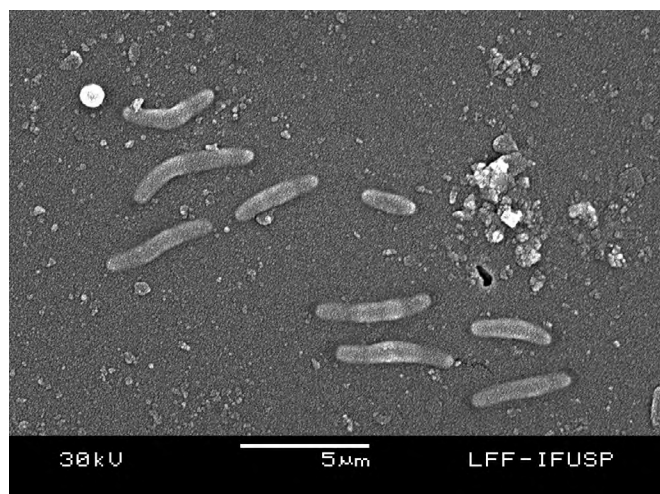


**Figura 3.** Perfil de desenvolvimento de *P. aeruginosa* em amostras de água mineral de 20 L armazenadas em temperatura de 20 a 25 °C por 60 dias (1440 h)

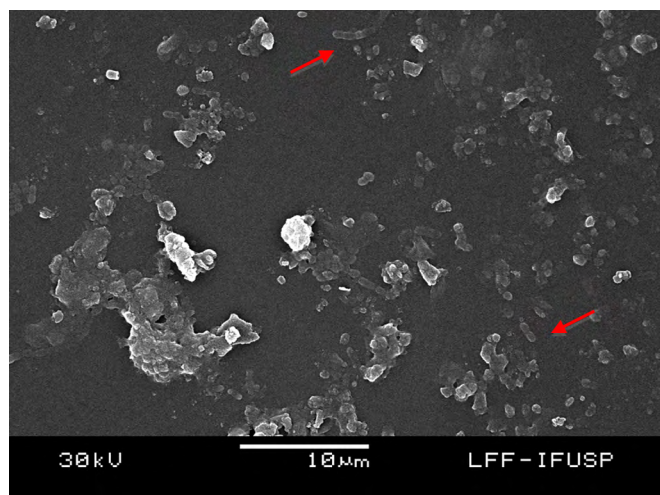
A contaminação da água mineral por *P. aeruginosa* pode ocorrer na fonte ou devido a falhas de higienização e sanitização dos equipamentos na linha de produção ou das embalagens retornáveis, e em função da presença de cápsula polissacarídica, este micro-organismo pode formar biofilmes em diferentes superfícies. A presença de *P. aeruginosa* aderida a superfície

de embalagens de 20 L e 1,5 L pode ser observada nas microfotografias realizadas em microscópio de varredura eletrônica (Figuras 4 e 5). Deve-se ressaltar que os fragmentos obtidos das garrafas de 1,5 L foram da parte inferior (fundo) e superior e, dos galões de 20 L foram retirados da parte central, em que havia uma reentrância na embalagem.





**Figura 4.** Microscopia eletrônica de varredura (aumento 5.000X) do fragmento de policloreto de vinila (PVC) extraído de um galão de 20 L de água mineral, onde se observa a adesão de *P. aeruginosa*



**Figura 5.** Microscopia eletrônica de varredura (aumento 2.500X) do fragmento de polietileno tereftalato (PET) de uma garrafa de 1,5 L de água mineral, onde se observa a adesão de *P. aeruginosa*

Pelo fato da *P. aeruginosa* ser um patógeno oportunista, formar biofilme e sobreviver, por um longo período, em condições adversas, sua presença em águas minerais pode representar um risco à saúde pública, podendo causar várias infecções, especialmente em imunodeprimidos. Medidas de higiene e estocagem adequadas das embalagens são fundamentais para garantir a qualidade e inocuidade do produto. Além disso, os fabricantes precisam estar atentos ao prazo de validade existente para galões de 10 e 20 L<sup>33,34</sup>, evitando assim a utilização de embalagens que possam ter ranhuras na parte interna, facilitando a formação de biofilmes<sup>35</sup>.

## CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que o armazenamento da água mineral sob refrigeração (4°C) contribui para a redução da população de *P. aeruginosa*, enquanto temperaturas mais elevadas favorecem a multiplicação do micro-organismo e sua sobrevivência por longos períodos. Nas amostras armazenadas a 35 ± 1°C *P. aeruginosa* se manteve viável por mais de um ano, demonstrando a capacidade de adaptação dessa bactéria em ambientes com baixas concentrações de nutrientes. Os galões de água mineral de 20 L merecem atenção especial, pois além de serem retornáveis, são armazenados, geralmente, em temperatura ambiente que pode favorecer o aumento da população de *P. aeruginosa*, como demonstrado nesse estudo. Portanto, as Boas Práticas de Fabricação (BPF) e a aplicação do sistema APPCC (Análise de Perigo e Pontos Críticos de Controle) devem ser implantadas e implementadas pela indústria de águas minerais para minimizar estes riscos.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem Daniel C. Flores (Departamento de Epidemiologia – Faculdade de Saúde Pública, Universidade São Paulo) pela colaboração na Microscopia Eletrônica de Varredura.

## REFERÊNCIAS

1. Pant ND, Poudyal N, Bhattacharya SK. Bacteriological quality of bottled drinking water versus municipal tap water in Dharan municipality, Nepal. *J Health Popul Nutr*. 2016;35(1):17. <https://doi.org/10.1186/s41043-016-0054-0>
2. Associação Brasileira da Indústria de Águas Minerais - ABINAM. [acesso 2017 Mar 28]. Disponível em: [http://www.abinam.com.br/lermais\\_materias.php?cd\\_materias=71](http://www.abinam.com.br/lermais_materias.php?cd_materias=71)
3. Mohammadi Kouchesfahani M, Alimohammadi M, Nabizadeh Nodehi R, Aslani H, Rezaie S, Asadian S. *Pseudomonas aeruginosa* and heterotrophic bacteria count in bottled waters in Iran. *Iran J Public Health*. 2015;44(11):1514-9.



- Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4703231/pdf/IJPH-44-1514.pdf>
- Gonzalez C, Gutierrez C, Grande T. Bacterial flora in bottled uncarbonated mineral drinking water. *Can J Microbiol*. 1987;33(12):1120-5. <https://dx.doi.org/10.1139/m87-196>
  - Eiroa MNU, Junqueira VCA, Silveira NFA. Variação da microbiota natural e de *Pseudomonas aeruginosa* em água mineral não carbonatada embalada em diferentes materiais durante o armazenamento a 30°C ± 1°C. *Ciênc Tecnol Aliment*. 1997;17(2):167-71. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20611997000200019>
  - Eiroa MNU, Junqueira VCA, Silveira NFA. Avaliação microbiológica de linhas de captação e engarrafamento de água mineral. *Ciênc Tecnol Aliment*. 1996;16(2):165-9.
  - Abd El-Salam MM, Al-Ghitany EM, Kassem MM. Quality of bottled water brands in Egypt Part II: biological water examination. *J Egypt Public Health Assoc*. 2008;83(5-6):468-86.
  - Faruche Filho A, Dias MFF, Taromaru PH, Cerqueira CS, Duque JG. Qualidade microbiológica de águas minerais não carbonatadas em embalagens de 1,5 litros, comercializadas em Araraquara-SP. *Alim Nutr Araraquara*. 2009;19(4):421-5.
  - Coelho MIS, Mendes ES, Cruz MCS, Bezerra SS, Silva RPP. Avaliação da qualidade microbiológica de águas minerais consumidas na região metropolitana de Recife, Estado de Pernambuco. *Acta Sci Health Sci*. 2010;32(1):1-8. <https://doi.org/10.4025/actascihealthsci.v32i1.3837>
  - Naze F, Jouen E, Randriamahazo RT, Simac C, Laurent P, Blériot A et al. *Pseudomonas aeruginosa* outbreak linked to mineral water bottles in a Neonatal intensive care unit: fast typing by use of high-resolution melting analysis of a variable-number tandem-repeat locus. *J Clin Microbiol*. 2010;48(9):3146-52. <https://doi.org/10.1128/JCM.00402-10>
  - Casanovas-Massana A, Blanch AR. Diversity of the heterotrophic microbial populations for distinguishing natural mineral waters. *Int J Food Microbiol*. 2012;153(1-2):38-44. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.10.012>
  - Pedrosa AP, Brandão MLL, Medeiros VM, Rosas CO, Bricio SML, Almeida AECC. Pesquisa de fatores de virulência em *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de águas minerais naturais. *Rev Ambient Água*. 2014;9(2):313-24. <http://dx.doi.org/10.4136/ambi-agua.1359>
  - Tafere W, Abera F, Beyene Y, Legesse T. Microbiological quality and safety of bottled water brands sold in Ethiopia. *Ethiop J Health Dev*. 2014;28(3):178-84. Disponível em: <https://www.ejhd.org/index.php/ejhd/article/view/24/pdf>
  - Georgieva V, Dimitrova Y. Study of the microbiological quality of bulgarian bottled water in terms of its contamination with *Pseudomonas aeruginosa*. *Cent Eur J Public Health*. 2016; 24(4):326-30. <https://doi.org/10.21101/cejph.a4219>
  - Legnani P, Leoni E, Rapuano S, Turin D, Valenti C. Survival and growth of *Pseudomonas aeruginosa* in natural mineral water: a 5-year study. *Int J Food Microbiol*. 1999;53(2-3):153-8. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00151-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00151-8)
  - Caskey S, Stirling J, Moore JE, Rendall JC. Occurrence of *Pseudomonas aeruginosa* in waters: implications for patients with cystic fibrosis (CF). *Lett Appl Microbiol*. 2018;66(6):537-41. <https://doi.org/10.1111/lam.12876>
  - Falcone-Dias MF, Vaz-Moreira I, Manaia CM. Bottled mineral water as a potential source of antibiotic resistant bacteria. *Water Res*. 2012;46(11):3612-22. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.04.007>
  - Kim YJ, Jun YH, Kim YR, Park KG, Park YJ, Kang JY et al. Risk factors for mortality in patients with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia; retrospective study of impact of combination antimicrobial therapy. *BMC Infect Dis*. 2014;14:161. <https://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-14-161>
  - Mena KD, Gerba CP. Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water. *Rev Environ Contam Toxicol* 2009;201:71-115. [https://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-0032-6\\_3](https://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-0032-6_3)
  - Sharma G, Rao S, Bansal A, Dang S, Gupta S, Gabrani R. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: potential therapeutic targets. *Biologicals*. 2014;42(1):1-7. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2013.11.001>

21. Khaniki GRJ, Aghaee EM, Alimohammadi M, Dehghani MH. Effects of Environmental Conditions on Growth and Permanence of *Pseudomonas aeruginosa* in Bottled Water. *J Appl Biol Sci*. 2014;8(2):91-5. <http://www.jabsonline.org/index.php/jabs/article/view/378/381>
22. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº. 275, de 22 set. 2005. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Água Mineral Natural e Água Natural. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 24 mai. 2007. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/rdc0275\\_22\\_09\\_2005.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/rdc0275_22_09_2005.html)
23. Hall N.H. 9222 B Standard total coliform membrane filter procedure using endo media. 9222 G Partitioning thermotolerant coliforms from MF total coliform using EC broth. In: Baird RB, Eaton AD, Rice EW et al. Standard methods for the examination of water and wastewater. 23. ed. Washington (DC): APHA, AWWA, WEF; 2017.
24. Noble T R. 9230 C Membrana filter techniques. In: Baird RB, Eaton AD, Rice EW et al. Standard methods for the examination of water and wastewater. 23. ed. Washington (DC): APHA, AWWA, WEF; 2017.
25. International Organization for Standardization – ISO. ISO 14189. Water quality – Enumeration of *Clostridium perfringens* – Method using membrane filtration. 1. ed., 2013.
26. Oshiro R. K., Fujioka R. S., Oliver J., Shields J. M. 9213 E Membrana filter technique for *Pseudomonas aeruginosa*. In: Baird RB, Eaton AD, Rice EW et al. Standard methods for the examination of water and wastewater. 23. ed. Washington (DC): APHA, AWWA, WEF; 2017.
27. Dicheter G., LeChevallier M. W. 9215 B Pour plate method. In: Baird RB, Eaton AD, Rice EW et al. Standard methods for the examination of water and wastewater. 23. ed. Washington (DC): APHA, AWWA, WEF; 2017.
28. Pessôa GV, Da Silva EA. Milieu pour l'identification présomptive rapide des entérobactéries, des *Aeromonas* et des vibrions. *Ann Microbiol (Paris)* 1974;125A(3):341-7.
29. Khan NH, Ahsan M, Taylor WD, Kogure K. Culturability and survival of marine, freshwater and clinical *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbes Environ*. 2010;25(4):266-74. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME09178>
30. Leclerc H, Moreau A. Microbiological safety of natural mineral water. *FEMS Microbiology Reviews* 2002; 26:207-222. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00611.x>
31. Lewenza S, Abboud J, Poon K, Kobryn M, Humplik I, Bell JR et al. *Pseudomonas aeruginosa* displays a dormancy phenotype during long-term survival in water. *PLoS One*. 2018;13(9):e0198384. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198384>
32. Tamagnini LM, González RD. Bacteriological stability and growth kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* in bottled water. *J Appl Microbiol*. 1997;83(1):91-4. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1997.d01-400.x>
33. Ministério de Minas e Energia (BR). Departamento Nacional de Produção Mineral (DNPM). Portaria nº 387, de 19 de setembro de 2008. Disciplina o uso das embalagens plástico-garrafão retornável, destinadas ao envasamento e comercialização de água mineral e potável de mesa e dá outras providências. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 23 set 2008. Disponível em: [https://anmlegis.datalegis.inf.br/action/UrlPublicasAction.php?acao=abrirAtoPublico&num\\_ato=00000387&sgl\\_tipo=POR&sgl\\_orgao=DNPM/MME&vlr\\_ano=2008&seq\\_ato=000](https://anmlegis.datalegis.inf.br/action/UrlPublicasAction.php?acao=abrirAtoPublico&num_ato=00000387&sgl_tipo=POR&sgl_orgao=DNPM/MME&vlr_ano=2008&seq_ato=000)
34. Ministério de Minas e Energia (BR). Departamento Nacional de Produção Mineral. Portaria 358, de 21 de setembro de 2009. Altera a Portaria 387, de 19 de setembro de 2008. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 22 set 2009. Disponível em: [https://anmlegis.datalegis.inf.br/action/UrlPublicasAction.php?acao=abrirAtoPublico&num\\_ato=00000358&sgl\\_tipo=POR&sgl\\_orgao=DNPM/MME&vlr\\_ano=2009&seq\\_ato=000](https://anmlegis.datalegis.inf.br/action/UrlPublicasAction.php?acao=abrirAtoPublico&num_ato=00000358&sgl_tipo=POR&sgl_orgao=DNPM/MME&vlr_ano=2009&seq_ato=000)
35. Jones CR, Adams MR, Zhdan PA, Chamberlain AH. The role of surface physicochemical properties in determining the distribution of the autochthonous microflora in mineral water bottles. *J Appl Microbiol*. 1999;86(6):917-27. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00768.x>



# Prospecção fitoquímica de cruá vermelho (*Sicana odorifera* Naudin) e atividade antioxidante do fruto

## Phytochemical prospection of cruá vermelho (*Sicana odorifera* Naudin) and antioxidant activity of the fruit

RIALA6/1778

Victor Maximiliano Reis TEBALDI<sup>1</sup>, Yuri Heinrich Silva de SOUZA<sup>1</sup>, Edilberto Oliveira de ALMEIDA<sup>1</sup>, Jonathan Neves de Carvalho ALVES<sup>1</sup>, Alexandre Miranda de SOUZA<sup>1</sup>, Kamila de Oliveira do NASCIMENTO<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Centro Universitário de Barra Mansa, Rua Vereador Pinho de Carvalho, 267, Centro, Barra Mansa, RJ, Brasil, CEP: 27330-550. Tel: 24 3325 0222. E-mail: [victormaxibio@yahoo.com.br](mailto:victormaxibio@yahoo.com.br)

<sup>2</sup>Centro Universitário Geraldo di Biase, Barra do Pirai, RJ, Brasil

Recebido: 02.04.2019 - Aceito para publicação: 31.07.2019

### RESUMO

Originária da América Tropical, provavelmente do Brasil, a *Sicana odorifera* Naudin (Cucurbitaceae) é uma planta herbácea anual, vigorosa, rasteira ou trepadeira, cujos frutos exalam um odor intenso e agradável quando maduros. O presente trabalho visou caracterizar os metabólitos secundários em extratos obtidos das folhas, sementes, polpa e casca do fruto, e avaliar a atividade antioxidante do fruto. Diferentes classes de metabólitos secundários foram identificadas nas análises qualitativas e quantitativas, realizadas nos diferentes extratos obtidos. A atividade antioxidante do extrato aquoso da polpa do fruto foi determinada pela habilidade de sequestrar o radical estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH). Os carotenoides foram extraídos com acetona, separados com éter de petróleo e quantificados em espectrofotômetro UV. A triagem fitoquímica dos extratos indicou a presença de compostos como açúcares redutores, depsídeos e depsidonas, esteroides e triterpenoides, polissacarídeos, proteínas e aminoácidos, saponinas, taninos, alcaloides e carotenoides, além de atividade antioxidante na polpa do fruto. De acordo com os resultados obtidos constata-se que *S. odorifera* possui propriedades de interesse farmacológico. O estudo serve como subsídio preliminar sobre o conhecimento da composição química e viabilidade de emprego dessa planta para fins medicinais.

**Palavras-chave.** metabólitos secundários, atividade antioxidante, extratos bioativos, *Sicana odorifera*, Cucurbitaceae.

### ABSTRACT

Being native of Tropical America, probably from Brazil, the *Sicana odorifera* Naudin (Cucurbitaceae) is an annual herbaceous plant, vigorous, creeping or climbing, whose fruits exude an intense and pleasant odor when ripe. This study aimed at characterizing the secondary metabolites in the extracts obtained from the leaves, seeds, pulp and fruit peel, and to evaluate the fruit antioxidant activity. Different classes of secondary metabolites were identified by the qualitative and quantitative analyzes in the varied extracts. The antioxidant activity of the aqueous extract from the fruit pulp was determined by the ability to sequester the stable radical 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl (DPPH). The carotenoids were extracted with acetone, separated with the petroleum ether, and quantified by UV spectrophotometer. Phytochemical screening of extracts indicated the occurrence of compounds as the reducing sugars, depsids and depsidones, steroids and triterpenoids, polysaccharides, proteins and amino acids, saponins, tannins, alkaloids and carotenoids, besides the antioxidant activity in the fruit pulp. According to the obtained results, *S. odorifera* possesses properties of pharmacological interest. This study provides a preliminary subsidy on the knowledge concerning the chemical composition and the feasibility of using this plant for medicinal purposes.

**Keywords.** secondary metabolites, antioxidant activity, bioactive extracts, *Sicana odorifera*, Cucurbitaceae.

## INTRODUÇÃO

O gênero *Sicana* compreende um grupo de plantas nativas brasileiras da família Cucurbitaceae encontradas nas regiões Nordeste e Sudeste, e espalhadas pela América Central e do Sul, encontrado a 0-1400 m acima do nível do mar, do México ao Brasil. Entre as espécies pertencentes a este gênero, destacam-se a *Sicana sphaerica* e a *Sicana odorifera*<sup>1</sup>.

*Sicana odorifera* é planta herbácea anual, vigorosa, rasteira ou trepadeira, com ramos quadrangulares, folhas grandes e tripartidas e frutos cilíndricos e alongados, com até 60 cm de comprimento e 12 cm de diâmetro, com casca dura e coloração variando de laranja-avermelhada a roxa-escura. A polpa é carnosa, amarelada, com sementes achatadas castanho-escuros, com cerca de 1 cm<sup>2</sup>.

Há poucos estudos relacionados ao fruto, no entanto já foi relatado que o fruto cruá vermelho possui uma gama de nutrientes, carotenoides, vitamina C, vitamina E, vitamina A, rico em potássio, cobre, ferro e zinco. Uma porção de 105 g fornece cerca de 70 kcal com altas concentrações de proteínas<sup>3</sup>.

Compostos aromáticos livres e na forma de glicoconjugados envolvidos na formação de aroma foram isolados e caracterizados da polpa dos frutos<sup>4</sup>. Jaramillo et al<sup>5</sup>, relatam também a presença de flavonoides e antocianinas com atividade antioxidante na casca dos frutos. Na composição química do fruto *S. odorifera*, foram identificados 37 compostos voláteis na polpa, sendo 22 destes compostos responsáveis pelo aroma do fruto<sup>4</sup>. Nas sementes foram evidenciadas substâncias triterpênicas, flavonas e quercitina<sup>6</sup>.

Este fruto tem sido utilizado no Brasil para diversos fins como a ornamentação e para a medicina popular, na qual é utilizada no tratamento de diversos sintomas e enfermidades, sendo subutilizado e de menor expressão econômica, mas de características apreciáveis<sup>7</sup>. Há relatos da utilização de *S. odorifera* na medicina popular como anti-hipertensivo, anti-hemorragico, tratamento de problemas de pele, anemia e refluxo gastroesofágico, desordem menstrual, doenças do útero, verminose e azia<sup>8</sup>.

Diante do exposto este estudo visou caracterizar os metabólitos secundários de interesse

farmacológico em extratos obtidos a partir de folhas, sementes, polpa e casca do fruto, e avaliar a capacidade antioxidante do fruto.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Obtenção de folhas e frutos de *S. odorifera*

As folhas e um total de nove frutos (**Figura 1**) foram coletados em uma propriedade rural localizada no município de Barra Mansa, RJ, localizada entre as coordenadas: 22° 32' 39" sul, longitude de 44° 10' 17" oeste e altitude de 381 metros, com aérea de 548,9 km<sup>2</sup>. A coleta ocorreu no mês de agosto de 2017. Os espécimes foram encaminhados ao Laboratório de Botânica e Laboratório de Análises Físico-Químicas e Bromatológicas do Centro Universitário de Barra Mansa (UBM), onde foram devidamente identificados, higienizados, medidos, pesados e armazenadas até sua utilização. Os frutos pesavam entre 1,295 kg a 3,140 kg, medindo de 18 cm a 38 cm de comprimento com 28,5 cm a 32,5 cm de circunferência.



**Figura 1.** Flor (A), folhas (B) e frutos (C) de *S. odorifera* (Fonte: Victor Maximiliano Reis Tebaldi)

### Obtenção dos extratos etanólicos das folhas, sementes e casca do fruto

O material vegetal foi fragmentado em pequenos pedaços e desidratado em estufa a 40°C por 72 horas. Em seguida, procedeu-se a trituração até a obtenção de um pó fino, que foi utilizado na preparação dos extratos etanólicos.



Os extratos foram obtidos a partir de 50 g do pó de cada uma das partes utilizadas adicionado de 500 mL de álcool etílico na concentração 80%. Em seguida foram levados ao banho-maria a 80°C por 60 minutos. Após, o material obtido foi filtrado a vácuo em funil de Büchner com papel filtro qualitativo com gramatura 80 g/m<sup>2</sup> e 12,5 cm de diâmetro. O processo de extração foi repetido por três vezes. Ao final das três extrações os resíduos foram levados para o evaporador rotatório à temperatura de 40°C por aproximadamente 5 horas até que todo o álcool fosse removido das amostras<sup>9</sup>.

### Obtenção do extrato aquoso da polpa do fruto

Para elaboração do extrato aquoso, os frutos foram descascados e tiveram sua polpa separada do mesocarpo com auxílio de bisturi e suas sementes foram removidas. A polpa foi comprimida com auxílio de um pistilo em gral de porcelana e adicionada de água destilada na proporção de 1:2 (p/v), quando necessário. Após a compressão, foram utilizadas gazes cirúrgicas para a filtração simples, e em seguida o material resultante foi centrifugado por 15 minutos a 1200 x g. Para os testes foram usados os sedimentos resultantes da centrifugação<sup>10</sup>.

### Prospecção fitoquímica dos constituintes de *S. odorifera*

A triagem fitoquímica foi realizada por meio de ensaios qualitativos padronizados para detecção dos seguintes compostos: açúcares redutores, polissacarídeos, proteínas e aminoácidos, taninos, catequinas, flavonoides, glicosídeos cardíacos, esteroides e triterpenóides, depsídeos e depsidonas, cumarinas, saponina e alcaloides<sup>11</sup>.

A confirmação da presença dos compostos fitoquímicos investigados nos extratos etanólico e aquoso foi verificada por meio das seguintes observações: saponinas pela formação de espuma abundante e estável por mais de 30 minutos; catequinas, com o surgimento de cor vermelha; esteroides e triterpenóides com o surgimento de sucessão de cores, do azul evanescente seguido de verde persistente por extração com clorofórmio, anidrido acético e ácido sulfúrico; cumarinas pelo desenvolvimento de fluorescência azul na parte exposta da mancha em papel de filtro sob luz ultravioleta; alcaloides, com aparecimento de

precipitado laranja avermelhado para o reativo de Bouchardat e branco para o reativo de Mayer; açúcares redutores pela formação de um precipitado vermelho tijolo; depsídeos e depsidonas pelo desenvolvimento de coloração verde, cinza ou azul; glicosídeos cardíacos pelo surgimento de coloração roxa intensa; polissacarídeos pelo surgimento de coloração azul; proteínas e aminoácidos pelo surgimento de coloração violeta persistente; taninos pela mudança de coloração ou formação de precipitado; e por fim flavonoides pelo surgimento de coloração rósea no precipitado.

### Determinação de atividade antioxidante da polpa do fruto

#### *Preparação de extratos*

Os extratos foram obtidos de acordo com Torres<sup>12</sup> com modificações. Foi diluído aproximadamente 1 g de amostra com etanol 70% em balão volumétrico (50 mL). Esta solução foi submetida a um agitador magnético a 25°C durante 1 h e depois filtrada a vácuo utilizando um funil de Buchner de vidro de 250 mL com placa porosa (n° 3).

#### *Método de captura do radical livre (DPPH)*

A capacidade antioxidante foi determinada de acordo com o método DPPH, descrito por Rufino et al<sup>13</sup> que se baseia na quantificação da eliminação de radicais livres, com modificações. Foi preparada uma solução de metanol contendo 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) 0,06 µM. Depois se adicionou uma alíquota de 100 µL de extrato de amostras a 3,9 mL desta solução. A absorbância foi medida em espectrofotômetro UV-visível ((NI 2000UV, Nova Instruments®) a 517 nm. A quantidade da capacidade antioxidante foi expressa em µM de trolox equivalente por 100 g de amostra (base úmida). A eliminação de radicais livres (% SRL) de cada amostra foi calculada de acordo com a Equação 1. Onde: Ac e Aa são valores de absorbância no controle e na amostra, respectivamente. Toda a análise foi realizada em triplicata.

$$\% \text{ SRL} = \frac{(A_c - A_a) \times 100}{A_c} \quad (\text{Eq. 1})$$



### Determinação de compostos fenólicos totais

O conteúdo fenólico total foi avaliado seguindo o método de Folin-Ciocalteu<sup>14</sup>. Os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico (GAE, mg / 100 g de massa fresca) utilizando uma curva padrão de ácido gálico (0,05 a 1,2 mg / mL). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

### Determinação de antocianinas totais

Para a extração de pigmentos de antocianina foi utilizada a solução de etanol 95% acidificada com HCl 1,5 M (85:15 v / v), pH 1,0, obtendo a solução de extração da metodologia de Fuleki e Francis<sup>15</sup>. A leitura foi realizada em espectrofotômetro UV com comprimento de onda igual a 520 nm. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

### Determinação de carotenoides

Pesou-se aproximadamente 0,5 g de amostras previamente trituradas diretamente em béquer (50 mL). O pigmento foi extraído da amostra com acetona (10 mL) e celite (1 g) utilizando almofariz e pistilo de porcelana e filtradas em funil com placa de vidro sinterizado até que o resíduo se apresentasse destituído de cor (4 extrações).

Em um funil de separação contendo aproximadamente 50 mL de éter de petróleo, foi adicionado o extrato de carotenoides (obtido da extração), seguido de adição cuidadosa de água destilada (aproximadamente 300 mL). Após a separação das fases, a fase aquosa, constituída de água e acetona, foi descartada. O procedimento foi repetido até que todo o extrato fosse transferido para o éter de petróleo.

Em seguida, a fase etérea foi lavada cinco vezes com água destilada para a remoção completa de acetona. Após o descarte da água da última lavagem, o extrato etéreo foi recolhido num balão volumétrico fazendo-o passar por funil de vidro contendo uma pequena porção de sulfato de sódio anidro (2 g) para remoção de eventual água residual e recolhido em um balão volumétrico. Após o ajuste do volume, leitura da absorbância no comprimento de 450 nm espectrofotômetro UV-Visível<sup>16</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os frutos de *S. odorifera* evidenciaram de maneira geral tamanho e peso consideráveis (até 3,140 kg, 45 cm de comprimento e 32,5 cm de circunferência), e abundância de polpa e sementes em seu interior.

Os metabólitos secundários encontrados nos extratos de *S. odorifera* estão descritos na **Tabela 1**.

**Tabela 1.** Triagem fitoquímica dos extratos etanólicos de folhas, sementes e casca do fruto e extrato aquoso da polpa do fruto de *S. odorifera*

Constituintes químicos	Partes testadas			
	Folhas	Sementes	Casca do fruto	Polpa do fruto
Açúcares Redutores	+	+	+	+
Catequinas	-	-	-	-
Depsídeos e Depsidonas	-	-	+	-
Cumarinas	-	-	-	-
Esteroides e triterpenoides	-	-	-	+
Flavonoides	-	-	-	-
Glicosídeos cardíacos	-	-	-	-
Polissacarídeos	-	-	-	+
Proteínas e aminoácidos	+	+	+	+
Saponinas	-	-	-	+
Taninos	-	-	+	-
Alcaloides*				
(RB)	-	+	-	+
(RM)	-	+	-	+

\*Reativos Bouchardat (RB), Mayer (RM); (+) Resultado positivo; (-) Resultado negativo

Dentre os compostos pesquisados foi verificada uma maior quantidade de classes de metabólitos secundários ocorrendo na polpa e casca do fruto e menor quantidade nas folhas. As cascas e folhas do fruto podem ser utilizadas como refresco, antipirético, hemorragias uterinas e infecções sexualmente transmissíveis (IST). Com o chá das folhas e flores, o mesmo pode ser utilizado como antiflatulento, combatendo também dispepsia e espasmos causadores de dor. A infusão das sementes é utilizada no Brasil como febrífuga, emenagoga,

vermífuga e anticonstipante, contudo, deve-se ter atenção quanto à quantidade a ser ingerida, pois as sementes e flores podem conter ácido cianídrico. Já a polpa do fruto pode ser consumida tanto verde quanto cozida como legumes e utilizada em sopas, conservas, fatiada e descascada como o melão, além de poder ser utilizada na preparação de sucos, compotas, geleias, e diversas outras opções<sup>16</sup>.

A presença de açúcares redutores foi verificada nas folhas e polpa dos frutos. Os monossacarídeos são conhecidos também como açúcares redutores (AR), pois em sua estrutura química possuem um grupo de aldeído ou cetona que ficam livres em solução aquosa e são capazes de reduzir o bromo ( $Br_2$ ). Sendo assim, os monossacarídeos são capazes de oxidarem na presença de agentes oxidantes em soluções alcalinas. Os frutos das cucurbitáceas são ricos em água, sendo os açúcares um importante fator de qualidade no melão, na melancia e em algumas espécies de abóbora e são, ainda, ricos em carotenos (provitamina A), um antioxidante que protege o organismo e previne o envelhecimento precoce, especialmente quando os frutos são de polpa laranja e amarela<sup>17</sup>.

O teste para depsídeos e depsidonas apresentou resultado positivo apenas para os extratos da casca. Os depsídeos e as depsidonas são substâncias fenólicas, obtidas a partir de acetil-CoA. Essa via é responsável por produzir o ácido hidroxibenzoico que, ao formar ésteres de duas ou mais subunidades, origina os depsídeos, os precursores para a formação de depsidonas<sup>18</sup>. Segundo Macedo et al<sup>19</sup>, terapeuticamente esses grupos têm sido reconhecidos por apresentarem propriedades antioxidantes, antivirais, antitumorais, analgésicas e antipiréticas.

O extrato da polpa do fruto apresentou reação positiva para a presença de esteroides e triterpenoides. De acordo com Simões e Spintzer<sup>11</sup>, os triterpenoides são produtos biossintéticos gerados a partir de unidades de isopreno. Eles possuem uma atividade anti-inflamatória, entretanto o mecanismo não é bem descrito. Agem como secretolíticos, pois promovem irritação na mucosa brônquica e aumentam o volume de secreção, ajudando na expectoração. Os esteroides são formados a partir dos triterpenos por meio de descarboxilações,

dentre suas principais bioatividades está a ação anti-inflamatória e analgésica.

A ocorrência de flavonoides na casca do fruto, embora relatada por Jaramilo et al<sup>5</sup> não foi constatada sua presença em nenhuma das partes analisadas neste trabalho.

O ensaio para a presença de polissacarídeos foi positivo na polpa do fruto. Os polissacarídeos são polímeros de alto peso molecular, formados a partir da polimerização de vários monossacarídeos. Nos vegetais são encontrados na forma de amido, celulose, goma, mucilagem e pectina. Vem ganhando bastante atenção nas últimas décadas devido a sua ação antitumoral, imunoestimulante, anticomplemento, anti-inflamatória, anticoagulante, antiviral, hipoglicêmica e hipocolesterolemiant<sup>11</sup>. Os resultados encontrados no presente trabalho corroboram com os descritos por Kienteka<sup>1</sup>, que relata a presença de 64,4% de carboidratos presentes na polpa. De acordo com a mesma autora, a polpa do fruto de *S. odorifera* de casca vermelha apresentou um elevado conteúdo de glucose (53,1%) o que pode sugerir a presença de amido ou até mesmo celulose, seguido de ácidos urônicos (24,9%) e cerca de 8% de manose e 8 % de galactose.

Por meio da triagem fitoquímica verificou-se a presença de proteínas e aminoácidos nos extratos de folhas, sementes, polpa e casca dos frutos. Em relação às proteínas, é sabido que as de origem animal têm maior valor biológico em comparação com as proteínas vegetais. No entanto, populações de baixo poder aquisitivo têm acesso limitado a proteínas animais. Assim, a identificação de espécies vegetais ricas em proteínas e incentivos de cultivo e consumo destas espécies podem contribuir para diminuir as deficiências nutricionais destas populações e fornecer alternativas nutricionais para a população em geral, especialmente àquelas com hábitos e dietas alimentares diferenciados, como vegetarianos e veganos<sup>20</sup>.

Os frutos revelaram a presença de saponinas, evidenciada pela formação de espuma persistente por mais de 30 minutos. Esses compostos são terpenos policíclicos ou glicosídeos de esteroides de alta massa molecular que possuem uma parte hidrofílica (açúcares) e outra hidrofóbica (triterpeno ou esteroide). Esse metabólito tem sido usado com adjuvante farmacêutico em formulações,

componentes ativos em fitoterápicos e como matéria prima para a síntese de esteroides. Também possui características hipocolesterolemiantes, atividade anti-inflamatória, antiviral e aumento na diurese<sup>21</sup>.

A presença de taninos foi evidenciada somente na casca do fruto. Os taninos são compostos fenólicos que apresentam solubilidade em água e possuem habilidade de formar complexos insolúveis em água com proteínas, gelatinas e alcaloides<sup>22</sup>. Esses metabólitos são encontrados em diversos órgãos das plantas, tais como: madeira, folha, fruto e casca. São substâncias solúveis em água, em álcoois e acetona. Estes têm função de proteção da planta<sup>23</sup>. O conteúdo de compostos fenólicos pode variar nas diferentes partes dos frutos, principalmente quando se comparam a casca e a polpa. Normalmente na casca, observa-se maior concentração destes compostos<sup>24</sup>.

Aos taninos pode-se atribuir diversas atividades como, antidiarreico e antisséptico, antimicrobiano, antifúngico, são hemostáticos e podem servir como antídoto em casos de intoxicações, além de auxiliar no processo de cura de feridas, queimaduras e inflamações<sup>22</sup>. Em excesso podem reduzir significativamente a biodisponibilidade mineral e a digestibilidade proteica da refeição<sup>25</sup>.

A triagem fitoquímica apontou a presença de alcaloides nos frutos e sementes. Os alcaloides possuem uma grande diversidade estrutural e isso lhe concede uma ampla gama de ações biológicas, como: anticolinérgicos, amebicida, emético, anti-hipertensivos, antimalárico, antitumorais, antitussígenos, hipnoanalgésico, depressor cardíaco, estimulante do sistema nervoso central (SNC), diuréticos, miorrelaxante, simpatomimético, antiviral entre vários outros<sup>26</sup>. Os alcaloides, devido a sua grande diversidade estrutural, apresentam elevado número de ações farmacológicas, muitas delas úteis para a terapêutica como: antimalárica (quinina), antigotosa (cólquico), antitumoral (vimblastina e vincristina), emética (emetina) e sedativa da tosse (codeína e narceína). Na agricultura são utilizadas certas ações específicas de alguns alcaloides, como por exemplo a nicotina do tabaco para combater afídios, alguns alcaloides de núcleo pirrazolidínico são usados na síntese de feromônios empregados no acasalamento de insetos, ou a utilização da colquicina em floricultura

para obter plantas com flores dobradas, por efeito de duplicação de cromossomas<sup>25</sup>.

Entende-se que a aplicação dos métodos qualitativos, como a prospecção fitoquímica preliminar, é relevante por possibilitar *screening* inicial de mais baixo custo<sup>27</sup>, especialmente quando é ainda desconhecido o perfil fitoquímico de espécies medicinais potenciais pouco estudadas regionalmente e presentes em biomas de relevante interesse para conservação da biodiversidade<sup>28</sup>.

As pesquisas contemporâneas têm discutido amplamente a respeito da capacidade antioxidante de frutos devido sua ação no organismo humano. Na **Tabela 2** são observados os valores encontrados de atividade antioxidante, bem como de fitoquímicos que nela influenciam.

**Tabela 2.** Carotenoides totais, compostos fenólicos e capacidade antioxidante de *S. odorifera* (n=3)

Carotenoides totais (µg/g)	36,92±0,67
Fenólicos (µg de ácido gálico/g de amostra)	691,41±4,60
Capacidade antioxidante (µM Eq. Trolox/g de amostra)	1957,58±0,69
%SRL	78,13±4,42
Antocianinas totais (mg/100 g de amostra)	4,15±0,42

\*Média ± DP = intervalo confiável para uma probabilidade estatística de 95%; Os resultados apresentados na tabela correspondem a b.u. (base úmida); Cada valor é apresentado como média ± desvio padrão (n = 3). SRL (Sequestro de Radicais Livres); Eq. (Equivalente); µg (micrograma); µM (micromolar)

Os carotenoides são um grupo de compostos formados por diversas substâncias solúveis em lipídeos importantes para a saúde humana. Apesar de existirem centenas de carotenoides já identificados, aproximadamente 20 são encontrados em quantidades significativas no organismo humano. Os carotenoides totais possuem função de conferir cor aos vegetais, e por isso têm sido utilizados pela indústria alimentícia para a elaboração de corantes naturais<sup>29</sup>.

Os carotenoides apresentam, ainda, capacidade antioxidante, devido sua capacidade de sequestrar moléculas reativas de oxigênio e reagir com radicais livres. Esta capacidade tem sido relacionada a prevenção de várias doenças<sup>30</sup>.

Souza et al<sup>31</sup> quantificaram o teor de carotenoides totais de abóboras (*Cucurbita moschata*) no Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitáceas da Embrapa Semiárido. Os resultados encontrados pelos autores

variaram de 14,93 até 290,62 µg/g. Outros autores relatam outras fontes além da família Cucurbitaceae que são consideradas ricas em carotenoides totais, como o mamão (24,67 µg/g) encontrado por Carvalho et al<sup>32</sup> e a goiaba (42,98 µg/g) encontrado por Melo et al<sup>33</sup>; resultados semelhantes aos encontrados no presente trabalho (36,92 µg/g).

Em relação aos compostos fenólicos, trata-se de compostos provenientes do metabolismo secundário dos vegetais e sua capacidade antioxidante está relacionada às suas propriedades de óxido-redução. Estas podem desempenhar um papel fundamental na absorção e neutralização de radicais livres, quelando moléculas reativas de oxigênio ou decompondo peróxidos. Os mesmos representam os principais fitoquímicos responsáveis pela capacidade antioxidante de frutos<sup>34</sup>.

Segundo Teixeira et al<sup>35</sup>, as antocianinas são substâncias classificadas como fenólicas, responsáveis pela pigmentação das plantas e desempenham diversas funções terapêuticas no organismo humano, como por exemplo, a função anti-inflamatória e antioxidante. Os autores estabeleceram uma referência de no mínimo 200 mg/100 g para um fruto ser considerado rico em antocianinas. O melão de cheiro, analisado no presente estudo apresentou 4,15 mg/100 g, o que é considerado baixo, segundo a referência supracitada.

Conforme verificado na **Tabela 2**, o percentual de sequestro de radicais livres do fruto de melão de cheiro se mostrou elevado (78,13%), levando em consideração a classificação utilizada por Melo et al<sup>33</sup> os quais classificaram os extratos da polpa de frutos da seguinte maneira: baixo quando abaixo de 50%, moderado quando entre 50% e 70% e elevado quando acima de 70%.

A atividade antioxidante do fruto cruá vermelho (1957,58 µM Eq. ao Trolox/g), quando comparada a frutos conhecidamente ricos ou pobres em atividade antioxidante, como por exemplo, os resultados relatados por Gonçalves<sup>36</sup> para os seguintes frutos: camu-camu, que já é bem estabelecido como um fruto com alta atividade antioxidante (1439 µM Eq. ao Trolox/g), abiu (69 µM Eq. ao Trolox/g), tamarindo (21 µM Eq. ao Trolox/g), entre outros resultados. Já Ribeiro<sup>37</sup>, relata 1.221 µM Eq. ao Trolox/g de atividade antioxidante no morango. O método de análise

antioxidante empregado para a comparação de ambos os trabalhos foi o DPPH, ratificando assim, o poder antioxidante do cruá vermelho.

## CONCLUSÃO

Os testes de triagem fitoquímica realizados nos extratos etanólicos das folhas, sementes e casca do fruto, bem como no extrato aquoso da polpa do fruto indicaram a presença de oito classes de metabólitos secundários presentes na espécie. Foi constatada a ocorrência de um maior número de classes de metabólitos secundários nos extratos da polpa e casca dos frutos, respectivamente, enquanto o extrato das folhas apresentou apenas duas classes.

Ressalta-se o expressivo potencial antioxidante da polpa do fruto mesmo com uma baixa concentração de antocianinas, servindo de base para estudos futuros que busquem novas fontes naturais de compostos com esta característica.

A partir dos resultados constata-se que *S. odorifera* possui propriedades de interesse farmacológico. O estudo serve como subsídio preliminar sobre o conhecimento da composição química e viabilidade de utilização dessa espécie para fins medicinais, abrindo caminho para trabalhos futuros de isolamento e elucidação estrutural de seus constituintes químicos.

## REFERÊNCIAS

1. Kienteka SS. Extração e caracterização dos polissacarídeos dos frutos de *Sicana odorifera* [dissertação de mestrado]. Universidade Federal do Paraná; 2014. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/36269/R%20-%20D%20-%20SAMANTHA%20SHAROL%20KIENTEKA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
2. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Alimentos regionais brasileiros. 2 ed. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2015. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/alimentos\\_regionais\\_brasileiros\\_2ed.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/alimentos_regionais_brasileiros_2ed.pdf)
3. Paula Filho G, Barreira TF, Pinheiro SS, Cardoso LM, Martino HSD, Sant'Ana HMP. "Melão croá" (*Sicana sphaerica* Vell.) and "maracujina" (*Sicana odorifera*



- Naud.): Chemical composition, carotenoids, vitamins and minerals in native fruits from the Brazilian Atlantic forest. *Fruits*. 2015;70(6):341-9. <https://dx.doi.org/10.1051/fruits/2015035>
- Parada F, Duque C, Fujimoto Y. Free and bound volatile composition and characterization of some glucoconjugates as aroma precursors in melon de olor fruit pulp (*Sicana odorifera*). *J. Agric Food Chem*. 2000;48(12):6200-4. <https://dx.doi.org/10.1021/jf0007232>
  - Jaramillo K, Dawid C, Hofmann T, Fujimoto Y, Osorio C. Identification of antioxidative flavonols and anthocyanins in *Sicana odorifera* fruit peel. *J Agric Food Chem*. 2011;59(3): 975-83. <https://dx.doi.org/10.1021/jf103151n>
  - Nakano S, Fujimoto Y, Takahashi Y, Osorio C, Duque C. Cucurbita-5,23-diene-3 $\beta$ , 25-diol from *Sicana odorifera*. *Fitoterapia*. 2004;75(6):609-11. <https://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2004.05.004>
  - Araújo GS. Elaboração de uma cerveja tipo ale utilizando melão de caroá [*Sicana odorifera* (vell.) Naudin] como adjunto do malte [dissertação de mestrado]. Salvador (BA): Universidade Federal da Bahia; 2016. Disponível em: <http://repositorio.ufba.br/ri/handle/ri/20139>
  - Lima JF, Silva MPL, Teles S, Silva F, Martins GN. Evaluation of different substrates in the physiological quality of caroá melon [*Sicana odorifera* (Vell.) Naudin] seeds. *Rev Bras Plantas Med*. 2010;12(2):163-7. <https://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722010000200007>
  - Cardoso MG, Shan AY, Souza JA. Fitoquímica e Química de Produtos Naturais. Lavras (MG): UFLA/FAEPE, 2001. 67p. (Textos Acadêmicos).
  - Melo EA, Maciel MIS, Lima VLAG, Nascimento RJ. Capacidade antioxidante de frutas. *Rev Bras Cienc Farm*. 2008;44(2):195-201. <https://dx.doi.org/10.1590/S1516-93322008000200005>
  - Simões CMO, Spintzer, V. Óleos voláteis. In: Simões, CMO et al. (Org.). *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 7 ed. Porto Alegre (RS): Editora da UFRGS; 2010, p. 467-92.
  - Torres DFG, Mancini DAP, Torres RP, Mancini-Filho J. Antioxidant activity of macambo (*Theobroma bicolor* L.) extracts. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2002;104:278-81. [https://dx.doi.org/10.1002/1438-9312\(200205\)104:5<278::aid-ejlt278>3.0.co;2-k](https://dx.doi.org/10.1002/1438-9312(200205)104:5<278::aid-ejlt278>3.0.co;2-k)
  - Rufino MSM, Alves RE, Brito ES, Pérez-Jiénez J, Saura-Calixto F, Mancini-Filho J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chem*. 2010;121(4):996-1002. <https://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.037>
  - Quettier-Deleu C, Gressier B, Vasseur J, Dine T, Brunet C, Luyckx H et al. Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *J Ethnopharmacol*. 2000;72(1-2):35-42. [https://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00196-3](https://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00196-3)
  - Fuleki T, Francia FJ. Extraction and determination of total anthocyanin in cranberries. *J Food Sci*. 1968;33(1):72-7.
  - Rodríguez-Amaya, DB. *A Guide to Carotenoid Analysis in Foods*. Washington (DC): International Life Sciences Institute Press; 2001. Disponível em: <http://beauty-review.nl/wp-content/uploads/2014/11/A-guide-to-carotenoid-analysis-in-foods.pdf>
  - Canço F, Ramalho M, Lima G, Quedas F. Estudo da evolução da textura e cor da *Curcubita* spp. na pós-colheita e ao longo do tempo, 7º Encontro da Química dos Alimentos; 2005; Viséu.
  - Carrazoni ED. Estudo químico de líquens. VIII: isolamento dos constituintes da *Cladonia sprucey*. *Rev Quím Tecnol*. 2003;1:32-4. Disponível em: <https://www.maxwell.vrac.puc-rio.br/7547/7547.PDF>
  - Macedo FM, Martins GT, Rodrigues CG, Oliveira DA. Triagem Fitoquímica do Barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart) Coville]. *Rev Bras Biocien*. 2007;5(supl.2):1166-8. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/1026/765>
  - Kinupp VF, Barros IBI. Protein and mineral contents of native species, potential vegetables, and fruits. *Food Sci Technol*. 2008;28(4):846-857. <https://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612008000400013>
  - Costa NC, Chagas Junior AF, Ramos ACC, Soares LP, Scheidt GN. Atividade antimicrobiana e análise fitoquímica preliminar do extrato vegetal de alho no controle de fungos fitopatogênicos. *Rev Verde*



- Agroecologia Desenvolv Sustent. 2017;12(1):161-6. <https://doi.org/10.18378/rvads.v12i1.4406>
22. Monteiro JM, Albuquerque UP, Araújo EL, Amorim ELC. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. *Quím Nova*. 2005;28(5):892-6. <https://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422005000500029>
23. Cunha AP. (Org). *Farmacognosia e Fitoquímica*. 3 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian; 2010.
24. Daiuto ER, Tremocoldi MA, Alencar SM, Vieites RL, Minarelli PH. Composição química e atividade antioxidante da polpa e resíduos de abacate 'HASS'. *Rev Bras Frutic*. 2014;36(2): 417-24. <https://dx.doi.org/10.1590/0100-2945-102/13>
25. Pereira RJ, Cardoso MG. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. *J. Biotechnol Biodivers*. 2012;3(4):146-52. Disponível em: <https://www.todafruta.com.br/wp-content/uploads/2016/09/Metab%20C3%B3litos-secund%C3%A1rios-ARTIGO.pdf>
26. Santos SPD. Alcaloides indólicos de *Aspidosperma pyrifolium*: estudo fitoquímico e dados espectroscópicos [dissertação de mestrado]. Natal(RN): Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2016. Disponível em: <https://repositorio.ufrn.br/jspui/handle/123456789/22561>
27. Matos FJA. *Introdução à Fitoquímica Experimental*. 2 ed. Fortaleza (CE): Edições UFC; 1997, 141p.
28. Bessa NGF, Borges JCM, Beserra FP, Carvalho RHA, Pereira MAB, Fagundes R et al. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde–Tocantins. *Rev Bras Plantas Med*. 2013;15(4 supl.1):692-707. <https://dx.doi.org/10.1590/s1516-05722013000500010>
29. Silva-Júnior EV, Medeiros RAB, Silva RB. Análise de carotenoides da polpa *in natura* e desidratada de frutos de três espécies alimentícias e medicinais ocorrentes em Pernambuco. *Rev Bras Agrotecnol*. 2017;7(2)373-7. Disponível em: <https://www.gvaa.com.br/revista/index.php/REBAGRO/article/view/5232/373-377>
30. Kobori CN, Huber LS, Sarantopoulos CIGL, Rodriguez-Amaya DB. Teores de carotenoides em produtos de tomate. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2010;69,(1)78-89. Disponível em: [http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/rial/10/rial69\\_1\\_completa/1259.pdf](http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/rial/10/rial69_1_completa/1259.pdf)
31. Souza CO, Menezes JDS, Neto DCR, Assis JGA, Silva SR, Druzian JI. Carotenoides totais e vitamina A de cucurbitáceas do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Semiárido. *Cienc Rural*. 2012;42(5):926-33. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782012005000024>
32. Carvalho AV, Mattietto RA, Assis GT, Lourenço LFH. Avaliação do efeito da combinação de pectina, gelatina e alginato de sódio sobre as características de gel de fruta estruturada a partir de “mix” de polpa de cajá e mamão, por meio da metodologia de superfície de resposta. *Acta Amaz*. 2011;41(2):267-74. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672011000200011>
33. Mélo EA, Lima VLAG, Maciel MIS, Caetano ACS, Leal FLL. Polyphenol, ascorbic acid and total carotenoid contents in common fruits and vegetables. *Braz. J Food Technol*. 2006;9(2):89-94. Disponível em: <http://bjft.ital.sp.gov.br/arquivos/artigos/v9n2236a.pdf>
34. Kuskoski EM, Asuero AG, Morales MT, Fett R. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis antocianinas. *Cienc Rural*. 2006;36(4):1283-7. <https://dx.doi.org/10.1590/s0103-84782006000400037>
35. Teixeira LN, Stringueta PC, Oliveira FA. Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. *Rev Ceres*. 2008;55(4)297-304. Disponível em: <http://www.ceres.ufv.br/ojs/index.php/ceres/article/view/3320/1217>
36. Gonçalves, AESS. Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonoides e vitamina C [dissertação de mestrado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2008. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9131/tde-28012009-161811/publico/dissertacao.pdf>
37. Ribeiro PFA. Compostos bioativos de camu-camu (*Myrciaria dubia*) em função do ambiente de cultivo e do estágio de maturação [tese de doutorado] Viçosa (MG): Universidade Federal de Viçosa; 2012. Disponível em: <https://www.locus.ufv.br/bitstream/handle/123456789/465/texto%20completo.pdf?sequence=1>



# Avaliação antifúngica de uma solução à base de glucoprotamina e do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* em leveduras de ambiente hospitalar

## Antifungal action of a solution based on the glucoprotamine and the essential oil from *Cymbopogon citratus* on the yeasts from the hospital environment

RIALA6/1780

Carolina Lambrecht GONÇALVES<sup>1\*</sup>, Cristina Hallal de FREITAS<sup>1</sup>, Pedro Rassier dos SANTOS<sup>1</sup>, Evandro Carlos PEREIRA<sup>2</sup>, Camila LOPES<sup>1</sup>, Ivandra SANTI<sup>3</sup>, Rogério Antônio FREITAG<sup>3</sup>, Patrícia da Silva NASCENTE<sup>1</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Laboratório de Micologia, Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário Capão do Leão, s/n – Campus Universitário Capão do Leão, RS. Tel: 53 3275 9103. E-mail: [carolina\\_lamg@yahoo.com.br](mailto:carolina_lamg@yahoo.com.br)

<sup>2</sup>Laboratório de Micologia, Universidade Federal de Pelotas

<sup>3</sup>Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e Alimentos, Universidade Federal de Pelotas

Recebido: 18.02.2019 - Aceito para publicação: 27.10.2019.

### RESUMO

O objetivo deste estudo foi de avaliar a atividade antifúngica de uma solução à base de glucoprotamina (GLU) e de óleo essencial (OE) de *Cymbopogon citratus*. *Candida tropicalis*, *Claviceps lusitaniae*, *Meyerozyma (Pichia) guilliermondii* e *Candida parapsilosis* foram isoladas das superfícies de um hospital público de Pelotas, RS. A atividade antifúngica da GLU foi analisada nas concentrações de 0,25% a 0,0005%, e para o OE, obtido por Clevenger, foi utilizado nas concentrações de 17.500 µg/mL a 0,034 µg/mL. A análise cromatográfica foi efetuada por meio de CG/MS. A atividade anti-*Candida* foi analisada pela técnica de Microdiluição em Caldo para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM). A inibição pela GLU ocorreu em todas as concentrações testadas, enquanto o OE apresentou resultado de CIM que oscilou de 2846 a 5450 µg/mL, e CFM de 2853 a 5330 µg/mL. Alfa-citral (37,10%), beta-citral (32,77%) e beta-mirceno (18,75%) foram considerados como os compostos majoritários do OE. Os dados obtidos neste trabalho destacam a atividade antifúngica da solução à base de GLU e do OE de *C. citratus* na eliminação dos isolados de *Candida spp* ambientais.

**Palavras-chave.** *glucoprotamina*, *Candida*, contaminação ambiental, Hospital, óleo essencial de *Cymbopogon citratus*.

### ABSTRACT

This study aimed at evaluating the antifungal activity of glucoprotamine solution (GLU) and the essential oil from *Cymbopogon citratus* (EO). *Candida tropicalis*, *Claviceps lusitaniae*, *Meyerozyma (Pichia) guilliermondii* and *Candida parapsilosis* were isolated from the samples, which were collected from the surfaces of a public hospital located in Pelotas, RS. The antifungal activity of GLU was detected at the concentrations from 0.25% to 0.0005%, while the EO, by Clevenger, was used at concentrations from 17.500 µg mL to 0.034 µg/mL. Chemical analysis was determined by GC/MS. The anti-*Candida* activity was performed by using Broth Microdilution technique to determine the Minimal Fungicidal Concentration (MFC) and the Minimal Inhibitory Concentration (MIC). The inhibition by GLU occurred at all of the tested concentrations, whereas the EO showed MIC ranging from 2.846 to 5.450 µ/mL and the CFM from 2.853 to 5.330 µg/mL. Alfa-citral (37.10%), beta-citral (32.77%) and beta-mirceno (18.75%) were the majority compounds in the EO. The data obtained in the present study highlight the effectiveness of the solution based on GLU and EO for eliminating the environmental isolates of *Candida spp*.

**Keywords.** *glucoprotamine*, *Candida*, environmental contamination, Hospital, essential oil from *Cymbopogon citrates*.

## INTRODUÇÃO

O ambiente hospitalar configura-se como uma fonte exógena de infecção por selecionar agentes infecciosos resistentes e reunir indivíduos com diferentes níveis de vulnerabilidade<sup>1</sup>, deste modo, as superfícies hospitalares são constantemente contaminadas por bioaerossóis emitidos pelos pacientes internados, os quais podem entrar em contato com indivíduos sensíveis<sup>2</sup>, bem como, serem transferidos às mãos dos profissionais de saúde que realizarão atendimento e procedimentos nos pacientes hospitalizados<sup>3</sup>.

Dentre as opções utilizadas para a higienização de superfícies hospitalares, soluções a base de glucoprotamina apresentam, na literatura, atividade frente a vírus e bactérias em superfícies médicas e odontológicas<sup>4,5</sup> e em fungos obtidos de amostras biológicas de origem humana<sup>6</sup>. De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária<sup>3</sup> (ANVISA), a glucoprotamina possui atividade biocida e apresenta-se como um composto biodegradável com constituintes provenientes do óleo de coco. De forma semelhante, o trabalho de Sá Silva et al<sup>7</sup> traz o uso do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* como alternativa anti-*Candida*, obtendo resultados satisfatórios frente a isolados oriundos de infecções hospitalares.

Tendo-se em vista os índices de infecções de origem hospitalar, estudos que buscam verificar e aprimorar os métodos utilizados nas instituições de saúde tornam-se de grande relevância em saúde pública<sup>1</sup>. Neste contexto, o presente estudo tem como objetivo avaliar a atividade antifúngica de uma solução à base de glucoprotamina utilizada rotineiramente na higienização de um hospital público situado no município de Pelotas e do óleo essencial de *C. citratus* como alternativa anti-*Candida*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Glucoprotamina (GLU)

O desinfetante, com o princípio ativo glucoprotamina, foi obtido no hospital de estudo já nas condições de uso pelos profissionais da instituição, os quais, utilizam o desinfetante na proporção de 1:100. A atividade antifúngica da solução foi testada em concentrações que variaram de 0,25 a 0,0005%.

### *Cymbopogon citratus*

A espécie vegetal estudada foi adquirida por meio do distribuidor comercial (Luar Sul<sup>®</sup>) com certificação de qualidade e origem. Para a obtenção do óleo essencial (OE) as folhas de *C. citratus* foram submetidas à extração com arraste de vapor através do aparelho Clevenger, de acordo com a Farmacopeia Brasileira<sup>8</sup>. Após a obtenção, o óleo foi seco com sulfato de sódio anidro, armazenado em frasco âmbar e mantido a -18°C até a utilização. O processo de extração foi realizado no Departamento de Química Orgânica, no Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos (CCQFA/UFPel).

### Análise Cromatográfica

A análise dos constituintes químicos do óleo essencial foi realizada no Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais, no Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos (CCQFA/UFPel), por meio da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa, em um equipamento GC/MS Shimadzu QP2010, equipado com injetor split/splitless com coluna capilar Rtx-5MS RESTEK, nas seguintes condições cromatográficas: gás carreador Hélio, fragmentos obtidos por impacto de elétrons na energia de 70eV, vazão de 1.27mL/min, fluxo dividido de 1:50 e volume injetado de amostra 1µL. Temperatura programada do forno: a temperatura inicial foi de 40°C, com rampa de aquecimento em 5°C/min até 280°C, estabilizando nessa temperatura por 10 minutos, com tempo de corrida de 58 minutos, com uma temperatura do injetor e de interface 280°C. Os compostos foram analisados com base na biblioteca NIST08 do GC/MS e o óleo diluído em hexano (grau analítico, ultra puro).

### Micro-organismos

Foram identificados quatro espécies de leveduras no ambiente da Unidade de Terapia Intensiva (UTI) de um hospital público na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul: *Candida tropicalis* (n=1), *Claviceps lusitaniae* (n=16), *Meyerozyma (Pichia) guilliermondii* (n=18) e *Candida parapsilosis* (n=29). Foram identificadas e caracterizadas geneticamente por sequenciamento do espaçador transcrito interno (ITS) usando os *primers* ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT TGC GG) e ITS4 (5'-TCC TCC GCT

TAT TGA TAT GC)<sup>9</sup> por meio de análise do banco de dados NCBI BLASTn.

### Atividade antimicrobiana

A atividade antifúngica da glucoprotamina GLU e do OE deteve-se nos isolados ambientais e foram analisadas de acordo com o teste de Microdiluição em Caldo, adaptada aos fitofármacos, para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM) baseado no documento M27-S4<sup>10</sup>. Foram utilizadas dez diferentes concentrações de glucoprotamina, entre 0,25 e 0,0005%, e 17500 e 0,0347 ug/mL do OE, em meio *Roswell Park Memorial Institute* - RPMI-1640, com inóculo preparado em concentração equivalente à 10<sup>6</sup>ufc/mL. As placas foram incubadas a 36°C em estufa por 24 a 48 horas. O teste foi realizado em duplicata.

A CIM foi determinada por comparação visual do crescimento do micro-organismo ocorrido nos poços referentes às concentrações utilizadas com o seu crescimento no poço-controle positivo, sendo considerada como a menor concentração capaz de inibir o crescimento da levedura em relação ao poço controle-positivo. A CFM foi determinada a partir da transferência de 5µl de cada poço negativo em Ágar Sabouraud dextrose. Para tal, as placas foram incubadas a 36°C por 48 horas, sendo a CFM definida como a menor concentração onde não foi observado crescimento.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A solução à base de glucoprotamina apresentou atividade antifúngica a todas as concentrações testadas, enquanto que o óleo essencial de *C. citratus* apresentou atividade antifúngica em CIM que oscilou de 2846 ug/mL, para *C. parapsilosis*, a 5450 ug/mL, para *C. tropicalis*. As mesmas espécies também apresentaram as maiores variações quanto a CFM a qual foi de 2853 ug/mL, em *C. parapsilosis*, a 5330 ug/mL em *C. tropicalis* (**Tabela**).

Com relação aos componentes químicos do OE obteve-se como resultados, o alfa-citral (37,10%), beta-citral (32,77%), e beta-mirceno (18,75%) como os compostos majoritários do OE (**Figura**).

A glucoprotamina é um desinfetante de uso hospitalar recomendado pela ANVISA<sup>3</sup> por

apresentar atividade antimicrobiana ao promover a destruição da parede e membrana celular de micro-organismos. Por não apresentar volatilidade, ser facilmente dissolvida em água, não apresentar características teratogênicas e mutagênicas, é indicada na desinfecção de superfícies fixas hospitalares. Widmer e Frei<sup>11</sup> constataram efetividade antimicrobiana da glucoprotamina na concentração de 1,5% ao descontaminarem dispositivos médicos. Em superfícies de consultórios odontológicos, a solução a base deste composto, apresentou 100% de eficácia na eliminação microbiana<sup>5</sup>. Segundo Zeiter e Rapp<sup>4</sup>, a ação desinfetante da glucoprotamina está associada ao tempo de exposição do produto na superfície a ser higienizada, nas concentrações de 0,25% e 5%.

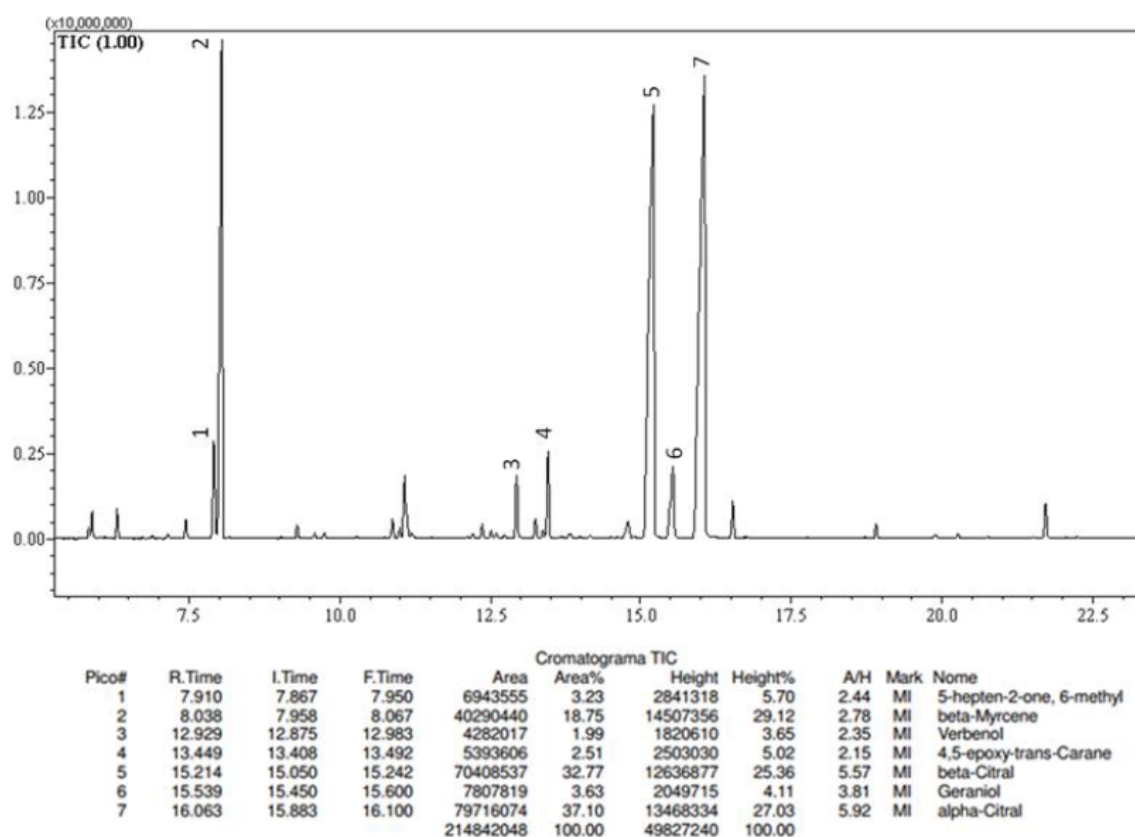
Sabe-se da necessidade de uma adequada descontaminação das superfícies hospitalares, as quais são constantemente contaminadas por bioaerossóis emitidos pelos pacientes internados. Os fluidos corporais contendo micro-organismos podem ser gerados durante a tosse, espirro, fala, aspiração e broncoscopia, os quais são impulsionados a uma curta distância antes de se fixarem rapidamente em uma superfície, podendo causar complicações ao serem depositadas diretamente na superfície da mucosa de uma pessoa sensível ou em superfícies próximas, que podem ser tocadas por uma pessoa sensível<sup>2</sup>, bem como, os micro-organismos pode ser transferidos às mãos dos profissionais de saúde que realizarão atendimento e procedimentos nos indivíduos hospitalizados quando não equipados corretamente.

Os óleos essenciais são considerados fontes promissoras de compostos bioativos, os quais, muitas vezes, apresentam propriedades terapêuticas, dentre estas, atividade antimicrobiana<sup>12</sup>. O óleo essencial de *C. citratus*, tem sido avaliado como antifúngico e desinfetante em estudos, com inibição de *C. albicans* na concentração de 1 µg/mL<sup>13</sup>, concentração inferior ao observado no presente estudo. De acordo com os resultados obtidos por Mathew et al<sup>14</sup>, o uso de óleo de *C. citratus* é uma alternativa natural segura aos antimicrobianos químicos, sendo considerado eficaz no controle de micro-organismos patogênicos podendo ser utilizado de forma não diluída para desinfecção de áreas altamente contaminadas, enquanto que as diluições de 1:2 ou 1:4 são suficientes em áreas de baixa densidade de patógenos, concentrações que se enquadram em nossos resultados obtidos com o OE de *C. citratus*.



**Tabela.** Médias da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) da Glucoprotamina

Micro-organismos	Número de Amostras	Óleo Essencial Médias: CIM / CFM (ug/mL)	Glucoprotamina (%) CIM / CFM
<i>C. parapsilosis</i>	29	2846 / 2853	<0.0005 / <0.0005
<i>C. tropicalis</i>	1	5450 / 5330	<0.0005 / <0.0005
<i>M.guilliermondii</i>	18	2868 / 4238	<0.0005 / <0.0005
<i>C. lusitaniae</i>	16	2978 / 3451	<0.0005 / <0.0005



**Figura.** Constituintes químicos do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* obtidos por meio da Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrofotometria de Massa

O óleo essencial *C. citratus* é constituído por alfa e beta-citral, o citral é considerado por diversos autores como o constituinte majoritário desse óleo essencial<sup>15-17</sup>, estando as propriedades antimicrobianas desta espécie vegetal relacionadas com a presença deste composto. A literatura demonstra que o percentual do citral é variável, podendo ser encontrados dados que oscilam entre 40.05% e 80%<sup>17,16</sup>. Em nosso estudo, o  $\alpha$ -citral,

compreendeu 37,10% da totalidade do óleo essencial, percentual que se enquadra nos valores observados nos demais estudos<sup>17,16</sup>.

Espécies de *Candida* estão entre os patógenos mais notificados dentre os agentes etiológicos de infecções de corrente sanguínea em pacientes hospitalizados<sup>18</sup>, assim, estudos que busquem otimizar a higienização e a promoção de novos produtos com atividade antifúngica, tornam-se



imprescindíveis no controle da contaminação microbiana na tentativa de reduzir as taxas de infecção exógena por *Candida* spp.

A inserção de novos compostos antimicrobianos que se enquadrem como desinfetantes para uso hospitalar é complexa, pois, deve contemplar uma série de requisitos de modo a não comprometer a segurança dos pacientes e profissionais da saúde<sup>3</sup>. Assim, a proposta de estabelecer o OE de *C. citratus* como antifúngico deve-se as suas características de ser um produto natural, de fácil acesso e utilização.

## CONCLUSÃO

O composto à base de glucoprotamina utilizado no hospital de estudo apresenta atividade anti-*Candida* nas concentrações testadas, do mesmo modo que o óleo essencial de *C. citratus*, que apresentou como compostos majoritários o alfa-citral, beta-citral e beta-mirceno, podendo ser utilizado na descontaminação de leveduras de superfícies hospitalares.

## AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio. Baseada na tese da autora, Carolina Lambrecht Gonçalves, apresentada no ano de 2019 ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Pelotas.

## REFERÊNCIAS

1. Nogueira PSF, Moura ERF, Costa MMF, Monteiro WMS, Brondi L. Perfil da Infecção Hospitalar em um Hospital Universitário. *Rev enferm UERJ*. 2009;17(1):96-101. Disponível em: <http://files.bvs.br/upload/S/0104-3552/2009/v17n1/a017.pdf>
2. Collins AS. Preventing health care-associated infections. In: Hughes RG, editor. *Patient safety and quality: An evidence-based handbook for nurses*. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US); 2008 Apr. Chapter 41.
3. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Segurança do paciente em serviços de saúde: limpeza e desinfecção de superfícies; 2012.120p.
4. Zeitler B, Rapp I. Surface-dried viruses can resist glucoprotamin-ased disinfection. *Appl Environ Microbiol*. 2014;80(23):7169-75. <https://doi.org/10.1128/AEM.02462-14>
5. Genz TB, Callai T, Schlesener VRF, Oliveira CF, Renner JDP. Eficácia antibacteriana de algentes de limpeza na desinfecção de superfícies de consultórios odontológicos. *RFO UPF (Online)*. 2017;22(2):162-6. <https://doi.org/10.5335/rfo.v22i2.6781>
6. Tyski S, Grzybowski W, Grzeszczuk S, Leszczynski P, Staniszewska M, Röhm-Rodowald E et al. Antimicrobial activity of Glucoprotamin-containing disinfectants. *Pol J Microbiol*. 2009; 58 (4): 347-53.
7. Sá Silva F, Ferreira TM, Teodoro GR, Costa ACBP, Maria A, Beltrame Junior M et al. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* frente a cepas de *Candida albicans* e *Candida tropicalis* isoladas de infecções nosocomiais. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2009;68:434-41. Disponível em: [http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/rial/2000/rial68\\_3\\_completa/1241.pdf](http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/rial/2000/rial68_3_completa/1241.pdf)
8. Brasil. Farmacopeia Brasileira / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 5.ed. Brasília (DF): Anvisa; 2010. 546 p.
9. Irinyi L, Lackner M, De Hoog S, Meyer W. DNA barcoding of fungica using infections in humans and animals. *Fungal Biol*. 2016;125(2):125-36. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.04.007>
10. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. 4th Informational Supplement. CLSI document M27-S4. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
11. Widmer AE, Frei R. Antimicrobial activity of glucoprotamina: a clinical study of a new disinfectant for instruments. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2003;24(10):762-4. <https://doi.org/10.1086/502128>
12. Cechinel Filho V, Yunes RA. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Quím Nova*. 1998;21(1):99-105. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40421998000100015>

13. Singh BR, Singh V, Singh RK, Ebibeni N. Antimicrobial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against microbes of environmental, clinical and food origin. *Int Res J Pharm Pharmacol*. 2011;1(9):228-36. Disponível em: <https://www.interesjournals.org/articles/antimicrobial-activity-of-lemongrass-cymbopogon-citratus-oil-against-microbes-of-environmental-clinical-and-food-origin.pdf>
14. Mathew TK, Aswathy PG, Surya NK, Honey M, Kuriakose J. Study on disinfectant potential of lemon grass oil against common pathogens. *Int J Adv Res*. 2016;4(7): 675-9. <http://dx.doi.org/10.21474/IJAR01/926>
15. Tyagi AK, Malik SA. Liquid and vapour-phase antifungal activities of selected essential oils against *Candida albicans*: microscopic observations and chemical characterization of *Cymbopogon citratus*. *BMC Complement Altern Med*. 2010;10:65. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-10-65>
16. Khan MSA, Ahmad I. *In vitro* antifungal, anti-elastase and anti-keratinase activity of essential oils of *Cinnamomum*-, *Syzygium*- and *Cymbopogon* species against *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum*. *Phytomedicine*. 2011; 19 (1):48–55. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.07.005>
17. Miron D, Battisti F, Silva FK, Lana AD, Pippi B, Casanova B et al. Antifungal activity and mechanism of action of monoterpenes against dermatophytes and yeasts. *Rev Bras Farmacogn*. 2014;24(6):660-7. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.10.014>
18. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Boletim Informativo. Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº14; 2015.



# Fatores de risco para doenças cardiovasculares e ingestão dietética em mulheres climatéricas não usuárias de Terapia de Reposição Hormonal (TRH)

## Risk factors for cardiovascular diseases and dietary intake in the climacteric women not users of Hormone Replacement Therapy (HRT)

RIALA6/1781

Bruna Aparecida Ribeiro REL, Caroline de Maman OLDRA, Maiara FRIGO, Eloá Angélica KOEHNLEIN\*

\*Endereço para correspondência: Universidade Federal da Fronteira Sul – *campus* Realeza. Avenida Edmundo Gaievski, 1000, Acesso Rodovia PR 182, Km 466, Realeza, PR, Brasil, CEP: 85770-000, Caixa Postal: 253. Tel: 46 3543 8300. E-mail: [eloa.koehnlein@uffs.edu.br](mailto:eloa.koehnlein@uffs.edu.br)

Recebido: 03.07.2019 - Aceito para publicação: 04.10.2019

### RESUMO

Neste trabalho foram avaliados os fatores de risco para doenças cardiovasculares (DCV) e o consumo alimentar de mulheres climatéricas não usuárias de terapia de reposição hormonal (TRH), de acordo com os períodos climatéricos. Trata-se de um estudo transversal em 95 mulheres climatéricas residentes em três municípios do Sudoeste do Paraná. Foram coletados dados sociodemográficos e clínicos por meio de entrevista, além de dados antropométricos e de consumo alimentar. A média etária foi de  $52,5 \pm 5,85$  anos, 77,9% estudaram 8 ou mais anos, 76,8% possuíam renda familiar de até três salários mínimos, 70,5% possuíam cônjuge e 60% não tiveram nenhum ou até dois partos. Foi observada frequência de excesso de peso e de risco para doenças cardiovasculares em mais de 65% das mulheres. A presença de comorbidades ( $p = <0,001$ ) foi mais frequentes nas mulheres pós-menopáusicas. Quanto à ingestão de lipídios e ácidos graxos saturados, observou-se maior consumo excessivo nas pré- e peri-menopáusicas ( $p = 0,042$  e  $p = 0,022$ , respectivamente). Os achados do estudo demonstram a importância da prevenção de DCV independentemente do período climatérico e da utilização de TRH.

**Palavras-chave.** menopausa, circunferência da cintura, dieta, excesso de peso.

### ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the risk factors for cardiovascular diseases (CVD) and the dietary intake in climacteric women not using hormone replacement therapy (HRT), according to the climacteric periods. This is a cross-sectional study involving 95 climacteric women living in three municipalities located in the Southwest region of Parana. Socio-demographic and clinical data were collected by interviews, in addition to the anthropometric data and on the food consumption. The mean age was  $52.5 \pm 5.85$  years, 77.9% studied for eight years or more, 76.8% had a family income of up to three minimum wages, 70.5% had a spouse, and 60% did not have any or up to two deliveries. Frequencies of overweight and risk for cardiovascular disease were observed in more than 65% of women. The occurrence of comorbidities ( $p = 0.001$ ) was more frequent in postmenopausal women. With regard to the lipids and saturated fatty acids intake, a higher consumption in the pre- and peri-menopausal periods ( $p = 0.042$  and  $p = 0.022$  respectively). These findings demonstrate the importance of preventing CVD, independently of the climacteric period and the use of HRT.

**Keywords.** menopause, waist circumference, diet, overweight.

## INTRODUÇÃO

O período compreendido entre os 40 e 65 anos corresponde a fase denominada de climatério. Esse período é caracterizado pela mudança no perfil de produção dos hormônios ovarianos – estrogênio e progesterona – resultando em uma série de mudanças clínicas, com sintomas físicos e psicológicos como: suores noturnos; ondas de calor no tórax, pescoço e face; problemas cardiovasculares; irritabilidade; falhas de memória; ansiedade e depressão<sup>1-3</sup>.

O período climatérico pode ser subdividido em pré menopáusico, perimenopáusico e pós-menopáusico. Aproximadamente aos 40 anos tem-se início a pré-menopausa, na qual as mulheres ainda apresentam os ciclos menstruais regulares, enquanto a perimenopausa compreende os dois anos que antecedem a última menstruação e perdura até um ano após, com a ocorrência da irregularidade nos ciclos menstruais e alteração nos padrões hormonais, sendo que a pós-menopausa tem início após decorrido um ano do último ciclo menstrual<sup>4</sup>.

As mudanças clínicas características desse período possuem como medida de controle a utilização de Terapia de Reposição Hormonal (TRH), mas essa conduta ainda não é consenso, tendo em vista a dissonância dos resultados obtidos quando esta é averiguada<sup>5,6</sup>.

Além da TRH, o tratamento nutricional é uma importante ferramenta para minimizar os sintomas do climatério e auxiliar na diminuição de riscos adicionais que as mulheres nesse período estão susceptíveis como osteoporose, estresse oxidativo e doenças cardiovasculares. Os micronutrientes atuam na manutenção da saúde e do bem-estar das mulheres climatéricas em associação com uma ingestão energética que supra as necessidades nutricionais<sup>7-10</sup>.

De acordo com a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), as doenças cardiovasculares são elencadas como a principal causa de morte no mundo. Alguns fatores de risco modificáveis destacam-se como preditores de DCV: a ingestão excessiva de bebidas alcoólicas, o tabagismo, a prática insuficiente de atividade física, a história familiar, a idade, o estresse e o consumo de alimentos

que contenham uma grande quantidade de gordura em sua composição, bem como aqueles com alta densidade energética<sup>11,12</sup>.

As DCV fazem parte do grupo das Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT), sendo acompanhadas de outras patologias como a diabetes *mellitus* e a obesidade. Além disso, o excesso de peso também constitui um dos fatores de risco para DCNT. A frequência de excesso de peso é semelhante em homens e mulheres até os 40 anos, mas a partir dos 40 até os 65 anos a prevalência passa a ser duas vezes maior para as mulheres em relação ao sexo oposto<sup>1</sup>.

O risco de desenvolvimento de DCV – a exemplo da doença coronária e da hipertensão arterial sistêmica – no período reprodutivo é menor quando comparado à menopausa<sup>12</sup>. No entanto, investigações sobre a prevalência de síndrome metabólica na pós-menopausa têm demonstrado alterações na pressão arterial, circunferência da cintura, metabolismo das lipoproteínas e glicose<sup>13</sup>.

Ainda, a frequência de excesso de peso nas mulheres climatéricas aponta valores expressivos, revelando a necessidade de estudos e intervenções com este público<sup>14-19</sup>.

Destarte, levando em consideração os poucos estudos brasileiros realizados com mulheres climatéricas não usuárias de TRH, a ocorrência do climatério em plena vida produtiva da mulher, que compromete a qualidade de vida destas, o presente estudo teve como objetivo identificar fatores de risco para DCV e consumo alimentar de mulheres climatéricas não usuárias de TRH, considerando os diferentes períodos do climatério.

## MATERIAL E MÉTODOS

Estudo de caráter transversal com utilização de dados primários de natureza quantitativa, realizado no período de 2015 e 2016, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos sob o CAAE N° 48152115.1.0000.5564, com aplicação de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Mulheres com idade entre 40 e 65 anos, domiciliadas em três municípios do Sudoeste do Paraná, que buscaram atendimento nutricional ou ginecológico nas Estratégias Saúde da Família (ESF) foram selecionadas por

conveniência. Foram excluídas da pesquisa as mulheres que faziam uso de Terapia de Reposição Hormonal (TRH).

Para realização da pesquisa foram coletados dados sociodemográficos, clínicos, antropométricos e dietéticos a partir de um questionário previamente elaborado pelas autoras.

Inicialmente foram coletados os dados referentes a idade, escolaridade, renda, situação conjugal, características do ciclo menstrual, número de gestações, comorbidades presentes, tipo e frequência de prática de atividade física e tabagismo. Para a avaliação do nível de atividade física foram utilizadas as recomendações da Organização Mundial de Saúde<sup>20</sup>, sendo consideradas sedentárias e pouco ativas as pessoas que não praticavam atividade física ou praticavam até 150 minutos semanais, sendo consideradas ativas as que praticavam acima dessa faixa de tempo.

Para avaliação antropométrica foram coletadas as medidas da estatura (m), do peso corporal (kg) e da Circunferência da Cintura – CC (cm)<sup>21</sup>. Para aferição da estatura foi utilizado um estadiômetro portátil com capacidade de até 2 metros, com escala de 0,5 centímetros. Para verificação do peso foi utilizada uma balança antropométrica digital com capacidade máxima de 200 quilos da marca Marte<sup>®</sup>. Já para medir a CC foi utilizada uma fita antropométrica inelástica Cescorf<sup>®</sup>.

Os dados de estatura e peso foram empregados para cálculo do Índice de Massa Corporal (IMC), utilizado para realização do diagnóstico nutricional que foi classificado segundo os pontos de corte definidos pela Organização Mundial da Saúde<sup>22</sup>, no caso das mulheres adultas até os 59 anos e de acordo com a classificação de Lipschitz<sup>23</sup> para mulheres idosas com faixa etária igual ou superior a 60 anos.

A CC foi utilizada para verificação do Risco de Doença Cardiovascular (RDCV) com o ponto de corte > 80cm<sup>22</sup> como preditor de risco.

Para verificação do consumo alimentar foi aplicado um Diário Alimentar de Três Dias<sup>24</sup>, preenchido pelas entrevistadas durante dois dias da semana não consecutivos e um dia de final de semana, sendo conferidos e revisados pelas autoras

no ato do recolhimento do mesmo. Os dados preenchidos em medidas caseiras foram convertidos pelas autoras em gramas ou mililitros<sup>25,26</sup>. Os valores de energia (kcal), carboidratos (%), proteínas (%), lipídios (%), ácidos graxos saturados – AGS – (%), ácidos graxos monoinsaturados – AGM – (%), ácidos graxos poli-insaturados – AGP – (%), colesterol (mg), fibras (g), cálcio (mg), zinco (mg), vitamina A (mcg) e vitamina C (mg) foram calculados pelo software Nutrilife<sup>®</sup>. Os valores de selênio (mcg) foram quantificados a partir de uma tabela de composição de alimentos<sup>27</sup>. Ressalta-se que a vitamina A, a vitamina C, o zinco e o selênio foram avaliados por serem micronutrientes com atividade antioxidante.

A partir dos valores de ingestão de nutrientes obtidos dos 3 dias descritos foi realizado o cálculo da média, sendo esta comparada com as recomendações do Instituto de Medicina<sup>28-31</sup>, com exceção dos valores de ácidos graxos (AGS, AGM e AGP) que foram comparados com os valores da Sociedade Brasileira de Cardiologia<sup>32</sup>, uma vez que não há recomendação específica para esse grupo<sup>12</sup>.

Utilizou-se estatística descritiva para apresentação dos dados obtidos, sendo os mesmos analisados de acordo como o período do climatério. As diferenças entre as proporções dos dados sociodemográficos, clínicos, estado nutricional, risco de doença cardiovascular e estilo de vida foram avaliadas pelo teste de Fisher, enquanto as diferenças entre as médias de ingestão de nutrientes foram avaliadas pelo teste T não pareado. Para todas as análises utilizou-se o programa *GraphPad Prism*, versão 5, sendo consideradas significantes quando  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

A média de idade apresentada pelas mulheres avaliadas foi de  $52,5 \pm 5,85$  anos. As características sociodemográficas e clínicas da população avaliada podem ser visualizadas na **Tabela 1**. A maior parte das mulheres avaliadas estava na faixa dos 51 aos 65 anos (63,1%), apresentaram 8 ou mais anos de estudo (77,9%), possuíam renda familiar de até 3 salários mínimos (76,8%), possuíam cônjuge (70,5%) e relataram histórico de não ter tido parto ou tido até dois partos (60%).



**Tabela 1.** Características sociodemográficas e clínicas de mulheres adultas e idosas não usuárias de TRH de acordo com o período do climatério

Características	Total N (%)	Pré e perimenopáusicas N (%)	Pós-menopáusicas N (%)	Valor de p*
<b>Idade (anos)</b>				
40-50	35 (36,9)	28 (71,8)	7 (12,5)	<0,0001**
51-65	60 (63,1)	11 (28,2)	49 (87,5)	
<b>Escolaridade</b>				
Menos de 8 anos de estudo	21 (22,1)	7 (18)	14 (25)	0,461
8 ou mais anos de estudo	71 (77,9)	32 (82)	42 (75)	
<b>Renda Familiar</b>				
Até 3 salários	73 (76,8)	27 (69,2)	47 (83,9)	0,130
4 ou mais salários	22 (23,2)	12 (30,8)	9 (16,1)	
<b>Situação Conjugal</b>				
Sem cônjuge	28 (29,5)	7 (17,9)	21 (37,5)	0,043**
Com cônjuge	67 (70,5)	32 (82,1)	35 (62,5)	
<b>Paridade</b>				
Nulipara, um ou dois partos	57 (60)	27 (69,2)	30 (53,6)	0,141
Três ou mais partos	38 (40)	12 (30,8)	26 (46,4)	

\*Teste de Fisher. \*\* Valor de *p* significativo, revelando diferença entre as colunas

Ao analisar as características sociodemográficas e clínicas de acordo com o período do climatério, foi possível visualizar que a maioria das mulheres pré e perimenopáusicas eram mais jovens em comparação com as pós-menopáusicas, que demonstraram valores de idade mais avançados ( $p = <0,0001$ ). Também observou-se uma maior frequência de mulheres pré e perimenopáusicas com cônjuge em relação as pós ( $p = 0,043$ ). Para as demais

variáveis – escolaridade, renda familiar e paridade – não observou-se diferença estatisticamente significativa entre os diferentes períodos do climatério.

Na **Tabela 2** estão discriminados o estado nutricional, o risco de doenças cardiovasculares (RDCV), a presença de comorbidades e o estilo de vida, caracterizados de acordo com o período climatérico.

**Tabela 2.** Estado nutricional, risco de doença cardiovascular e estilo de vida em mulheres climatéricas não usuárias de TRH de acordo com o período climatérico

Características	Frequência N (%)	Pré e perimenopáusicas N (%)	Pós menopáusicas N (%)	Valor de p*
<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>				
Eutrofia	30 (31,6)	13 (43,3)	17 (56,7)	0,001**
Excesso de peso	65 (68,4)	26 (40)	39 (60)	
<b>RDCV (cm)</b>				
Sem risco de DCV	31 (32,6)	14 (45,2)	17 (54,8)	0,658
Com risco	64 (67,4)	25 (39,1)	39 (60,9)	
<b>Comorbidades presentes</b>				
Ausência	57 (60)	33 (57,9)	24 (42,1)	<0,0001**
Presença	38 (40)	6 (15,8)	32 (84,2)	
<b>Nível de AF</b>				
Sedentário e pouco ativo	66 (69,5)	27 (40,9)	39 (59,1)	1,000
Ativo	29 (30,5)	12 (41,4)	17 (58,6)	
<b>Tabagismo</b>				
Sim	5 (5,3)	1 (20)	4 (80)	0,645
Não	90 (94,7)	38 (42,2)	52 (57,8)	

IMC: Índice de Massa Muscular. RDCV: Risco de Doença Cardiovascular. DCV: Doença Cardiovascular. AF: Atividade Física. \*Teste de Fisher. \*\* Valor de *p* significativo, revelando diferença entre as colunas

A frequência de excesso de peso foi observada em 68,4% da amostra, independente da fase do climatério em que as participantes se encontravam, sendo 40% nas pré e peri e 60% nas pós. Da mesma forma, a avaliação do RDCV, identificado pela CC, foi elevado em ambos os grupos, sendo de 39,1% nas pré e peri e 60,9% nas pós-menopáusicas.

A presença de comorbidades – como diabetes *mellitus*, hipertensão arterial sistêmica, dislipidemias e doenças cardiovasculares – foi significativamente maior no grupo das mulheres pós menopáusicas (84,2%) em comparação com o grupo das pré e perimenopáusicas (15,8%) ( $p < 0,0001$ ).

A avaliação dos fatores de risco para DCV demonstrou que com relação a prática de atividade física, as mulheres caracterizadas como sedentárias ou pouco ativas totalizaram 69,5% da amostra, sendo que ambos os grupos apresentaram este padrão de nível de atividade física. Com relação ao tabagismo, o perfil que predominou foi o de não fumantes, totalizando 94,7% das avaliadas.

Na **Tabela 3** estão descritas a avaliação de macronutrientes e fibras ingeridas pelas participantes, bem como da média de ingestão das pré e perimenopáusicas em comparação com a do grupo das pós-menopáusicas.

**Tabela 3.** Ingestão de macronutrientes e fibras por mulheres adultas e idosas de acordo com o período do climatério

Energia/ macronutrientes/fibras	Avaliação da ingestão ♦	Total N (%)	Pré e Perimenopausa N (%)	Pós menopausa N (%)	Valor de $p^*$
<b>Energia (Kcal)</b>	<b>Média ± DP</b>		<b>1505,97 ± 355,13</b>	<b>1454,86 ± 424,68</b>	<b>0,539</b>
	Insuficiente	52 (54,8)	23 (44,2)	29 (55,8)	
	Adequado	18 (18,9)	6 (33,3)	12 (66,7)	
	Excessivo	25 (26,3)	10 (40)	15 (60)	
<b>Carboidrato (%)</b>	<b>Média ± DP</b>		<b>52,31 ± 6,85</b>	<b>55,43 ± 7,61</b>	<b>0,043**</b>
	Insuficiente	14 (14,7)	7 (50)	7 (50)	
	Adequado	74 (77,9)	32 (43,2)	42 (56,8)	
	Excessivo	7 (7,4)	0 (0)	7 (100)	
<b>Proteína (%)</b>	<b>Média ± DP</b>		<b>19,25 ± 3,84</b>	<b>18,30 ± 3,93</b>	<b>0,247</b>
	Insuficiente	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
	Adequado	95 (100)	39 (41,1)	56 (58,9)	
	Excessivo	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
<b>Lipídio (%)</b>	<b>Média ± DP</b>		<b>29,90 ± 10,14</b>	<b>26,45 ± 6,21</b>	<b>0,042**</b>
	Insuficiente	10 (10,5)	3 (30)	7 (70)	
	Adequado	76 (80)	31 (40,8)	45 (59,2)	
	Excessivo	9 (9,5)	5 (55,6)	4 (44,4)	
<b>Ácido graxo saturado (%)</b>	<b>Média ± DP</b>		<b>10,30 ± 3,10</b>	<b>9,03 ± 2,24</b>	<b>0,022**</b>
	Insuficiente	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
	Adequado	59 (62,1)	18 (30,5)	41 (69,5)	
	Excessivo	36 (37,9)	21 (58,3)	15 (41,7)	
<b>Ácido graxo monoinsaturado (%)</b>	<b>Média ± DP</b>		<b>8,59 ± 2,78</b>	<b>7,73 ± 2,20</b>	<b>0,093</b>
	Insuficiente	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
	Adequado	95 (100)	39 (41,1)	56 (58,9)	
	Excessivo	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
<b>Ácido graxo poli-insaturado (%)</b>	<b>Média ± DP</b>		<b>4,96 ± 1,85</b>	<b>5,12 ± 2,10</b>	<b>0,700</b>
	Insuficiente	54 (56,8)	24 (44,4)	30 (55,6)	
	Adequado	38 (40)	14 (36,8)	24 (63,2)	
	Excessivo	3 (3,2)	1 (33,3)	2 (66,7)	

Continua na página 6/12

Continuação

Energia/ macronutrientes/fibras	Avaliação da ingestão ♦	Total N (%)	Pré e Perimenopausa N (%)	Pós menopausa N (%)	Valor de p*
<b>Colesterol (mg)</b>	<b>Média ± DP</b>		<b>228,38 ± 83,15</b>	<b>217,60 ± 109,94</b>	<b>0,605</b>
<b>Fibras (g)</b>	<b>Média ± DP</b>		<b>15,99 ± 6,26</b>	<b>15,33 ± 5,90</b>	<b>0,600</b>
	Insuficiente	84 (88,4)	36 (42,9)	48 (57,1)	
	Adequado	11 (11,6)	3 (27,3)	8 (72,7)	
	Excessivo	0 (0)	0 (0)	0 (0)	

♦De acordo com a recomendação da IOM (2002, 2002/2005) e SBC (2017). \*Teste T. \*\* Valor de p significativo

Foi possível verificar elevada frequência de ingestão energética, de AGP e de fibras de forma insuficiente (54,8%, 56,8% e 88,4% respectivamente), enquanto os carboidratos, os lipídios e os AGS demonstraram uma ingestão com padrão mais adequado, 77,9%, 80% e 62,1% respectivamente. No que diz respeito a média de ingestão, os carboidratos, os lipídios e os AGS apresentaram diferença estatística significativa ( $p = 0,043$ ,  $p = 0,042$  e  $p = 0,022$  respectivamente). As ingestões de proteínas e AGM apresentaram-se dentro dos parâmetros recomendados (100%). A ingestão média de colesterol foi similar entre os dois grupos avaliados. Ainda, as fibras revelaram valor de consumo insuficiente (88,4%).

A **Tabela 4** apresenta a descrição da avaliação dos micronutrientes ingeridos pelas participantes, bem como da média de consumo das pré e perimenopáusicas em comparação com a do grupo das pós-menopáusicas. A ingestão média do mineral cálcio foi insuficiente na maioria da amostra estudada (93,68%), de acordo com o recomendado. Já no tangente aos elementos antioxidantes avaliados, verificou-se elevada frequência de ingestão insuficiente de vitamina A (96,8%). Para os minerais zinco e selênio verificou-se ingestão dentro do adequado (85,3% e 93,7% respectivamente), bem como de vitamina C (65,3%).

**Tabela 4.** Ingestão de micronutrientes por mulheres adultas e idosas de acordo com o período do climatério

Micronutrientes	Avaliação da ingestão*	Total N (%)	Pré e Perimenopausa N (%)	Pós menopausa N (%)	Valor de p**
<b>Cálcio (mg)</b>	<b>Média ± DP</b>		<b>518,32 ± 234,54</b>	<b>463,13 ± 223,17</b>	<b>0,248</b>
	Insuficiente	89 (93,68)	35 (39,33)	54 (60,67)	
	Adequado	6 (6,32)	4 (66,67)	2 (33,33)	
	Excessivo	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
<b>Zinco (mg)</b>	<b>Média ± DP</b>		<b>11,01 ± 3,85</b>	<b>11,43 ± 6,26</b>	<b>0,706</b>
	Insuficiente	14 (14,7)	4 (28,6)	10 (71,4)	
	Adequado	81 (85,3)	35 (43,2)	46 (56,8)	
	Excessivo	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
<b>Selênio (mcg)</b>	<b>Média ± DP</b>		<b>89,08 ± 31,58</b>	<b>83,13 ± 30,65</b>	<b>0,360</b>
	Insuficiente	6 (6,3)	1 (16,7)	5 (83,3)	
	Adequado	89 (93,7)	38 (42,7)	51 (57,3)	
	Excessivo	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
<b>Vitamina A (mcg)</b>	<b>Média ± DP</b>		<b>170,63 ± 111,05</b>	<b>165,14 ± 132,48</b>	<b>0,832</b>
	Insuficiente	92 (96,8)	38 (41,3)	54 (58,7)	
	Adequado	3 (3,2)	1 (33,3)	2 (66,7)	
	Excessivo	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
<b>Vitamina C (mg)</b>	<b>Média ± DP</b>		<b>101,26 ± 81,93</b>	<b>89,86 ± 63,75</b>	<b>0,448</b>
	Insuficiente	33 (34,7)	11 (33,3)	22 (66,7)	
	Adequado	62 (65,3)	28 (45,2)	34 (54,8)	
	Excessivo	0 (0)	0 (0)	0 (0)	

\*De acordo com a recomendação da IOM (2002, 2002/2005). \*\*Teste T

## DISCUSSÃO

Estudos anteriores realizados com mulheres climatéricas não consideram as diferenciações entre os períodos do climatério<sup>14,17</sup>, assim como avaliam a alimentação de acordo com padrões de consumo<sup>16</sup>, ou ainda nutrientes de forma isolada<sup>8</sup>. O inquérito alimentar mais utilizado pelos estudos foi o Recordatório de 24 horas, que permite avaliar apenas um dia de consumo<sup>17,18,33</sup>. Dessa forma, esse estudo explorou as possíveis diferenças entre os períodos climatéricos, bem como apresentou um consumo alimentar mais detalhado em relação aos macronutrientes e micronutrientes.

A avaliação de fatores de risco para DCV em mulheres climatéricas não usuárias de TRH, levando em consideração o período climatérico, bem como a avaliação da ingestão dos tipos de lipídios dietéticos e de micronutrientes – com atividade antioxidante – é escassa na literatura internacional e nacional.

O período do climatério engloba as três fases – pré, peri e pós-menopáusicas – em que é esperado que as mulheres pré e peri sejam mais jovens em comparação as pós, bem como as pós apresentem um valor maior de patologias decorrentes da senescência, sendo estas hipóteses condizentes com os resultados encontrados na pesquisa. O mesmo resultado foi encontrado no estudo de Rossi et al<sup>34</sup>, no qual a média das pré menopáusicas foi de 45,3 anos, enquanto das pós-menopáusicas foi de 56,6 anos.

Figueiredo Neto et al<sup>35</sup> realizaram um estudo transversal com 323 mulheres climatéricas, em um ambulatório de ginecologia de um hospital público terciário, que não faziam uso de TRH e as dividiram em dois grupos: pré e pós-menopáusicas. Em seu estudo verificaram que a síndrome metabólica teve associação com a faixa etária da mulher climatérica, sendo mais prevalente nas mais velhas. Da mesma forma, no presente estudo as comorbidades revelaram-se mais presentes nas participantes mais velhas. Dessa forma, destaca-se a necessidade de medidas preventivas na pré e perimenopausa.

A frequência de fatores de risco para doenças cardiovasculares, especialmente o excesso de peso, a inatividade física e a presença de comorbidades é elevada nesse período da vida da mulher. Gravena et al<sup>14</sup> avaliaram 456 mulheres pós-menopáusicas no município de Maringá-PR em uso ou não de TRH,

enquanto Nosse et al<sup>19</sup> avaliaram 31 mulheres climatéricas atendidas em uma Clínica-Escola de Nutrição da Universidade Cruzeiro do Sul-SP. O primeiro trabalho revelou que 72,6% das mulheres apresentavam excesso de peso<sup>14</sup>, similar a frequência observada nesse estudo (68,4%) e inferior ao encontrado por Nosse et al<sup>19</sup> (84,1%).

No estudo de Gravena et al<sup>14</sup> a inatividade física foi verificada em 71,7%, valor próximo dos 69,5% visualizados no presente trabalho. Já com relação a presença de comorbidades, esta foi verificada de forma expressiva (76,1%)<sup>14</sup>, enquanto no presente trabalho foram encontradas comorbidades em uma parcela menor da população (40%).

O trabalho de França et al<sup>36</sup> avaliou por meio de um estudo transversal os dados de 157 mulheres pós-menopáusicas, atendidas no Ambulatório de Saúde da Mulher no Climatério da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo e no Ambulatório de Ginecologia do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, de acordo com a utilização de TRH e identificou que o uso de TRH na menopausa teve associação com a prevalência de obesidade global, uma vez que esta foi mais presente nas usuárias do método. No entanto, os achados da presente pesquisa também revelaram que a presença de fatores de risco para doenças cardiovasculares é bastante elevada entre as mulheres não usuárias de TRH.

Ignacio et al<sup>37</sup> realizaram um estudo de revisão sobre a regulação da massa corpórea pelo estrogênio e pela atividade física, relatando que o hipoenestrogenismo característico da pós-menopausa, bem como o sedentarismo são fatores que contribuem para o ganho de massa corpórea, corroborando com os valores elevados tanto de inatividade física quanto de excesso de peso encontrados no presente estudo.

No que diz respeito a ingestão de nutrientes foi possível observar que com relação à ingestão de carboidratos que Nosse et al<sup>19</sup> encontraram grande percentual de mulheres com ingestão abaixo do adequado (80,6%), diferente do presente estudo em que em sua maioria as mulheres apresentaram uma ingestão adequada (77,9%) deste macronutriente. Já Molz e Poll<sup>17</sup> que avaliaram 20 mulheres menopáusicas, atendidas no Serviço Integrado de Saúde, do Curso de Medicina da Universidade

de Santa Cruz do Sul, RS verificaram que 80% das mulheres apresentaram ingestão acima do recomendado para esse nutriente. Os diferentes achados podem ser decorrentes de diferentes recomendações utilizadas. Molz e Poll<sup>17</sup>, assim como o presente estudo, utilizaram como referência a faixa de 45 a 65% de ingestão de carboidratos como adequada, enquanto Nosse et al<sup>19</sup> utilizaram de 55 a 75% como padrão de adequação.

Ainda, os dados reforçam a necessidade de trabalhar as especificidades apresentadas por indivíduos residentes em diferentes localidades do país, tendo em vista que um estudo foi realizado em São Paulo, outro no Rio Grande do Sul e o presente estudo no Paraná, bem como demonstram que ainda não foi encontrado um padrão de ingestão de carboidratos pelas mulheres climatéricas, de acordo com a literatura utilizada.

Martinazzo et al<sup>33</sup> avaliou o consumo alimentar de 30 mulheres climatéricas, atendidas em um ambulatório de especialidades em Nutrição no norte do Rio Grande do Sul, através da aplicação de um recordatório de 24 horas. Com relação às médias de ingestão obtidas, os AGS demonstraram  $8,14 \pm 3,63\%$ <sup>33</sup>, resultado este inferior aos  $10,30 \pm 3,10\%$  apresentados pelas pré e peri e aos  $9,03 \pm 2,24\%$  das pós-menopáusicas. Da mesma forma, os AGM totalizaram uma média de  $6,47 \pm 3,40\%$ <sup>33</sup>, sendo este valor inferior aos  $8,59 \pm 2,78\%$  das pré e peri, bem como aos  $7,73 \pm 2,20\%$  das pós-menopáusicas. Já com relação aos AGP, a média observada foi de  $5,37 \pm 2,60\%$ <sup>33</sup>, revelando um valor superior aos encontrados no presente estudo, sendo  $4,96 \pm 1,85\%$  para as pré e peri e  $5,12 \pm 2,10\%$  para as mulheres na pós-menopausa. A média de ingestão de colesterol apresentada pelo grupo das pré e peri foi de  $228,38 \pm 83,15$  mg, semelhante aos  $217,60 \pm 109,94$  mg das pós, mas divergente dos  $169,50 \pm 90,15$  encontrados no estudo de Martinazzo et al<sup>33</sup>.

Os AGS são encontrados nas gorduras de origem animal e em algumas exceções de óleos vegetais (como o óleo de coco), sendo um dos principais responsáveis pela elevação do colesterol plasmático<sup>32,38</sup>. O teor mais elevado de AGS na dieta das mulheres pré e perimenopáusicas revela a importância de atenção dietética das mulheres nesse período do climatério, a fim de redução do risco de

DCV na fase da pós-menopausa. Já os AGM estão presentes em alimentos de origem vegetal como azeítonas, avelã, castanhas e abacate, por exemplo, sendo que este tipo de gordura é mais resistente à peroxidação lipídica. Dessa forma, os AGM, em detrimento dos AGS, auxiliam na redução da concentração de colesterol plasmático<sup>38</sup>. Nesse âmbito, todas as mulheres avaliadas apresentaram valores de ingestão adequados de AGM, podendo ser considerado como um fator positivo.

Os AGP, especialmente das famílias ômega 3 (correspondente ao Eicosapentaenoico – EPA –, ao Docosahexaenoico – DHA – e ao linolênico), ou ômega 6 (correspondente ao linoleico) possuem papel positivo de redução dos níveis de colesterol plasmático como os AGM<sup>32</sup>. A ingestão de AGP foi mais expressiva de forma insuficiente nas mulheres avaliadas (56,8%), demonstrando que o tipo de gordura consumido precisa ter seu perfil alterado, passando para consumos adequados de todos os tipos de ácidos graxos, sempre dando maior preferência para a escolha dos alimentos com AGM e AGP.

Em função do seu papel no aumento da saciedade, bem como da diminuição da sensação de fome e da ingestão energética, a ingestão das fibras alimentares passou a ser investigado no âmbito do tratamento e da prevenção da obesidade<sup>39</sup>. Nesse sentido é necessário ressaltar a elevada frequência de ingestão insuficiente de fibras (88,4%), bem como a elevada frequência de excesso de peso e fatores de risco para DCV nas mulheres avaliadas.

O mineral cálcio é descrito como um nutriente essencial para a realização de diversas funções biológicas, bem como a sua baixa ingestão merece maior atenção por estar relacionada com a ocorrência de doenças crônicas como a osteoporose, a hipertensão arterial e a obesidade<sup>40</sup>. No presente estudo verificou-se elevada frequência na ingestão insuficiente desse mineral (93,68%), similar ao encontrado no estudo de Molz e Poll<sup>17</sup> de 95% e superior aos 83,8% apresentados no estudo de Nosse et al<sup>19</sup>. Na avaliação da ingestão média, verificou-se  $518,32 \pm 234,54$  mg no grupo das pré e peri e  $463,13 \pm 223,17$  mg no grupo das pós, sendo estes valores inferiores aos  $549,63 \pm 315,87$  mg encontrados por Martinazzo et al<sup>33</sup>. Dessa forma,



torna-se necessário o incentivo do consumo de alimentos fonte desse nutriente, devido suas funções preventivas no organismo.

Os elementos antioxidantes estão associados com a diminuição do risco de coronariopatias, tendo em vista que populações que apresentam dietas com perfil rico em substâncias antioxidantes possuem uma incidência menor de problemas como aterosclerose coronária. Assim, acredita-se que os efeitos benéficos do consumo de frutas e verduras diariamente advém da presença de antioxidantes nestes alimentos, como as vitaminas A e C por exemplo<sup>38</sup>. A ingestão de vitamina A foi expressivamente insuficiente (96,8%), enquanto a vitamina C apresentou um perfil mais adequado de consumo (65,3%).

O zinco é um mineral que possui um papel biológico importante nos mecanismos de proteção antioxidante, sendo que quando seu consumo é insuficiente o organismo utiliza de mecanismos de ajustes no intuito de promover a homeostase e assegurar que funções dependentes desse mineral sejam mantidas<sup>41</sup>. Desta forma, destaca-se como positivo o achado de que 85,3% da população avaliada revelar uma ingestão adequada deste mineral, contribuindo para garantia das funções biológicas desempenhadas pelo mesmo.

O estudo de Silva et al<sup>42</sup> realizado em São Paulo, com 33 mulheres fisicamente ativas, com uma idade média de 40,1 anos, revelou que 76% das avaliadas tinham uma adequada ingestão de selênio. Nesse contexto, o presente estudo revelou um valor positivo de 93,7% de ingestão adequada para o mineral selênio, propiciando benefícios para a saúde das mulheres avaliadas.

Uma meta análise realizada por Jayedi et al<sup>43</sup> indica que uma dieta com elevadas propriedades antioxidantes pode minimizar o risco de mortalidade, enfatizando a necessidade da ingestão de vitaminas e minerais como vitamina A, vitamina C, zinco e selênio, através da ingestão de frutas e verduras.

Levando em consideração a predisposição ao ganho de massa corporal das mulheres pós-menopáusicas com o achado de valores expressivos deste grupo para comorbidades, associado ao fato de pertencerem a um grupo com idade mais avançada, assim como muitas destas não possuem

cônjuges que poderiam incentivar a prática de exercícios físicos, bem como a incorporação de hábitos alimentares saudáveis, torna-se evidente a necessidade de intervenções que promovam a saúde dessas mulheres através de uma alimentação adequada e de hábitos de vida saudáveis.

O tamanho amostral e sua análise em uma região do estado do Paraná, constituem as limitações desse estudo. Assim, para estudos futuros é importante ampliar o tamanho da amostra, bem como realizar análises em diferentes regiões do país, considerando suas singularidades.

## CONCLUSÃO

Diante do exposto, concluiu-se que o risco de DCV apresentou grande prevalência na amostra avaliada, acompanhado da elevada prevalência de excesso de peso e de inatividade física. Apesar dos estudos demonstrarem associação de DCV com TRH, as não usuárias também apresentaram fatores preditores que merecem atenção. Ainda, apesar de a maior idade ser fator de favorecimento para a ocorrência de DCV nas mulheres pós-menopáusicas, as mulheres pré e perimenopáusicas também carecem destaque, levando em consideração o consumo excessivo de AGS. Dessa forma, a prevenção de DCV demonstrou-se de suma importância independente do período climatérico apresentado, nas mulheres não usuárias de TRH.

Com base nos achados desse estudo torna-se evidente a necessidade de implementação de políticas públicas que capacitem os profissionais de saúde para atender as necessidades nutricionais, aspectos de seu estado de saúde global e qualidade de vida das mulheres nessa fase da vida, para que esses possam estar mais preparados para o atendimento, conhecendo as singularidades das pacientes menopáusicas.

---

## AGRADECIMENTOS

À Fundação Araucária pelo apoio financeiro, através do programa de bolsas de iniciação científica (PIBIC), edital Nº 437/UFGS/2015.

---

## REFERÊNCIAS

1. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Manual de Atenção à Mulher no Climatério/Menopausa. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2008. [acesso 2018 Jun 11]. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_atencao\\_mulher\\_climaterio.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_atencao_mulher_climaterio.pdf)
2. Rocha MDHA, Rocha PA. Do climatério à menopausa. *Rev. Cient ITPAC*. 2010;3(1):24-7. [acesso 2018 Jun 11]. Disponível em: <https://assets.itpac.br/arquivos/Revista/31/4.pdf>
3. Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia – FEBRASGO. Climatério: manual de orientação. São Paulo: 2010. [acesso 2018 Jun 12]. Disponível em: [https://www.febasgo.org.br/images/arquivos/manuais/Manuais\\_Novos/Manual\\_Climaterio.pdf](https://www.febasgo.org.br/images/arquivos/manuais/Manuais_Novos/Manual_Climaterio.pdf)
4. Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia – FEBRASGO. Anticoncepção: manual de orientação. São Paulo: Ponto; 2004. [acesso 2018 Jun 12]. Disponível em: <http://www.itarget.com.br/newclients/sggo.com.br/2008/extra/download/MANUAL-DE-ANTICONCEPCAO>
5. Grings AC, Kuhne J, Gomes AP, Jacobsen T, Cascaes AC, Lara GM. Riscos e benefícios da terapia de reposição hormonal (TRH) em mulheres na menopausa. *Rev Bras An Clin*. 2009;41(3):229-33. [acesso 2018 Jun 12]. Disponível em: [http://www.rbac.org.br/wp-content/uploads/2016/08/RBAC\\_Vol41\\_n3-Completa.pdf](http://www.rbac.org.br/wp-content/uploads/2016/08/RBAC_Vol41_n3-Completa.pdf)
6. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*. 2002;288(3):321-33. <https://dx.doi.org/10.1001/jama.288.3.321>
7. Dennehy C, Tsourounis C. A review of select vitamins and minerals used by postmenopausal women. *Maturitas*. 2010;66(4):370-80. <https://dx.doi.org/10.1016/j.maturitas.2010.06.003>
8. Lanzillotti HS, Lanzillotti RS, Trotte APR, Dias AS, Bornand B, Costa EAMM. Osteoporose em mulheres na pós-menopausa, cálcio dietético e outros fatores de risco. *Rev Nutr*. 2003;16(2):181-93. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732003000200005>
9. Silva WJM, Ferrari KB. Metabolismo mitocondrial, radicais livres e envelhecimento. *Rev Bras Geriatr Gerontol*. 2011;14(3):441-51. [acesso 2018 Jun 14]. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbgg/v14n3/v14n3a05.pdf>
10. Muniz LC, Schneider BC, Silva ICM, Matijasevich A, Santos IS. Fatores de risco comportamentais acumulados para doenças cardiovasculares no sul do Brasil. *Rev Saude Publica*. 2012;46(3):534-42. <https://doi.org/10.1590/S0034-89102012005000021>
11. Organização Pan-Americana da Saúde – OPAS. Doenças cardiovasculares; 2017. [acesso 2019 Jun 25]. Disponível em: [https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5253:doencas-cardiovasculares&Itemid=1096](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5253:doencas-cardiovasculares&Itemid=1096)
12. Sociedade Brasileira de Climatério – SOBRAC. Consenso Brasileiro Multidisciplinar de Assistência à Saúde da Mulher Climatérica. [acesso 2018 Jun 10]. Disponível em: [http://sobrac.org.br/consenso\\_brasileiro\\_de\\_th\\_da\\_menopausa\\_2018.html](http://sobrac.org.br/consenso_brasileiro_de_th_da_menopausa_2018.html)
13. Fonseca EJNC, Rocha TPO, Nogueira IAL, Melo JB, Silva BL, Lopes EJ et al. Metabolic syndrome and insulin resistance by HOMA-IR in menopause. *Int J Cardiovas Sci*. [online]. 2018;31(3):201-8. <http://dx.doi.org/10.5935/2359-4802.20180009>
14. Gravena AAF, Rocha SC, Romeiro TC, Agnolo CMD, Gil LM, Carvalho MDB et al. Sintomas climatéricos e estado nutricional de mulheres na pós-menopausa usuárias e não usuárias de terapia hormonal. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2013;35(4):178-84. <https://doi.org/10.1590/S0100-72032013000400008>
15. Orsatti FL, Nahas EAP, Nahas-Neto J, Maestá N, Padoani NP, Orsatti CL. Indicadores antropométricos e as doenças crônicas não transmissíveis em mulheres na pós-menopausa da região Sudeste do Brasil. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2008;30(4):182-9. <https://doi.org/10.1590/S0100-72032008000400005>
16. Hoffmann M, Mendez KG, Canuto R, Garcez AS, Theodoro H, Rodrigues AD et al. Padrões alimentares de mulheres no climatério em atendimento ambulatorial no sul do Brasil. *Ciênc*

- Saúde Colet. 2015;20(5):1565-74. <https://doi.org/10.1590/1413-81232015205.07942014>
17. Molz A, Poll F. Avaliação nutricional, estilo de vida e consumo alimentar relacionados com risco cardiovascular em mulheres na menopausa. *Cinergis*. 2013;14(4):186-92. [acesso 2018 Jun 20]. Disponível em: <https://online.unisc.br/seer/index.php/cinergis/article/view/4147/3511>
  18. Montilla RNG, Marucci MFN, Aldrighi JM. Avaliação do estado nutricional e do consumo alimentar de mulheres no climatério. *Rev Assoc Med Bras*. 2003;49(1):91-5. <https://doi.org/10.1590/S0104-42302003000100040>
  19. Nosse TM, Moreira SLN, Andrade KC. Avaliação dietética de mulheres climatéricas atendidas em uma clínica-escola de nutrição no município de São Paulo. *Rev Bras Ciênc Saúde*. 2009;7(21):26-31. [acesso 2018 Jun 20]. Disponível em: [http://seer.uscs.edu.br/index.php/revista\\_ciencias\\_saude/article/view/297/129](http://seer.uscs.edu.br/index.php/revista_ciencias_saude/article/view/297/129)
  20. World Health Organization – WHO. Physical activity; 2018. [acesso 2018 Jun 10]. Disponível em: <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/physical-activity>
  21. Nacif M, Viebig RF. Avaliação antropométrica no ciclo da vida: uma visão prática. 2.ed. São Paulo (SP): Metha; 2011.
  22. World Health Organization – WHO. Obesity: preventing and managing the global epidemic: report of the WHO consultation.(WHO technical report series: 894). Geneva: World Health Organization; 2000. [acesso 2018 Jun 11]. Disponível em: [http://www.who.int/nutrition/publications/obesity/WHO\\_TRS\\_894/en/](http://www.who.int/nutrition/publications/obesity/WHO_TRS_894/en/)
  23. Lipschitz DA. Screening for nutritional status in the elderly. *Prim Care*. 1994;21(1):55-67. [acesso 2018 Jun 11]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8197257>
  24. Rossi L, Caruso L, Galante A. Avaliação nutricional: novas perspectivas. São Paulo (SP): Roca; 2008.
  25. Pinheiro A, Lacerda E, Benzecry E, Gomes M, Costa V. Tabela para avaliação de consumo alimentar em medidas caseiras. 5.ed. São Paulo (SP): Atheneu; 2005.
  26. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Pesquisa de Orçamentos Familiares – POF. Tabela de medidas referidas para os alimentos consumidos no Brasil. Rio de Janeiro (RJ): IBGE; 2011. [acesso 2018 Jun 12]. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv50000.pdf>
  27. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Pesquisa de Orçamentos Familiares – POF. Tabela de composição nutricional dos alimentos consumidos no Brasil. Rio de Janeiro (RJ): IBGE; 2011. [acesso 2018 Jun 10]. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv50002.pdf>
  28. Institute of Medicine – IOM. Dietary Reference Intakes (DRIs) for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids. Washington (DC): National Academy Press; 2002/2005. [acesso 2018 Jun 17]. Disponível em: [https://www.nal.usda.gov/sites/default/files/fnic\\_uploads/energy\\_full\\_report.pdf](https://www.nal.usda.gov/sites/default/files/fnic_uploads/energy_full_report.pdf)
  29. Institute of Medicine – IOM. Dietary Reference Intakes (DRIs) for Calcium and Vitamin D. Washington (DC): National Academies Press; 2011. [acesso 2018 Jun 17]. Disponível em: <https://www.nap.edu/catalog/13050/dietary-reference-intakes-for-calcium-and-vitamin-d>
  30. Institute of Medicine – IOM. Dietary Reference Intakes (DRIs) for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. Washington (DC): National Academies Press; 2000. [acesso 2018 Jun 17]. Disponível em: <https://www.nap.edu/catalog/9810/dietary-reference-intakes-for-vitamin-c-vitamin-e-selenium-and-carotenoids>
  31. Institute of Medicine – IOM. Dietary Reference Intakes (DRIs) for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. Washington (DC): National Academies Press; 2001 [acesso 2018 Jun 17]. Disponível em: <https://www.nap.edu/catalog/10026/dietary-reference-intakes-for-vitamin-a-vitamin-k-arsenic-boron-chromium-copper-iodine-iron-manganese-molybdenum-nickel-silicon-vanadium-and-zinc>
  32. Faludi AA, Izar MCO, Saraiva JFK, Chacra APM, Bianco HT, Afune Neto A et al. Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose – 2017. *Arq Bras Cardiol*. 2017;109(2 Supl):1-76. <http://dx.doi.org/10.5935/abc.20170121>

33. Martinazzo J, Zemolin GP, Spinelli RB, Zanardo VPS, Ceni GC. Avaliação nutricional de mulheres no climatério atendidas em ambulatório de nutrição no norte do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciê Saúde Colet*. 2013;18(11):3349-56. [acesso 2018 Jun 22]. Disponível em: <http://www.redalyc.org/pdf/630/63028795024.pdf>
34. Rossi M, Janjetic M, Ferreyra M, Garaicoechea A, Matioli M, Vásquez F et al. Relación entre estado nutricional, consumo de alimentos no nutritivos y percepción de estrés em mujeres perimenopáusicas. Santiago. *Rev. Chil. Nutr.* 2018;45(2):105-11. <http://dx.doi.org/10.4067/s0717-75182018000300105>
35. Figueiredo Neto JA, Figuerêdo ED, Barbosa JB, Barbosa FF, Costa GRC, Nina VJS et al. Síndrome metabólica e menopausa: estudo transversal em ambulatório de ginecologia. *Arq Bras Cardiol*. 2010;95(3):339-45. <https://doi.org/10.1590/S0066-782X2010005000094>
36. França AP, Aldrighi JM, Marucci MFN. Fatores associados à obesidade global e à obesidade abdominal em mulheres na pós-menopausa. *Rev Bras de Saúde Matern Infant, Recife*. 2008;8(1):65-73. <https://doi.org/10.1590/S1519-38292008000100008>
37. Ignacio DL, Frankenfeld TGP, Fortunato RS, Vaisman M, Werneck-de-Castro JPS, Carvalho DP. Regulação da massa corpórea pelo estrogênio e pela atividade física. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2009;53(3):310-7. <https://doi.org/10.1590/S0004-27302009000300003>
38. Rique ABR, Soares EA, Meirelles CM. Nutrição e exercício na prevenção e controle das doenças cardiovasculares. *Rev Bras Med Esporte*. 2002;8(6):244-54. <https://doi.org/10.1590/S1517-86922002000600006>
39. Kovacs EM, Westerterp-Plantenga MS, Saris WH, Goossens I, Geurten P, Brouns F. The effect of addition of modified guar gum to a low-energy semisolid meal on appetite and body weight loss. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2001;25(3):307-15. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801546>
40. Pereira GAP, Genaro PS, Pinheiro MM, Szejnfekd VL, Martini LA. Cálcio dietético – estratégias para otimizar o consumo. *Rev Bras Reumat*. 2009;49(2):164-80. <https://doi.org/10.1590/S0482-50042009000200008>
41. Koury JC, Donangelo CM. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. *Rev Nutr*. 2003;16(4):433-41. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-52732003000400007>
42. Silva JVFP, Moreira SLN, Oliveira DC, Santos TR, Padilha HG, Stulbach T et al. Avaliação do consumo de nutrientes antioxidantes por mulheres fisicamente ativas. *Braz J Sports Nutr*. 2012;1(1):30-6. [acesso 2018 Jun 23]. Disponível em: <http://www.janainaportoalegre.com.br/wp-content/uploads/2014/08/1-Avaliacao-do-consumo-de-nutrientes-antioxidantes-por-mulheres-fisicamente-ativas.pdf>
43. Jayedi A, Rashidy-Pour A, Parohan M, Zargar MS, Shab-Bidar S. Dietary antioxidants, circulating antioxidant concentrations, total antioxidant capacity, and risk of all-cause mortality: a systematic review and dose-response meta-analysis of prospective observational studies. *Adv Nutr*. 2018;9(6):701-16. <http://dx.doi.org/10.1093/advances/nmy040>





## Avaliação das reações de Hemaglutinação Indireta (HI) e Aglutinação Modificada (MAT) na detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* em exsudatos cárneos bovinos

### Evaluation of indirect Hemagglutination (HI) and Modified Agglutination (MAT) reactions in the detection of anti-*T. gondii* IgG antibodies in bovine meat exudates

RIALA6/1766

Maria Aparecida Moraes MARCIANO<sup>1\*</sup>, Heitor Franco de ANDRADE JUNIOR<sup>2</sup>, Luciana Regina MEIRELES<sup>2</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Núcleo de Morfologia e Microscopia, Centro de Alimentos, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, Cerqueira César, São Paulo, SP, Brasil, CEP 01246-902. E-mail: [maria.marciano@ial.sp.gov.br](mailto:maria.marciano@ial.sp.gov.br)

<sup>2</sup>Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo

Recebido: 19.07.2018 - Aceito para publicação: 31.01.2019

#### RESUMO

Toxoplasmose é uma zoonose parasitária com ampla distribuição mundial provocada pelo *Toxoplasma gondii*, considerado um dos protozoários mais bem sucedidos do planeta, pois infecta cerca de um terço da população mundial. Dentre as formas de transmissão, o consumo de carne mal cozida, contendo cistos, tem sido considerado um fator de risco para aquisição desta zoonose. Uma abordagem alternativa para o controle da toxoplasmose pela ingestão de carne bovina seria a sorologia dos bovinos, já que animais soropositivos albergam cistos teciduais. Contudo, a obtenção de soro para esta avaliação, nem sempre é factível, dada a dificuldade de coleta de sangue durante a linha de abate e sua ausência em cortes comerciais. O exsudato cárneo é uma alternativa para detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em cortes comerciais de carne, que foi a proposta deste estudo para avaliar o desempenho dos testes de Hemaglutinação Indireta (HI) e Aglutinação Modificada (MAT) quando comparados ao ELISA usando exsudato cárneo. Este estudo mostrou que a acurácia dos testes de aglutinação não foi viável devido aos baixos índices de sensibilidade e especificidade quando comparados ao ELISA. Estes dados demonstram a importância da escolha de testes eficientes como ELISA para aplicação no controle da qualidade e inocuidade de cortes comerciais de carne bovina.

**Palavras-chave.** toxoplasmose, exsudato cárneo, segurança alimentar, testes de aglutinação.

#### ABSTRACT

Toxoplasmosis is a parasitic zoonosis with a wide worldwide distribution caused by *Toxoplasma gondii*, which is considered one of the most successful protozoa on the planet, since it can infect a third of the world population. Among the forms of transmission, consumption of undercooked meat has been considered as a risk factor for the acquisition of this zoonosis. An alternative approach to toxoplasmosis control by beef ingestion could be the serological diagnosis in cattle, since seropositives animals harbor tissue cysts. However, the use of serum for this evaluation is not always feasible due to the difficulty of blood collection during slaughter and its absence in commercial beef cuts. Meat exudate is an alternative for the detection of anti-*T. gondii* antibodies in commercial beef cuts, which was the propose of this study to evaluate the performance of Indirect Hemagglutination (HI) and Agglutination Modified (MAT) tests compared to ELISA using meat exudates. This study showed that the agglutination tests accuracy was not viable due to low sensitivity and specificity indexes when compared to ELISA. These data demonstrate the importance of choosing accurate tests such as ELISA for application in quality control and safety of commercial beef cuts.

**Keywords.** toxoplasmosis, meat exudate, food security, agglutination tests.



## INTRODUÇÃO

*Toxoplasma gondii* é o parasito responsável pela toxoplasmose, importante zoonose que causa infecção aguda e também infecção crônica<sup>1</sup>. O controle de *T. gondii* no ambiente é alcançado com esforços concentrados dos setores médico, veterinário e ambiental tornando-se, assim, um exemplo paradigmático do conceito de saúde única<sup>2</sup>. Devido à alta contaminação ambiental, estima-se que possam ocorrer exposições múltiplas ao longo da vida dos hospedeiros, definitivos ou intermediários, dentre eles o homem, aumentando o risco de infecção<sup>3</sup>. A importância da toxoplasmose está associada ao fato de ser cosmopolita, altamente difundida, e pela possibilidade de causar infecções graves, com lesões irreversíveis e morte<sup>4</sup>. Estima-se que um terço da população mundial humana já foi infectada por *T. gondii*<sup>5</sup>, sendo descritas prevalências de 15% a 85%, variando de acordo com o nível sócio econômico, áreas geográficas, fatores climáticos, hábitos culturais, alimentares e idade<sup>6</sup>.

Um dos principais fatores da alta prevalência dessa zoonose é a ingestão de alimentos contaminados, seja com oocistos ou cistos teciduais, que está relacionado com o nível de educação sanitária da população, o qual representa uma prática imprescindível no controle e prevenção da doença. A relevância da toxoplasmose para a saúde pública está associada ao grande número de infecções em gestantes e indivíduos imunocomprometidos como portadores do vírus HIV<sup>7</sup>. *T. gondii* apresenta várias vias de transmissão em potencial, podendo o hospedeiro entrar em contato com o agente via transplacentária, ou após o nascimento por mecanismos de transmissão horizontal<sup>3</sup>. Dentre eles, destaca-se a ingestão de cistos contidos em carnes, produtos cárneos ou consumo de vísceras de animais infectados<sup>6,8</sup>. Os cistos teciduais, presentes nos cortes comerciais de carne, apresentam tamanho variável, entre 10 a 100 µm, sendo que os cistos jovens são frequentemente pequenos, contendo somente dois bradizoítos em seu interior, enquanto os maduros podem conter milhares deles. O tamanho dos cistos também pode variar de acordo com a sua localização, sendo os encontrados no cérebro, geralmente, menores do que os localizados no músculo esquelético<sup>9</sup>.

Em condições experimentais, animais destinados ao consumo humano como bovinos, suínos, ovinos e caprinos, apresentam resposta imunológica e formação de cistos teciduais, mostrando-se susceptíveis à infecção por *T. gondii*. Em relação à infecção natural, a maioria dos animais de produção soropositivos para toxoplasmose já demonstraram albergar o parasita, na forma cística, em cortes comerciais de carne<sup>5</sup>.

Em relação aos bovinos, a ingestão de pastagens contaminadas por oocistos é a principal via de transmissão<sup>10</sup>, por isso o sistema de criação extensivo, muito comum no Brasil, favorece a infecção por *T. gondii* nessa espécie<sup>11</sup>.

Nos últimos anos, foram desenvolvidos métodos parasitológicos e moleculares para detecção de cistos de *T. gondii* na carne de diferentes espécies animais, visando o aprimoramento de medidas de controle e prevenção da toxoplasmose<sup>4</sup>, porém a aplicação destes métodos nem sempre é viável para o controle em larga escala, por apresentar avaliações analíticas longas e equipamentos e insumos específicos. Uma abordagem metodológica factível para o controle da toxoplasmose pelo consumo de carne bovina é detecção de anticorpos específicos no soro<sup>6</sup>. Contudo, a obtenção de soro para esta avaliação, nem sempre é possível, dada a dificuldade de coleta durante a linha de abate do animal em matadouros comerciais e ausência deste material em cortes comerciais já processados para comercialização. Nestes casos, o exsudato cárneo é um material biológico alternativo para detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em amostras de carne bovina<sup>12</sup>.

Com o objetivo de auxiliar no controle da qualidade da carne bovina frente à toxoplasmose, avaliou-se o desempenho dos testes de Hemaglutinação Indireta (HI) e Aglutinação Modificada (MAT), comparados ao ensaio imunoenzimático (ELISA) em exsudatos de cortes comerciais bovinos. Este trabalho permitiu determinar os índices de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo e concordância dos testes de aglutinação. Os testes de aglutinação (HI e MAT) permitem a pesquisa de imunoglobulinas específicas em laboratórios com menor infraestrutura e poderiam ser aplicado em condições

de campo, principalmente, por não exigirem o uso de equipamentos de alta complexidade, possibilitando a aplicação do exsudato cárneo como material biológico para detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em cortes comerciais de carne bovina.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para a comparação do desempenho dos testes de aglutinação na detecção de IgG anti-*T. gondii*, foram ensaiadas 89 amostras, sendo 32 reagentes e 57 não reagentes, de exsudatos cárneos de cortes comerciais de carne *in natura* adquiridas no varejo. As amostras foram previamente ensaiadas pelo ELISA, considerado método de referência para detecção de anticorpos IgG, segundo padronização de Mecca et al<sup>13</sup>, adaptado para amostras de bovinos<sup>12</sup>.

Como controles positivos e negativos das reações foram utilizados exsudatos cárneos provenientes de animais previamente infectados e não infectados confirmados pelo ELISA<sup>12</sup>.

As amostras foram processadas de acordo com o protocolo preconizado por Mecca et al<sup>13</sup>, onde os exsudatos cárneos foram diluídos em tampão Tris/HCl (10mM, pH 7,5), NH<sub>4</sub>Cl (150mM), NaNO<sub>3</sub> (1mM) e NaN<sub>3</sub> (1mM) para lise de eritrócitos e conversão da hemoglobina em um composto estável, que permitiu a mensuração da quantidade de sangue por espectrofotometria em comprimento de onda por filtro de 540 nm. Após diluição de todas as amostras numa mesma concentração de sangue, os exsudatos foram ensaiados simultaneamente nos testes de aglutinação.

### Hemaglutinação indireta (HI)

Os testes de Hemaglutinação Indireta (HI) para detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* em amostras de exsudato cárneo bovino foram realizados com o kit comercial Imuno-Hai Toxo (Wama<sup>®</sup>) seguindo as especificações do fabricante. Foram adicionados 25 µL do exsudato cárneo em placas de microtitulação descartáveis, com fundo em “V” de 96 cavidades, seguida da adição de 25 µL da suspensão de hemácias sensibilizadas com componentes de *Toxoplasma gondii*. As placas foram agitadas por vibração mecânica por 3 a 4

minutos e mantidas em repouso por 1 a 2 horas em temperatura ambiente (20°C) em bancada fixa livre de vibrações. Após esse período, foi realizada a leitura macroscópica das placas, considerando como positivas as reações que resultaram na formação de uma rede ou malha semitransparente sobre o fundo das cavidades. Por outro lado, as reações foram consideradas negativas quando houve a formação de um botão escuro, nítido, uniforme e sem halo reagente no fundo das cavidades. Foram aplicados na placa, controles positivo e negativo, constantes no kit comercial para comparação dos resultados.

### Teste de aglutinação modificada (MAT)

Para o teste de aglutinação direta modificada (MAT) foram confeccionadas placas de 96 poços de fundo em “V” (Costar<sup>®</sup>), de acordo com o protocolo descrito por Desmonts e Remington<sup>14</sup> com algumas modificações. Para a produção do antígeno, taquizoítos da cepa RH (tipo I), mantidos no Laboratório de Protozoologia do IMT-USP por inoculação em camundongos Swiss, foram filtrados do lavado peritonial e diluídos 1:1 (v/v) em solução de formaldeído 6%. Posteriormente, essa solução foi centrifugada a 600 g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensionado em solução fisiológica por mais duas vezes para limpeza e retirada dos *debris* celulares. Em seguida, os parasitas foram suspensos em tampão borato pH 8,7 e quantificados em câmara de Neubauer para ajuste da solução em concentração final de 10<sup>8</sup> taquizoítos/mL. Em seguida, foi padronizada a concentração ideal de taquizoítos a partir de diluições seriadas na base 2 partindo-se de 1/2 até 1/128 de antígeno diluído em tampão borato pH 8,2, contendo Azul de Evans. Foram testados soros bovinos conhecidamente positivos e negativos, nas diluições 1/10, 1/100 e 1/1000, previamente ensaiados por ELISA. Após a padronização, foram adicionados 25 µL das amostras de exsudatos, diluídas 1:2 em tampão Tris/HCl (10 mM, pH 7,5), NH<sub>4</sub>Cl (150 mM), NaN<sub>3</sub> (1 mM) e azida sódica (1 mM), anteriormente ensaiadas pelo ELISA, seguidos de 25 µL de tampão Borato pH 8,2, contendo 0,2% de Azul de Evans e posteriormente 50 µL do antígeno.

As placas foram homogeneizadas manualmente e mantidas em temperatura ambiente por 18 horas (20°C). A partir da leitura macroscópica do teste, foram consideradas positivas todas as reações que resultaram na formação de uma rede ou malha semitransparente sobre o fundo das cavidades. Por outro lado, as reações foram consideradas negativas quando se formou um botão escuro, nítido, uniforme e sem halo reagente no fundo.

### Análise estatística

Os índices de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos e negativos bem como os intervalos de confiança de 95% para proporções e a concordância entre os testes (índice kappa) foram estimados utilizando o programa EpiInfo 6.01., sendo a reação de ELISA considerada como teste de referência.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Hemaglutinação Indireta (HI)

Os resultados da HI apresentaram baixa concordância com os resultados do ELISA (método de referência), com baixos índices de sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivos e negativos (Tabela 1). No total de 32 amostras positivas, reagentes no ELISA, somente 5 amostras foram positivas pelo HI, apresentando, portanto, 27 amostras falso-negativas. Este fato pode estar relacionado à provável interferência na ligação das imunoglobulinas da classe IgG presentes no exsudato, podendo haver competição nos sítios de ligação do complexo antígeno anticorpo, diferentemente em ensaios com amostras de soro<sup>14</sup>.

### Teste de aglutinação modificada (MAT)

Semelhante aos resultados da hemaglutinação indireta, os resultados do MAT apresentaram baixa concordância com os resultados do ELISA (método de referência), com baixos índices de sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivos e negativos (Tabela 2). Da mesma forma que a HI, houve uma discrepância dos resultados das amostras no MAT quando comparados ao ELISA, no qual somente 07 do total de 32 amostras positivas, foram reagentes, apresentando, portanto, 25 amostras falso-negativas.

A menor sensibilidade verificada no HI em relação ao MAT, quando comparados ao ELISA, pode estar relacionada ao fato do teste comercial apresentar

quantidade específica de antígeno, padronizada para a detecção de anticorpos em amostras de soro, não sendo possível estabelecer doses padronizadas para teste em exsudatos cárneos<sup>12</sup>.

**Tabela 1.** Determinação dos índices de sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivos e negativos para a reação de HI comparada ao método de referência (ELISA) para amostras de exsudato bovino

HI	ELISA		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	05	08	13
Negativo	27	49	76
Total	32	57	89

Sensibilidade: 15.6% (I.C.95% = 5.9 – 33.5)  
Especificidade: 86.0% (I.C. 95% = 73.7 – 93.3)  
Valor Preditivo Positivo: 38.5% (I.C. 95% = 15.1 – 67.7)  
Valor Preditivo Negativo: 64.5% (I.C. 95% = 52.6 – 74.9)

**Tabela 2.** Determinação dos índices de sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivos e negativos para a reação de MAT em relação ao ELISA para amostras de exsudato bovino

MAT	ELISA		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	07	10	17
Negativo	25	47	72
Total	32	57	89

Sensibilidade: 21,9% (I.C.95% = 9,9 – 40,4)  
Especificidade: 82,5% (I.C. 95% = 69,6 – 90,0)  
Valor Preditivo Positivo: 41,2% (I.C 95% = 19,4– 66,5)  
Valor Preditivo Negativo: 65,3% (I.C 95% = 53,1 – 75,9)

Os resultados obtidos, neste trabalho, denotam que a aplicação dos testes de aglutinação para amostras de exsudato cárneo bovino foi limitada, quando comparada aos resultados do ELISA, permitindo verificar algumas particularidades que parecem estar relacionadas à espécie animal estudada, pois dados da literatura mostram que o teste de aglutinação modificado (MAT) apresentou altos valores de sensibilidade e especificidade para amostras de exsudato cárneo de coelho<sup>13</sup>. Este

tipo de problema pode ser decorrente da forma de exsanguinação do animal durante o abate, restando mais sangue na carne bovina “carne vermelha” do que na carne de coelho que apresenta coloração rósea. Além disso, a quantidade de mioglobina presente na fibra muscular da carne bovina e liberada durante o processo de ruptura da fibra muscular pelo descongelamento da carne é superior ao da carne de coelho, fator que poderia influenciar na mensuração de sangue presente no exsudato bovino pela espectrofotometria. Resultados falso negativos foram também obtidos por outros autores em ensaios com o Kit comercial PrioCHECK<sup>®</sup> Toxoplasma AB para amostras de exsudato cárneo suíno<sup>7</sup>.

Os testes de HI e MAT para bovinos apresentaram resultados favoráveis para as amostras de soro<sup>12</sup>, em infecção experimental, porém para as amostras provenientes de exsudatos de cortes comerciais, os índices obtidos foram inferiores, com baixa concordância em relação ao ELISA. Estes achados podem estar relacionados ao volume e à quantidade de proteínas totais e outros componentes do exsudato cárneo bovino, incluindo a presença de grande quantidade de material adiposo. Esta questão é plausível pelo próprio aspecto do exsudato bovino que apresenta maior número de componentes precipitados após centrifugação, além de maior quantidade de sangue e intensidade de cor vermelha. Assim, a maior quantidade de proteínas não específicas presentes nas amostras de exsudatos bovinos poderiam influenciar a reação de aglutinação dos anticorpos IgG específicos com os epítomos antigênicos do *T. gondii*, já que estas proteínas poderiam competir com os sítios de ligação do antígeno, impedindo a formação do imunocomplexo, o que explicaria os resultados falsos negativos encontrados em nossos testes de aglutinação. Outro aspecto importante, que deve ser levado em consideração, é o elevado grau de vascularização da carne bovina que permite a liberação de uma quantidade maior de sangue e exsudato cárneo, necessitando de mais diluente na solução final a ser ensaiada. Outro ponto que deve ser ressaltado é a resposta imunológica intrínseca de cada espécie em relação à infecção por *T. gondii*. Estudos relatam que os bovinos são mais resistentes à infecção pelo protozoário quando comparados a outras espécies animais, apresentando menor título de anticorpos

e menor número de cistos teciduais que as demais espécies de produção<sup>6</sup>. Alguns autores relatam que o risco de infecção por *T. gondii* pela ingestão da carne bovina pode estar associado a fatores como adulteração dos produtos cárneos bovinos, com o propósito de baratear o produto, por adição de carne de outras espécies mais contaminadas com cistos do parasito<sup>15</sup>, como por exemplo, a carne suína. Contudo, cistos teciduais de *T. gondii* foram isolados em vísceras de bovinos naturalmente infectados<sup>16</sup> e foi demonstrado que os mesmos podem permanecer viáveis por períodos superiores há três anos em coração, língua e fígado<sup>10</sup>.

Assim, é necessário enfatizar que os testes de aglutinação, utilizando o exsudato cárneo, devem ser rigorosamente padronizados e avaliados para cada espécie animal antes de serem utilizados como testes de triagem, já que podem sofrer ação inespecífica dos constituintes do exsudato como demonstrado neste trabalho para amostras de bovinos. Vale ressaltar a importância de avaliar a sensibilidade e especificidade dos métodos analíticos frente a um método de referência, garantindo resultados confiáveis.

## CONCLUSÃO

O presente estudo denota a importância do desenvolvimento de técnicas diagnósticas alternativas para amostras de alimentos, consideradas matrizes complexas. A aplicação do exsudato cárneo como material biológico é um método factível, recentemente empregado, que possibilita a otimização das análises em cortes comerciais de carne. Os resultados dos testes de aglutinação HI e MAT na detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em exsudatos cárneos bovinos provenientes de cortes comerciais revelaram baixos índices de sensibilidade e especificidade quando comparados ao ELISA que foi considerado método de referência. Quando comparados os resultados dos testes de aglutinação, o MAT apresentou uma maior sensibilidade, com um número menor de amostras falso negativas em relação ao HI, fato este que pode estar relacionado a padronização da reação, diferentemente do HI que foi aplicado um kit comercial. Apesar dos resultados obtidos neste trabalho demonstrarem a baixa sensibilidade dos métodos de HI e MAT, outros parâmetros destes testes poderão ser avaliados em



estudos futuros visando a utilização dos mesmos para detecção de imunoglobulinas específicas em exsudato cárneo. Vale ressaltar que pela primeira vez foi aplicado o exsudato cárneo em testes comerciais, sendo relevante os achados para nortear pesquisas futuras, principalmente no controle de alimentos frente a patógenos intrínsecos.

## REFERÊNCIAS

1. Assolini JP, Concato VM, Gonçalves MD, Carlotto ACM, Conchon-Costa I, Pavanelli WR et al. "Nanomedicine advances in toxoplasmosis: diagnostic, treatment, and vaccine applications". *Parasitol Res*. 2017;116(6):1603-1615. <https://dx.doi.org/10.1007/s00436-017-5458-2>
2. Djurković-Djaković O, Dupouy-Camet J, Giessen JV, Dubey JP. Toxoplasmosis: overview from a One Health perspective. *Food Waterborne Parasitol*. 2019;15:e00054. <https://dx.doi.org/10.1016/j.fawpar.2019.e00054>
3. Verma SK, Sweeny AR, Lovallo MJ, Calero-Bernal R, Kwok OC, Jiang T et al. Seroprevalence, isolation and co-infection of multiple *Toxoplasma gondii* strains in individual bobcats (*Lynx rufus*) from Mississippi, USA. *Int J Parasitol*. 2017;47(5):297-303. <https://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.12.007>
4. Hill DE, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect*. 2002;8(10):634-40. <https://dx.doi.org/10.1046/j.1469-0691.2002.00485.x>
5. Kijlstra A, Jongert E. Control of the risk of human toxoplasmosis transmitted by meat. *Int J Parasitol*. 2008;38(12):1359-70. <https://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.06.002>
6. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol*. 2000;30(12-13):1217-58. [https://dx.doi.org/10.1016/s0020-7519\(00\)00124-7](https://dx.doi.org/10.1016/s0020-7519(00)00124-7)
7. McAllister MM. A decade of discoveries in veterinary protozoology changes our concept of "subclinical" toxoplasmosis. *Vet Parasitol*. 2005;132:241-7. <https://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.07.003>
8. Tenter AM. *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(2):364-9. <https://dx.doi.org/10.1590/s0074-02762009000200033>
9. Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11(2):267-99.
10. Dubey JP, Thulliez P. Persistence of tissue cysts in edible tissues of cattle fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Am J Vet Res*. 1993;54(2):270-3.
11. Schlüter D, Däubener W, Schares G, Groß U, Pleyer U, Lüder C. Animals are key to human toxoplasmosis. *Int J Med Microbiol*. 2014;304(7):917-29. <https://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.09.002>
12. Marciano MAM. Pesquisa de IgG anti-*Toxoplasma gondii* em exsudato cárneo para monitoramento da qualidade da carne bovina. [dissertação de mestrado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2013. [resumo]. Disponível em: [http://www.imt.usp.br/wp-content/uploads/bib/Catalogo\\_Dis\\_Tes\\_IMTSP\\_v1.pdf](http://www.imt.usp.br/wp-content/uploads/bib/Catalogo_Dis_Tes_IMTSP_v1.pdf)
13. Mecca JN, Meireles LR, de Andrade Jr HF. Quality control of *Toxoplasma gondii* in meat packages: standardization of an ELISA test and its use for detection in rabbit meat cuts. *Meat Sci*. 2011;88(3):584-9. <https://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.01.016>
14. Desmonts G, Remington JS. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. *J Clin Microbiol*. 1980;11(6):562-8. <https://dx.doi.org/10.1128/JCM.11.6.562-568.1980>
15. Stelzer S, Basso W, Benavides J, Ortega-Mora LM, Maksimov P, Gethmann J et al. *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis in farm animals: risk factors and economic impact. *Food Waterborne Parasitol*. 2019;15:e00037. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2019.e00037>
16. Dubey JP. Isolation of *Toxoplasma gondii* from a naturally infected beef cow. *J Parasitol*. 1992;78(1):151-3.





# Avaliação de indicadores higienicossanitários em mortadelas fatiadas

## Evaluation of sanitary hygienic indicators in the sliced bolognas

RIALA6/1767

Jucilene Rodrigues CARDOSO<sup>1</sup>, Paula Daianny Alves Araújo FERREIRA<sup>1</sup>, Ana Paula Colares de ANDRADE<sup>2\*</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>2</sup>Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, Blocos 857 e 858, CEP: 60356-000, Fortaleza, CE. Tel: 85 3366 9750. E-mail: [apcolares@gmail.com](mailto:apcolares@gmail.com)

<sup>1</sup>Departamento de Nutrição, Centro Universitário Estácio do Ceará-Faculdade Integrada do Ceará, Fortaleza, CE

Recebido: 05.04.2018 - Aceito para publicação: 06.02.2019

### RESUMO

Os embutidos cárneos estão entre os produtos mais consumidos e comercializados e podem representar uma importante fonte de contaminação por micro-organismos patogênicos ou deteriorantes decorrentes de manipulação excessiva, do aumento da superfície de contato e pela maior exposição ao oxigênio atmosférico. Este trabalho avaliou a qualidade microbiológica de mortadelas fatiadas comercializadas em Fortaleza, CE. Foram coletadas 12 amostras de mortadelas, de diferentes marcas, em supermercados de Fortaleza, CE e estas foram fatiadas e embaladas no momento da compra. As amostras foram submetidas à avaliação microbiológica quanto à presença de coliformes termotolerantes, estafilococos coagulase positiva e presença/ausência de *Salmonella* spp. Os resultados obtidos demonstraram que todas as amostras analisadas estavam dentro dos padrões estabelecidos pela legislação brasileira. A presença de coliformes e estafilococos coagulase positiva nos alimentos, mesmo que seja em níveis inferiores aos preconizados pela legislação vigente, pode indicar condições higienicossanitárias insatisfatórias. Neste contexto, enfatiza-se a necessidade de efetuar a adoção de boas práticas em supermercados e maior fiscalização por parte dos órgãos responsáveis, com o intuito de minimizar os possíveis problemas de saúde pública.

**Palavras-chave.** qualidade dos alimentos, análise microbiológica, alimentos industrializados, embutido cárneo.

### ABSTRACT

Meat sausages are among the mostly consumed and commercialized products, and they are the important source of contamination by pathogenic or deteriorating microorganisms due to the excessive manipulation, the increased surface contact and the considerable exposure to the atmospheric contents. The objective of this study was to evaluate the microbiological quality of sliced mortadella commercialized in Fortaleza, CE. Twelve samples of mortadella from different brands were collected in supermarkets located in Fortaleza, CE, and they were sliced and packed at the time of purchase. The samples were evaluated by the microbiological analyses for detecting the occurrence of thermotolerant coliforms, coagulase positive staphylococci and presence/absence of *Salmonella* spp. The results from the present study showed that all of the analyzed samples were within the standards established by the Brazilian legislation. The occurrence of coliforms and coagulase-positive staphylococci in food, even at lower levels than those recommended by current legislation, they indicate the unsatisfactory sanitary hygienic conditions. Therefore, it is emphasized the need to adopt the good practices in supermarkets and a major supervision by the responsible agencies, in order to minimize the occurrence of possible public health problems.

**Keywords.** quality of food, microbiological analysis, food of animal origin.

## INTRODUÇÃO

A atual rotina dos consumidores requer praticidade e conveniência no preparo dos alimentos, assim esses fatores podem influenciar na escolha de produtos prontos para o consumo<sup>1</sup>.

Neste contexto, os embutidos cárneos, elaborados à base de carne e/ou miúdos comestíveis acrescidos ou não de especiarias, condimentos e submetidos à ação do calor, estão entre os produtos mais consumidos e comercializados. Nesse grupo, encontram-se mortadelas, peito de peru, salsichas e presunto cozido<sup>2</sup>.

Nos setores de fatiamento de produtos embutidos dos supermercados, observa-se falta de controle ou inspeção em relação à manipulação desse tipo de alimento. Nesse ambiente, a maior parte dos produtos vindos da indústria é fracionada em grande quantidade, o que aumenta o risco à saúde dos consumidores, devido a não adoção das boas práticas com os utensílios e equipamentos utilizados durante o fatiamento, aumento da superfície de contato do produto com o oxigênio<sup>3,4</sup>.

De acordo com Alves et al<sup>5</sup>, um importante agente de contaminação dos alimentos é o manipulador, pois os hábitos ou práticas inadequadas de higiene, podem favorecer a veiculação de micro-organismos patogênicos, tais como *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp., *Escherichia coli*, *Shigella* spp., *Listeria* spp., *Streptococcus* spp. e vírus da hepatite que podem levar a ocorrência de doenças aos consumidores.

Diante do exposto, observa-se relevância do presente estudo para os consumidores e autoridades sanitárias, visto a escassez de investigações e publicações sobre a qualidade microbiológica de embutidos fatiados e comercializados nos supermercados. Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica de mortadelas fatiadas comercializadas em Fortaleza, CE.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram adquiridas 12 amostras de mortadela na qualidade de consumidor, nos meses de julho a outubro de 2017, em supermercados da cidade de Fortaleza, CE sendo analisadas cinco marcas diferentes.

As mortadelas foram fatiadas no ato de aquisição e embaladas em bandejas de poliestireno cobertas por filme de PVC. As amostras foram transportadas em caixas isotérmicas contendo gelo ao laboratório de Microbiologia de Alimentos do Centro Universitário Estácio do Ceará para as análises microbiológicas, de acordo com os parâmetros estabelecidos pela Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001<sup>6</sup>, e avaliadas quanto a presença de coliformes termotolerantes, estafilococos coagulase positiva e *Salmonella* spp. A pesquisa desses micro-organismos foi realizada segundo a metodologia de Silva et al<sup>7</sup>.

A determinação de coliformes termotolerantes ocorreu por meio da técnica do Número Mais Provável (NMP) de três tubos múltiplos, onde diluições  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  das amostras dos produtos foram preparadas com Água Peptonada (Oxoid) e, em seguida, alíquotas de 1 mL foram inoculadas em Caldo Lauril Sulfato Triptose (Oxoid) – LST simples. Os tubos foram incubados a 35°C durante 48 horas e avaliados quanto ao crescimento e produção de gás. Em seguida, as culturas positivas foram inoculadas em Caldo Verde Brilhante Bile 2% - BVB (Oxoid), incubadas a 35°C durante 48 horas e examinadas quanto ao crescimento e produção de gás. As culturas do caldo LST que também apresentaram crescimento com produção de gás em caldo BVB, foram inoculadas em caldo EC (Oxoid), incubadas a 45°C durante 24 horas e examinadas quanto à produção de gás para confirmação de coliformes termotolerantes. O NMP de coliformes termotolerantes (NMP/g) foi determinado com base na proporção de tubos positivos para a produção de gás.

A pesquisa de *Salmonella* spp. foi constituída das etapas de pré-enriquecimento das amostras em Caldo Lactosado (Oxoid) durante 24 horas a 35°C, seguida da retirada de 0,1 mL deste caldo para inoculação em 10 mL de Caldo Rappaport (Oxoid) e de 1 mL para o enriquecimento seletivo em 10 mL de Caldo Tetratoato (Oxoid) com incubação por 24 horas a 35°C. Após esse período, uma alçada das soluções foi estriada em Ágar Xilose Lisina Desoxicolato - XLD (Oxoid) e Ágar Entérico de Hektoen - HE (Oxoid) com incubação por 24 horas a 35°C. As colônias típicas de *Salmonella* spp. devem apresentar-se transparentes, com ou sem centro preto, de cor rosa escuro nas placas contendo XLD e coloração verde azulada nas placas com HE.

A contagem de estafilococos coagulase positiva foi realizada com inoculação de 0,1 mL em Ágar Baird-Parker (Oxoid), a partir das diluições  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  das amostras dos produtos preparadas com Água Peptonada (Oxoid). Após a incubação a  $35^{\circ}\text{C}$  por 48 horas, as placas contendo entre 20 e 200 colônias, foram selecionadas para as contagens (UFC/mL ou g). As colônias com coloração preta, zona opaca e halo transparente foram submetidas ao teste de coagulase, sendo consideradas positivas as que apresentaram a formação de coágulo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo a RDC nº12, os padrões microbiológicos para produtos cárneos cozidos ou não, maturados ou não, fracionados ou fatiados, mantidos sob refrigeração permitem o limite de até  $10^5$  de coliformes termotolerantes, até  $5 \times 10^3$  de estafilococos coagulase positiva e estabelecem a ausência de *Salmonella* spp. em 25g. De acordo com os resultados apresentados na Tabela verificou-se ausência de *Salmonella* spp. nas amostras, porém em nove amostras (75%) foram encontrados coliformes termotolerantes e estafilococos coagulase positiva, mesmo que em níveis inferiores aos preconizados pela legislação vigente.

**Tabela.** Resultado das análises microbiológicas de mortadelas fatiadas comercializadas em supermercados na cidade de Fortaleza,

Amostras	Coliformes 45 °C <sup>1</sup>	Salmonella spp.	Estafilococos coagulase positiva <sup>2</sup>
A	4 NMP/g	Ausência	$3,35 \times 10^3$
B	3 NMP/g	Ausência	$<10^1$
C	3 NMP/g	Ausência	$<10^1$
D	1100 NMP/g	Ausência	$<10^1$
E	9 NMP/g	Ausência	$4,28 \times 10^2$
F	4 NMP/g	Ausência	$3,63 \times 10^2$
G	43 NMP/g	Ausência	$5,3 \times 10^1$
H	$<3$ NMP/g	Ausência	$1,1 \times 10^3$
I	4 NMP/g	Ausência	$2,1 \times 10^2$
J	$<3$ NMP/g	Ausência	$2,5 \times 10^1$
L	4 NMP/g	Ausência	$1,3 \times 10^1$
M	$<3$ NMP/g	Ausência	$2,9 \times 10^1$
Limite estabelecido na legislação	$10^5$	Ausência em 25g	$5 \times 10^3$

Nota: (1) Número mais provável (NMP); (2) Contagem em placas - UFC/g

Santos et al<sup>8</sup> encontraram resultados diferentes ao avaliar a qualidade higienicossanitária de 51 amostras de frios pré fatiados. Dessas amostras analisadas 10 estavam fora dos padrões estabelecidos em relação aos coliformes termotolerantes, ou seja, ultrapassaram o valor permitido de  $10^5$  NMP ou UFC/g. Os autores observam também que três amostras apresentaram *Salmonella* spp., enquanto para *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e clostrídios sulfito-redutores estavam de acordo com a legislação vigente.

Os embutidos fatiados necessitam de maiores cuidados, visto que, sofrem excessiva manipulação, e apresentam uma maior superfície de contato com o oxigênio, o que favorece a contaminação por micro-organismos deteriorantes ou patogênicos<sup>1</sup>. Desta forma, apesar da quantidade de coliformes termotolerantes e estafilococos coagulase positiva estarem dentro dos limites estabelecidos pela legislação, à presença desses micro-organismos em mortadelas fatiadas pode ser atribuída a diversos fatores como falhas no processo produtivo, higienização de equipamentos e utensílios de forma inadequada, falta de cuidados durante a manipulação, armazenamento das embalagens em local inadequado e expostas a possíveis contaminantes.

A presença de coliformes em amostras de mortadelas fatiadas pode sugerir uma contaminação no pós-processamento, durante o fatiamento da mortadela e pela embalagem utilizada<sup>9</sup>, enquanto a presença de estafilococos nos alimentos é indicativa de condições higienicossanitárias insatisfatórias, especialmente em relação aos manipuladores, necessitando de maior atenção com vestimentas adequadas e limpas, uso de luvas e higienização constante das mãos<sup>4</sup>.

*Salmonella* spp. é um enteropatógeno responsável por causar casos e surtos de origem alimentar. Sua presença no alimento implica na rejeição de todo lote<sup>10</sup>.

Os micro-organismos pesquisados estavam abaixo do limite permitido pela legislação, o que pode estar relacionado à presença de conservantes em sua formulação ou pelo processo de defumação e por estarem armazenados sob refrigeração, ressaltando que a temperatura de armazenamento dos alimentos é fundamental para conservação e inibição do crescimento microbiano. O armazenamento sob refrigeração diminui a velocidade de reações bioquímicas ou a atividade microbiana<sup>1</sup>.

Os conservantes químicos utilizados nos alimentos proporcionam condições desfavoráveis para o crescimento de micro-organismos, como no caso do nitrato e nitrito utilizados em mortadelas, além de promoverem a coloração e sabores característicos, assim como podem prolongar o tempo de conservação do produto<sup>11</sup>.

A defumação é uma prática antiga responsável por atribuir coloração e sabor aos alimentos. Esse processo estende a vida útil do produto devido aos efeitos combinados da salga, da cocção, da secagem e da deposição de substâncias químicas bactericidas presentes na fumaça, isto é, os fenóis, os aldeídos e os ácidos orgânicos<sup>12</sup>.

## CONCLUSÃO

As análises microbiológicas das mortadelas fatiadas encontram-se dentro dos limites estabelecidos pela legislação brasileira. Entretanto, a presença de coliformes termotolerantes e estafilococos coagulase positiva podem indicar condições higienicossanitárias inadequadas.

Devido a poucos estudos sobre o assunto, ressalta-se a necessidade de mais pesquisas com alimentos fatiados comercializados em supermercados, visto que estes são produtos prontos para o consumo e podem oferecer um risco à saúde dos consumidores quando contaminados.

Dessa forma, enfatiza-se a importância de uma fiscalização mais rigorosa, implantação das boas práticas de manipulação pelos supermercados, treinamentos dos manipuladores quanto à forma correta de higienização de equipamentos e utensílios, além do armazenamento das embalagens em locais longe de contaminação, com o intuito de minimizar agravos à saúde dos consumidores.

## AGRADECIMENTOS

Ao Centro Universitário Estácio do Ceará pelo incentivo e apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

1. Moreira PB. Validade comercial de presunto de peru fatiado e embalado em atmosfera modificada [dissertação de mestrado]. Niterói (RJ): Universidade Federal Fluminense; 2012. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/vtt-577>
2. Cenci DF. Estudo da influência de variáveis do processo emulsificação de mortadela de frango [dissertação de mestrado]. Erechim (RS): Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI ERECHIM; 2013. Disponível em: [http://www.uricer.edu.br/cursos/arq\\_trabalhos\\_usuario/2294.pdf](http://www.uricer.edu.br/cursos/arq_trabalhos_usuario/2294.pdf)
3. Fachinello JP, Casaril KBPB. Avaliação da qualidade microbiológica de presuntos fatiados, comercializados no município de Francisco Beltrão, Paraná. *Alim Nutr* [Internet]. 2013;24(3):333-7. Disponível em: <http://docplayer.com.br/24872279-Avaliacao-da-qualidade-microbiologica-de-presuntos-fatiados-comercializados-no-municipio-de-francisco-beltrao-parana.html>
4. Sá MJF, Macedo RO, Leandro LMG, Almeida BS, Fonseca FLA. Avaliação microbiológica do presunto fatiado comercializado na cidade de Juazeiro do Norte-CE. *Hig Aliment*. 2016; 30(258/259):129-33. Disponível em: <http://docs.bvsalud.org/biblioref/2016/11/2625/separata-129-133.pdf>
5. Alves E, Giaretta AG, Costa FM. Higiene pessoal dos manipuladores de alimentos dos shoppings centers da região da grande Florianópolis. *Rev Técnico Científica (IDSC)* [Internet]. 2012;3(1):604-14. Disponível em: <http://periodicos.ifsc.edu.br/index.php/rtc/article/view/737/488>
6. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. *Diário Oficial da União, Poder Executivo*, de 10 de janeiro de 2001. Seção 1, Pág. 45.
7. Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. 3.ed. São Paulo: Varela; 2007.

8. Santos RBE, Albuquerque MM, Rall VLM. Qualidade higiênico-sanitária de frios pré-fatiados, comercializados na cidade de Botucatu. *Hig Aliment*. 2013;27(224/225):177-81. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/137227>
9. Kaminski S, Barreto ES. Coliformes totais e termotolerantes de presunto fatiado comercializado em supermercados do município de Sorriso - Mato Grosso, Brasil. *Rev Bras Educ Saúde* 2013;3(3):59-63. Disponível em: <https://www.gvaa.com.br/revista/index.php/REBES/article/view/2358/1838>
10. Shinohara NKS, Barros VB, Jimenez SMC, Machado ECL, Dutra RAF, Lima Filho JL. Salmonella spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. *Ciênc. Saúde Coletiva*. 2008;13(5):1675-83. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-81232008000500031>
11. Oliveira JF, Silva UR, Pastore VAA, Azevedo EC, Campos GM, Silva FCG et al. Determinação espectrofotométrica de nitrito em produtos cárneos embutidos. *Rev Bras Hig Sanid Anim*. 2017;11(1):19-31. Disponível em: <http://www.higieneanimal.ufc.br/seer/index.php/higieneanimal/article/view/377/1971>
12. Bagestan MM. Perfil sensorial, físico, químico e microbiológico de embutido de peito de peru (Maleagris gallopavo) defumado [dissertação de mestrado]. Florianópolis (SC): Universidade Federal de Santa Catarina; 2012. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/103403/316508.pdf?sequence=1>





# Frequência de enteroparasitos em mulheres não grávidas e seus filhos e grávidas atendidas em uma unidade de saúde

## Frequency of enteroparasites in non-pregnant women and their children and pregnant women attended at a public health unit

RIALA6/1771

Carolina Novato GONDIM<sup>1</sup>, Alexandra Almeida Pereira CHAGAS<sup>1</sup>, Thales Augusto BARÇANTE<sup>1</sup>, Ingrid Marciano ALVARENGA<sup>2</sup>, Marina Martins de OLIVEIRA<sup>2</sup>, Joziana Muniz de Paiva BARÇANTE<sup>1\*</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Laboratório de Biologia Parasitária, Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Lavras, Aquecida Sol, Lavras, MG, Brasil, CEP: 37200-000. Tel: +55 35 99195 5858. E-mail: [joziana@ufla.br](mailto:joziana@ufla.br)  
<sup>2</sup>Laboratório de Biologia Parasitária, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil

Recebido: 13.11.2018 - Aceito para publicação: 25.04.2019

### RESUMO

As infecções parasitárias intestinais são amplamente distribuídas em todo o mundo e a população infantil é a mais afetada. A prevalência das infecções parasitárias intestinais materna e infantil de pacientes atendidos em uma unidade de saúde pública do município de Lagoa Santa, Minas Gerais foi avaliada pela técnica de centrífugo sedimentação em formol-éter. A positividade foi de 41,7% para gestantes, 37,3% para mães e 35,7% em crianças. *Endolimax nana* (17,1%) e *Giardia intestinalis* (17,1%) foram os parasitos mais frequentemente detectados em crianças com idade inferior a dois anos e em gestantes (33,3%). Para as mães, *G. intestinalis* (20,3%) foi o parasito mais prevalente seguido de *Entamoeba coli* (17%). A infecção simultânea de mãe e filho foi detectada em 7 das 25 crianças infectadas. Apesar das ações de educação em saúde, melhoria no nível educacional e acesso a serviços médicos, a frequência de infecções por endoparasitas permanece alta. A literatura é escassa em relação ao tema e acredita-se que a deficiência na aplicação de medidas de educação sanitária possa fazer com que mães infectadas possam contribuir para a infecção parasitária de seus filhos, assim como os filhos podem ser fonte de infecção para suas mães.

**Palavras-chave.** saúde pública, saúde de grupos específicos, infecções parasitárias, protozoários intestinais.

### ABSTRACT

Intestinal parasitic infections are widely distributed throughout the world and children are the most affected population. The objective of the present study was to evaluate the prevalence of parasitic maternal and infant intestinal infection of patients attended at a public health unit in the municipality of Lagoa Santa, Minas Gerais. The centrifugal-sedimentation in formol-ether was the technique used for stool analysis. Positivity was observed in 41.7% for pregnant women, 37.3% for mothers and 35.7% for children. *Endolimax nana* (17.1%) and *Giardia intestinalis* (17.1%) were the most frequently detected parasites in children under two-years old and pregnant women (33.3%). For mothers, *G. intestinalis* (20.3%) was the most prevalent parasite followed by *Entamoeba coli* (17%). Simultaneous infection of mother and child was detected in 7 of 25 infected children. Despite health education actions, improvement in educational level, and access to medical services, the frequency of endoparasite infections remains high. Literature is scarce in relation to the present theme and it is believed that infected mothers can contribute for parasitic infection of their kids, just as children can be a source of infection for their mothers.

**Keywords.** public health, health of specific groups, parasitic infections, intestinal protozoa.

## INTRODUÇÃO

As infecções parasitárias intestinais continuam sendo um dos principais problemas de saúde pública mundial pelo grande número de pessoas afetadas. Estas merecem especial atenção nos países em desenvolvimento, pois estão intimamente associadas às condições sanitárias precárias e podem causar consequências adversas para os indivíduos infectados, sobretudo crianças<sup>1</sup>. Já nas mulheres adultas, na maioria das vezes, as parasitoses não configuram uma situação nosológica própria e raramente interferem na capacidade produtiva e reprodutiva da mulher. Tal fato faz com que seu diagnóstico seja protelado e detectado apenas pelo exame coproparasitológico, quando esse é solicitado<sup>2</sup>.

A associação entre gravidez e parasitos intestinais foi estimada em 6,9 milhões (26,7%) das 25,9 milhões de mulheres grávidas na África Subariana<sup>3</sup>. A associação entre gravidez e a ocorrência de parasitoses tem despertado o interesse de alguns pesquisadores, por se tratar de grupo com características próprias e transitórias dos padrões metabólicos, endocrinológicos e imunológicos. O conhecimento das rotas de transmissão e a prevalência das parasitoses intestinais são úteis na implementação de estratégias preventivas e terapêuticas como parte das iniciativas em saúde pública<sup>1</sup>.

Dada a ausência de informações sobre a relação materno-infantil, sobretudo no que se refere à região de Lagoa Santa - MG, o presente trabalho teve por objetivo verificar a frequência de parasitos intestinais em gestantes, crianças recém-nascidas, de até dois anos de idade, e suas respectivas mães, sendo estudo importante para o conhecimento epidemiológico destas doenças.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Ética

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, da Faculdade da Saúde e Ecologia Humana (FASEH), sob o protocolo de nº 123/2006 conforme a resolução CNS 466/12.

### Descrição da área

O estudo foi realizado no município de Lagoa Santa - MG, localizado a 40 Km, aproximadamente, da capital do estado de Minas Gerais. Possui cerca de 231,9 Km<sup>2</sup> de área e população estimada em julho de 2017 de 61.752 habitantes. O município conta com uma rede de saúde para assistência populacional composta por: uma Policlínica; oito unidades básicas de saúde (Programa de Saúde da Família - PSF); um hospital, Santa Casa de Misericórdia de Lagoa Santa (Hospital Dr. Lindouro Avelar); e um CAPS - Centro de Atenção Psico-social.

### Coleta de dados

O trabalho consistiu na realização de um estudo transversal, com amostra definida pelo cadastramento de famílias residentes na área de abrangência do PSF Mário Casassanta, município de Lagoa Santa, MG.

A amostra foi composta por todas as gestantes e crianças menores de dois anos de idade com as suas respectivas mães cadastradas no PSF, tendo como critério de inclusão ter assinado o TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido) e fornecer três amostras de fezes, resultando em n=216, sendo 21 gestantes, 99 crianças menores de dois anos e 96 mães das respectivas crianças. Previamente, foram dadas orientações e entregue o TCLE para assinatura atestando consentimento sobre a pesquisa. Em seguida, foram distribuídos coletores universais de fezes contendo fixador MIF (merthiolato-iodo-formaldeído) tamponado para a coleta de três amostras, em dias alternados.

### Processamento das amostras

As amostras de fezes foram processadas utilizando o método de sedimentação por centrifugação por formol-éter (método de Blaag) para detecção de ovos e larvas de helmintos, assim como cistos e oocistos de protozoários. A partir da homogeneização de aproximadamente 2g de fezes em 10ml de MIF, o material foi filtrado em gaze cirúrgica, dobrada quatro vezes e, posteriormente, 2ml do filtrado foi misturado a 4ml de éter e centrifugado por 1 minuto a 1500rpm. Após

centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e três lâminas com lamínula (24 x 32 mm) do sedimento de cada sujeito da pesquisa foi examinado em microscópio óptico, no Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Saúde e Ecologia Humana (FASEH).

## RESULTADOS

Dos 216 indivíduos para os quais foram entregues TCLE e os coletores de fezes, 141 (65%) retornaram com as amostras para análise, sendo 12 (8,5%) gestantes, 59 (42%) mães e 70 (49,5%) crianças menores de dois anos de idade (**Tabela 1**).

**Tabela 1.** Percentual de indivíduos infectados por parasitos intestinais em uma população atendida em uma unidade de saúde pública do município de Lagoa Santa, Minas Gerais

Grupo	Amostra total	Nº Infectados (%)
Gestantes	12	05 (41,66)
Mães	59	22 (37,28)
Crianças	70	25 (35,71)
Total	141	52 (36,87)

À análise coproparasitológica, verificou-se que 65 (46%) indivíduos apresentaram algum tipo de parasito intestinal, sendo que destes, 12 (18,5%) apresentavam-se infectados por mais de um parasito.

Quanto à distribuição total dos enteroparasitos na população parasitada, verificou-se que 28 (43,1%) estavam parasitados por *Endolimax nana*, 21 (32,3%) por *Giardia intestinalis*, 14 (21,5%) por *Entamoeba coli*, 2 (3,1%) por *Entamoeba histolytica/ E. dispar* (**Tabela 2**).

**Tabela 2.** Frequência de protozoários de acordo com espécies em gestantes, mães e crianças residentes no município de Lagoa Santa, Minas Gerais

	Gestante	Mãe	Criança	Mãe+Criança
<i>E. nana</i>	04 (33,3%)	12 (20,3%)	12 (17,1%)	02
<i>G. intestinalis</i>	01 (8,3%)	10 (17,0%)	03 (4,3%)	03
<i>E. coli</i>	04 (33,3%)	02 (3,4%)	12 (17,1%)	02
<i>E. histolytica/E. dispar</i>	00	05 (8,5%)	00	00

No que tange à relação materno-infantil, das 25 crianças parasitadas, sete (28%) apresentaram correspondência com parasitismo materno, sendo duas infectadas por *E. nana*; duas por *G. intestinalis* e três por *E. coli*.

## DISCUSSÃO

No presente estudo verificou-se que na área de abrangência do PSF Mário Casassanta é marcante a ausência de saneamento básico; a presença de fossas sépticas; água não potável proveniente de cisternas e poços artesianos. A literatura científica aponta que este conjunto de fatores pode estar relacionado ao favorecimento da transmissão de parasitos intestinais. Estes figuram como um importante problema de saúde pública em todo o mundo, sobretudo nos países em desenvolvimento. Tal fato deve-se, dentre outros fatores, às precárias condições de saneamento básico e ao baixo nível sócio-econômico de uma população, que em associação com hábitos higiênicos precários contribuem para a perpetuação dos enteroparasitos<sup>4,6</sup>.

No presente estudo verificou-se que *E. nana* foi o parasito mais frequente, seguido por *G. intestinalis*, *E. coli* e *E. histolytica/E. dispar*. A transmissão de protozoários patogênicos e helmintos pela água é um grave problema de saúde pública<sup>4,5</sup>. A alta prevalência de *E. nana* pode ser considerada um indicativo para a falta de condições de saneamento básico do ambiente, o que constitui um fator de risco crucial para frequência de outros parasitos considerados patogênicos<sup>4,5</sup>.

Nas populações onde verifica-se baixos níveis sócio-econômicos, como falta de água tratada e ausência de escoamento sanitário, as crianças são realmente as mais prejudicadas, visto que têm alimentação e imunidade muitas vezes insuficientes, assim como hábitos higiênicos pouco consolidados como não lavagem das mãos antes das refeições ou após uso de sanitário, higienização inadequada de alimentos a serem ingeridos *in natura*, dentre outros. Assim, ficam mais facilmente expostas aos locais e aos riscos de infecção<sup>6</sup>.

Após a análise coproparasitológica, foi

possível verificar que cerca de 35,7% das amostras provenientes de crianças com idade inferior a dois anos de idade encontravam-se positivas para pelo menos uma espécie de protozoário, sendo *G. intestinalis* e *E. nana* os mais prevalentes. Estes resultados concordam com outros estudos onde foram analisadas amostras de fezes de crianças entre seis meses a cinco anos, tendo *G. intestinalis* como parasito intestinal mais prevalente<sup>7</sup>. Dentre os principais parasitos intestinais que infectam humanos, o protozoário *G. intestinalis* destaca-se como um dos mais frequentes observados em inquéritos coproparasitológicos realizados em diferentes regiões do mundo, especialmente em países em desenvolvimento, onde é uma das principais causas de diarreia infecciosa, sobretudo em crianças<sup>8</sup>. Após sua implantação, este parasito causa episódios de diarreia, tendo como consequência problemas de má absorção, avitaminoses, desnutrição e diminuição da capacidade de desenvolvimento físico e cognitivo<sup>9</sup>.

O parasitismo, a partir dos seis meses de vida, pode estar relacionado ao período de desmame da criança, introdução de novos alimentos e pela etapa de maior mobilidade no ambiente. Alimentos complementares contaminados são a principal rota de transmissão dos agentes causadores de diarreia em crianças. Os baixos níveis de higiene materna podem contribuir para o aumento da transmissão, sobretudo para a população pediátrica, uma vez que as mães atuam como manipuladoras diretas do alimento dos infantes. Práticas maternas adequadas de manejo, preparo, administração e estocagem dos alimentos complementares podem reduzir a contaminação dos mesmos<sup>10</sup>. Neste estudo, constatou-se a correspondência de parasitismo materno-infantil em sete das 25 (28%) crianças infectadas. A necessidade de uma maior prática de higiene pessoal, como o aumento do acesso à água limpa para lavagem das mãos, acesso a fossas sépticas apropriadas para restringir a contaminação e educação relacionada à higiene pessoal e ambiental são essenciais para que haja melhoria à saúde, sobretudo de crianças. Também pode estar relacionado à maior susceptibilidade da população infantil às infecções parasitárias, devido aos hábitos higiênicos inadequados, assim como aos níveis socioeconômicos e de escolaridade<sup>11</sup>. Ensaios randomizados devem ser realizados para abordar

a relação causal entre higiene pessoal, infecção parasitária e desnutrição.

Nas análises, não se verificou a ocorrência de ovos ou larvas de helmintos, nas amostras dos três grupos estudados. Neste contexto, uma importante questão a ser considerada, refere-se às atuais políticas das unidades básicas de saúde e a nova classe de profissionais de saúde: os agentes comunitários. Desde a implementação do Programa de Saúde de Família, na década de 1990, tem se verificado uma queda na ocorrência de parasitoses intestinais, sobretudo, com relação aos helmintos. Tal decréscimo parece ser um reflexo da ampla difusão e distribuição de “vermífugos” para a população, sem a prévia constatação de positividade nos exames coproparasitológicos. As evidências existentes indicam que a desparasitação em massa é um investimento em saúde, econômico para governos de países de baixa renda onde as infecções por vermes são generalizadas<sup>11</sup>. A curto prazo, esta medida tem mostrado resultados algumas vezes satisfatórios, todavia, o tratamento inespecífico faz com que se desconheça a frequência dos principais agentes parasitários, dificultando ações políticas, sociais e preventivas. Em outra pesquisa foi demonstrado que a desparasitação com albendazol ou praziquantel durante o segundo ou terceiro trimestre da gravidez trata efetivamente infecções suscetíveis, mas não tem efeito geral sobre anemia materna, peso ao nascer, mortalidade perinatal ou anomalias congênitas<sup>12</sup>. Além disso, a dosagem inadequada, associada à inespecificidade parasitária de algumas drogas tende, a longo prazo, ao aparecimento de cepas resistentes aos fármacos disponíveis. O tratamento coletivo recomendado pelo governo brasileiro engloba, além de outras parasitoses, as geohelmintíases utilizando o albendazol<sup>13</sup>.

No presente trabalho verificou-se que das cinco gestantes parasitadas, quatro estavam infectadas por *G. intestinalis*, quatro coinfectedas por *E. nana* e uma por *E. coli*, sendo todas assintomáticas. Em um estudo também realizado com gestantes, os autores verificaram que a infecção parasitária intestinal durante a gestação pode representar fator de risco não declarado de anemia e CIUR (crescimento intra-uterino restrito)<sup>14</sup>. Muitos autores sugerem que os sintomas são leves



e os riscos não esclarecidos. Logo, o tratamento pode ser postergado para após o parto e apenas em situações graves devem ser tratadas, mas sempre a partir do segundo semestre da gestação<sup>14,15</sup>.

## CONCLUSÃO

Confirma-se com este estudo, a necessidade de uma reavaliação e verificação da qualidade do saneamento básico, melhores programas de educação em saúde bem como, uma modificação do comportamento e hábitos alimentares da população avaliada. Neste sentido, propõe-se como segunda fase desta avaliação, um estudo longitudinal para avaliar as alterações nas relações entre parasitismo materno-infantil, delimitando suas possíveis causas e influências, entre elas o aleitamento materno. Assim, com os resultados do presente estudo, novas formas de intervenções sociais e educativas devem ser implementadas pelas políticas públicas, que visem diminuir a frequência das enteroparasitoses em gestantes, mães e crianças menores de dois anos.

## AGRADECIMENTOS

Às gestantes, mães e filhos por contribuírem para que este trabalho fosse possível de ser concluído. Às enfermeiras Ana Paula A. Pereira, Letícia F. Sabino e Sônia R. M. Wondollinger, que contribuíram com todo processo de coleta e acolhimento dos participantes.

## REFERÊNCIAS

1. Gil FF, Busatti HGNO, Cruz VL, Santos JFG, Gomes MA. High prevalence of enteroparasitosis in urban slums of Belo Horizonte-Brazil. Presence of enteroparasites as a risk factor in the family group. *Pathog Glob Health*. 2013;107(6):320-4. <https://dx.doi.org/10.1179/2047773213Y.0000000107>
2. Bini S, Alves L, Simionatto M, Miné JC. Enteroparasitoses e situação nutricional de gestantes atendidas em unidades básicas de saúde do município de Ponta Grossa - PR. *Publ UEPG Ci Biol Saúde*. 2015; 21(1):65-74. <http://doi.org/10.5212/publicatio%20uepg.v21i1.7134>
3. McClure EM, Meshnick SR, Mungai P, Malhotra I, King CL, Goldenberg RL et al. The association of parasitic infections in pregnancy and maternal and fetal anemia: a cohort study in Coastal Kenya. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(2):e2724. <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002724>
4. Freitas DA, Paiva ALR, Carvalho Filho JAA, Cabral JJS, Rocha FJS. Occurrence of *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. and other pathogenic intestinal parasites in the Beberibe River in the State of Pernambuco, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015;48(2):220-3. <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0174-2014>
5. Soares CVD, Albino SL, Silva RC, Duarte ABS, Queiroga CD, Medeiros JS. Prevalência de enteroparasitoses em crianças de uma creche pública no município de Campina Grande. *J Biol Pharm Agricult Manag*. 2016;12(4):28-38. Disponível em: <http://revista.uepb.edu.br/index.php/biofarm/article/view/3262>
6. Andrade AO, de Sá ARN, Bezagio RC. Prevalência de parasitoses intestinais em crianças de um Centro Municipal de Educação Infantil em Campo Mourão, PR/Brasil. *Uningá Rev*. 2017;29(3):36-41. Disponível em: <http://revista.uninga.br/index.php/uningareviews/article/view/1971>
7. Cañete R, Díaz MM, García RA, Martínez PML, Ponce FM. Intestinal parasites in children from a Day Care Centre in Matanzas City, Cuba. *PLoS ONE*. 2012; 7(12):e51394. <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0051394>
8. Hooshyar H, Rostamkhani P, Arbabi M, Delavari M. *Giardia lamblia* infection: review of current diagnostic strategies. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*. 2019; 12(1):3-12. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6441489/pdf/GHFBB-12-003.pdf>
9. Coêlho MDG, Ramos LL, Pereira RB, Rocha LO, Lino FPS, Coêlho FAS. Avaliação do consumo de *Lactobacillus casei* Shirota para o controle de giardíase em crianças. *Rev Patol Trop*. 2016;45(2):169-78. [https://dx.doi.org/10.5216/2016;45\(2\):169-78](https://dx.doi.org/10.5216/2016;45(2):169-78)



[rpt.v45i2.41772](#)

10. Oliveira BSB, Oliveira RKL, Bezerra JC, Melo FMS, Monteiro FPM, Joventino ES. Social conditions and maternal conducts in the prevention and management of infantile diarrhea. *Cogitare Enferm*. 2017;22(4):e50294. <http://dx.doi.org/10.5380/ce.v22i4.50294>
11. Mahmud MA, Spigt M, Bezabih AM, Pavon IL, Dinant GJ, Velasco RB. Risk factors for intestinal parasitosis, anaemia, and malnutrition among school children in Ethiopia. *Pathog Glob Health*. 2013;107(2):58-65. <http://dx.doi.org/10.1179/2047773213Y.0000000074>
12. Hicks JH, Kremer M, Miguel E. The case for mass treatment of intestinal helminths in endemic areas. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015.9(10):e0004214. <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0004214>
13. Ndibazza J, Muhangi L, Akishule D, Kiggundu M, Ameke C, Oweka J et al. Effects of deworming during pregnancy on maternal and perinatal outcomes in Entebbe, Uganda: a randomized controlled trial. *Clin Infect Dis*. 2010;50(4):531-40. <https://dx.doi.org/10.1086/649924>
14. D'Alauro F, Lee RV, Pao-In K, Khairallah M. Intestinal parasites and pregnancy. *Obstet Gynecol*.1985;66(5):639-43. [resumo]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4058821/>
15. Perloroth NH, Castelo Branco WC. Current knowledge of environmental exposure in children during the sensitive developmental periods. *J Pediatr*. 2017;93(1):17-27. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jpeds.2016.07.002>



# Nutrition students beliefs on the nutritional information and nutritional claims in the pre-packaged food products: an application of the Theory of Planned Behavior

## Crenças de estudantes de nutrição sobre informação e alegação nutricional em produtos alimentícios: uma aplicação da Teoria do Comportamento Planejado

RIALA6/1772

Gabriela Macedo FRAIZ, Renata Labronici BERTIN, Caroline Opolski MEDEIROS\*

\*Endereço para correspondência: Departamento de Nutrição, Universidade Federal do Paraná, Av. Lothário Meissner, 632, Jardim Botânico. Curitiba, Paraná, Brasil, CEP: 80210-170. Tel: +55 41 3360 4003. E-mail: [caroline.opolski@gmail.com](mailto:caroline.opolski@gmail.com)

Recebido: 15.03.2019 - Aceito para publicação: 13.05.2019

### ABSTRACT

This study identified the modal salient behavior, the normative and the control modal beliefs on the nutritional label use for the prepackaged food products among the college students. In November 2015, the exploratory qualitative research was conducted with 19 nutrition students, applying the concepts of Theory of Planned Behavior. Contents analysis of two organized focus groups and the statistical descriptive analysis of quantitative variables were performed. Both focus groups mentioned the advantages of the use of nutritional information, as the assistance for choosing the healthy food. A specific disadvantage associated with the mentioned nutritional claims was this influence on the purchase decisions (behavioral beliefs). The students mentioned their parents and siblings as the peoples who approve the use of this information, when they purchase a product (normative beliefs). Small lettering and difficulty to interpret the portions size indicated in the nutritional information on the labels were the factors, which could difficult their use. Making easy to read the nutritional claims tend to stimulate the purchasing decisions (control beliefs). Eleven salient modal beliefs were identified, which may explain participants' behavior when using information and nutrition claims.

**Keywords.** nutritional labeling, consumer behavior, student.

### RESUMO

O trabalho teve como objetivo identificar as crenças modais salientes comportamentais, normativas e de controle sobre o uso do rótulo nutricional de produtos alimentícios entre estudantes universitários. Em novembro de 2015, 19 estudantes de nutrição participaram de pesquisa qualitativa exploratória, que abordou conceitos da Teoria do Comportamento Planejado. Foram realizadas a análise de conteúdo de dois grupos focais e a análise estatística descritiva das variáveis quantitativas. Ambos os grupos focais mencionaram vantagens do uso de informações nutricionais, como auxílio na realização de escolhas de alimentos saudáveis. Uma desvantagem específica associada às alegações nutricionais mencionada, foi a influência desta na decisão de compra (crenças comportamentais). Os alunos mencionaram seus pais e irmãos como pessoas que aprovam o uso dessa informação, quando compram um produto (crenças normativas). Quanto às letras pequenas e à dificuldade de interpretar o tamanho das porções, na informação nutricional nos rótulos, foram fatores que poderiam dificultar o uso. Em relação às alegações nutricionais, por serem fáceis de ler, tenderam a estimular as decisões de compra (crenças de controle). Foram identificadas 11 crenças modais salientes, que podem explicar o comportamento dos participantes ao usar a informação e as alegações nutricionais.

**Palavras-chave.** rotulagem nutricional, comportamento do consumidor, estudantes.

## INTRODUCTION

Nutritional information presented on food product labels can influence the purchasing decisions of consumers<sup>1</sup>. Brief messages related to nutritional content printed on food product labels, known as nutritional claims are also influential<sup>2</sup>.

Since 1969, the *Codex Alimentarius* advocates that consumers have a right to clear and adequate food labels on prepackaged products. These labels must not present any misleading or false information that may create an incorrect impression about the product's characteristics that could induce consumers to poor choices<sup>3</sup>.

It is hoped that with the continuous improvement of laws and standards that involve food labeling, the population improve access and comprehension of food label and claims, thus contributing to their buying decisions. However, the way that this information is displayed on labels usually, confuses consumers and generates doubts. It can also lead to contradictions between nutritional claims and the nutritional data presented on packages<sup>2</sup>.

Beyond aspects related to legislation, consumers' beliefs about nutritional information and claims are also factors associated to their buying decisions<sup>4</sup>. Beliefs are created at different moments of an individual's life, and can be modified or forgotten over time. They indicate what people believe to be true about an object, person or behavior<sup>5</sup>.

The Theory of Planned Behavior (TPB), an extension of the Theory of Rational Action (TRA), has been used mainly to ascertain behaviors related to health, including those related to eating habits. It is based on the principle that all actions are planned before they are taken, while the cause of the behavior depends on the individual's intention to effectuate it<sup>6</sup>. Therefore, the TPB affirms that various aspects are necessary to understand the intention to realize a behavior, including personal attitudes (which are related to behavioral beliefs), subjective norm of social influence (related to normative beliefs) and events that may facilitate or impede the action of the behavior (related to control beliefs). According to the TPB, the combination of these three beliefs are fundamental to determining behavioral intentions that will concretize a certain behavior.

Thus, knowing and understanding beliefs related to nutritional information and claims on

prepackage food products that lead individuals to make purchasing decisions are an important factor in the construction of nutritional education strategies, at both the individual and collective levels. Therefore, the objective of this study is to evaluate consumers' beliefs about the nutrition label use among college students on prepackage food products.

## METHODS

Drawing on the TPB, the research used a qualitative, exploratory approach to determine consumers' beliefs about the use and importance of nutritional information and claims found on nutrition labelling when purchasing food products.

In this research were included nutrition students who are 18 or older that purchase at least one prepackage food product per month. Participants were invited personally in classrooms and by email. Two focus groups were constituted to identify consumers' salient beliefs (behavioral, normative and control beliefs). One with students who had already taken the course that addresses the theme "nutrition labeling", and another with those that hadn't.

A preliminary test was conducted at the same location where the focus groups would be held, to adjust the data collection instrument, equipment and environment. This preliminary focus group session lasted approximately forty minutes and was composed with six students, one moderator and one assistant to observe and take notes. Suggestions were made during pre-testing, resulting in alterations to the collection instrument, seeking better comprehension.

The focus groups were carried out in November 2015, in the laboratory of Nutrition Education located at the Department of Nutrition of the Federal University at Parana (UFPR). The first focus group was composed of thirteen female college students who had already studied the theme "nutrition labeling". The second focus group included six female college students who had not yet studied this theme. Both focus groups lasted about 40 minutes. The size of the groups and the time allowed the effective participation of the students and an adequate discussion<sup>7</sup>.

Prior to the realization of each focus group, participants were informed about how the session would be, clarifying all the questions that would be asked. They read and completed the Free and Informed

Consent Agreement and then completed a semi-structured questionnaire prepared specifically for the study about sociodemographic data (sex, age, marital status, monthly family income) and prepackage food product buying habits (frequency of supermarket shopping and reading habits of nutritional information and claims). The economic extract of participants was evaluated with the instrument of the Brazilian Association of Population Studies<sup>8</sup>.

The focus group began after the participants completed this semi-structured questionnaire. The focus groups were conducted by a moderator who was assisted by two observers. To identify salient beliefs, the participants were questioned about: advantages and disadvantages in using nutritional information and claims at the time of food purchases (behavioral beliefs); factors that could facilitate and impede using nutritional information and claims at the time of food purchasing (control beliefs); and about people who would like to participate use (or not) the nutritional information and claims when purchasing food (normative beliefs). Participants were instructed to first answer the questions about nutritional information and then about nutritional claims.

Before the questions were presented, the definitions of nutritional information and claims that should be considered during the discussion were clarified. "Nutritional information" was defined as the declaration of the caloric value and nutrient quantities from the standard list or statement of nutrient contents found on food packaging, with the sole function to provide an understanding of the quantity of nutrients in the product. Yet, "nutritional claims" were considered as any representation that affirms, suggests or implies that a food has certain nutritional proprieties, including, but not limited to, caloric value and amounts of proteins, fats and carbohydrates, as well as specific vitamin and mineral contents<sup>1</sup>. It was also explained that the term nutritional labeling comprises both nutritional information and claims, for it is defined as a description that informs consumers' about the nutritional proprieties of food, considering complementary nutritional proprieties, in addition to the declaration of caloric value and the quantities of nutrients<sup>1</sup>.

The discussions were recorded with two recorders and data transcription was then conducted to allow content analysis of the focus groups, according to recommendations from Gagné and Godin<sup>9</sup>.

Data analyses began with a "floating reading" of interviews faithfully transcribed, which allowed a first contact with the document and a systematization of ideas. The material was then explored to define categories according to similarities found in the transcribed verbatim analysis. Finally, the results were properly treated and interpreted for qualitative evaluation. To ensure the reliability of each category, two independent evaluators conducted data analyses. After this stage, evaluators reviewed and reached an agreement about the categories identified. This allowed identifying modal salient behavioral, normative and control beliefs.

To determine salient beliefs, the categories identified were placed in groups of behavioral, normative and control beliefs. Next, the frequency they were mentioned was verified for each category. Then, the final frequencies were calculated and the beliefs were ordered according to decreasing frequency. Modal salient beliefs were considered those mentioned most frequently, reaching, at least, 75% of the total number of citations<sup>9</sup>.

The research was approved by the Committee of Research Ethics, of the Federal University of Paraná (Number: 1.294.619).

## RESULTS

### Characteristics of the participants

All participants were single and female with an average age of  $20.2 \pm 1.2$  years. Participants belonged to economic classes A, B1 and B2 and their average family income was of  $4.42 \pm 0.96$  minimum salaries (1 minimum salary = \$ 205.03 dollars). Most participants (84%) made 1 to 6 food purchases per week, 11% made 2 to 3 purchases per month and 5% made daily purchases.

All nutrition students had the habit of reading the nutritional information at the time of purchasing. In relation to reading nutritional claims, only 1 student mentioned she did not read them when making a purchase.

### Modal salient beliefs

The modal salient beliefs about nutritional information and claims that emerged in the focus groups are presented in [Tables 1](#) and [2](#), respectively.

**Table 1.** Modal salient beliefs about nutritional information according of the focus groups. Curitiba, Brazil, 2015

Categories	Focal Group 1 (N=13)*		Focal Group 2 (N=6)†	
	Nº	Speeches	Nº*	Speeches
<b>Behavioral Beliefs</b>				
<i>Make contradictions explicit (advantage)</i>	5	“[...] I have nutritional information to base myself on, so I can say that this is not as magical and healthy as they say in advertisements, that’s why it is an advantage.”	-	-
<i>Know about a products’ composition (advantage)</i>	4	“[...] if you want a product with more or less fat, you can go by that information.”	6	“[...] you look at the nutritional information and no longer buy it, just because you know what that product contains.”
<i>Make healthy choices (advantage)</i>	-	-	5	“[...] when you have the habit of looking, you begin to consume things that are probably healthier[...]”
<b>Control Beliefs</b>				
<i>Being nutrition academic (facility)</i>	3	“[...] for those of us who took the course in nutrition, most would facilitate purchases [...]”	-	-
<i>Daily reference value (%VD) (difficulty)</i>	1	“[...] this part, mainly the % of daily needs, is very vague, because there the daily reference is a 2,000 kilocalorie diet‡ and very few people eat exactly 2,000 kilocalories [...]”	-	-
<i>Difficulty in interpreting portion size (difficulty)</i>	1	“[...] creates confusion [...] I still don’t notice that it is the same portion stated there, I eat it all and regret it later.”	4	“[...] because it is there in grams and you have to divide the thing to know the quantity [...]”
<i>Small letter and table (difficulty)</i>	-	-	3	“[...] the letters are too small, so any blur is sufficient to make it hard to see[...]”/“[...] and the nutritional table is that tiny little table behind like this [...]”
<b>Normative Beliefs</b>				
<i>Father and Mother (like and dislike)</i>	5	“My mother [...] doesn’t like it because I spend hours at the supermarket[...] but she also likes it because it is a way for her to learn and eat better, right?![...]”/ “[...] there, the better products are generally more expensive, and my father takes them out of the grocery cart, and I put them back [...]”	2	“[...] My mother and father get really happy when I give tips, so back home they like it when I read the information.”
<i>Sister/Brother (like)</i>	4	“[One] of the people who like me to look, is my sister, she always asks me everything, she likes that I know.”	-	-
<i>Health professionals (like)</i>	-	-	5	“I think that in the case of information, it is interesting [...] to doctors and nutritionists [...]”
<i>Family§ (like)</i>	-	-	4	“I think that in the case of nutritional information, it is interest [...] to our families [...]”

Subtitle: Nº = number of citations; \*Focus Group 1 = had already taken the theme “Nutritional labeling” in college; †Focus Group 2 = had not taken the theme “Nutritional labeling” in college; ‡In Brazilian legislation, daily values (%) are based on a 2,000 kilocalorie diet; §Excluding parents and siblings



**Table 2.** . Modal salient beliefs about nutritional claims according of the focus groups. Curitiba, Brazil, 2015

Categories	Focal Group 1 (N=13)*		Focal Group 2 (N=6)†	
	Nº	Speeches	Nº*	Speeches
<b>Behavioral Beliefs</b>				
<i>Product more expensive (disadvantage)</i>	6	“[...] light food that has less fat or sugar, it’s written on the package you know this, but this product is more expensive just due to this change.”	4	“[...] people will want to buy that gojiberry more because it’s written that it has antioxidants [...]”
<i>Not specific about content (disadvantage)</i>	6	“[...] so it doesn’t have trans-fat, but go there and see if there isn’t hydrogenated fat. It’s something that makes it difficult, isn’t it?! So for having traces, I think it should be specified that it has.”	-	-
<i>Encourages purchase (disadvantage)</i>	-	-	5	“[...] the guy puts that information to grab the consumer’s attention and buy it [...]”
<b>Control Beliefs</b>				
<i>Do not feel it is easy or difficult</i>	6	“[...] if it is written there it doesn’t make any difference to me, because I will see the label anyway [...]”	-	-
<i>Distrust nutritional claims (difficulty)</i>	1	“[...] it says it’s rich, fortified and such, but I’m not sure when reading the label, I don’t know if that quantity is right [...] or if it is just for saying it has a quantity i to sell.”	-	-
<i>Facility in accessing the claim (facility)</i>	1	“[...] it needs to be, I don’t know, without lactose, just by seeing the claim, she goes right to it, so it is a facility [...]”	-	-
<i>More visible/larger letters (facility)</i>	-	-	3	“For claims to be more visible on the package [...] It’s already there on front [...]”
<i>Not specific about the content (difficulty)</i>	-	-	4	“I sometimes get curious, it says there it is rich in amino acids or essential fatty acids. Ah, but which one? [...]”
<b>Normative Beliefs</b>				
<i>Food product producers (like)</i>	7	“[...] I think that people who would most like me to be taken by nutritional claims are those who make those products, because they print that precisely for you to just look and buy.”	4	“[...] but in the case of claims it is the company itself, because this shows what it wants you to see, what’s she wants to call your attention.”

Subtitle: Nº = number of citations; \*Focus Group 1 = had already studied the theme “Nutritional labeling” in college; †Focus Group 2 = had still not studied the theme “Nutritional labeling” in college

## **Nutritional information**

### **Behavioral beliefs**

Two modal salient behavioral beliefs were identified in each focus group, one of which was common to the groups: “know the product’s composition”. The groups did not identify any disadvantages of using nutritional information about food.

### **Control beliefs**

In relation to control beliefs, participants’ in both focus groups reported encountering various difficulties when analyzing nutritional information when purchasing prepackage food products. In total, three modal salient control beliefs were identified in the first group and two in the second.

### **Normative beliefs**

Modal salient normative beliefs were identified in both groups. However, three beliefs were identified in group 2 and two in group 1.

Participants in both groups mentioned that their parents would like them to use nutritional information when buying a product. People in group 2 also mentioned that health professionals would most approve the use of this information.

## **Nutritional claims**

### **Behavioral beliefs**

Two modal salient behavioral beliefs were identified in each group, and one was common to both groups: “product more expensive”. Both focus groups reported that nutritional claims made prepackage food products more expensive, which was considered a disadvantage.

### **Control beliefs**

In relation to nutritional claims, many participants of the first focus group did not mention factors that facilitate or impede them at the purchasing moment. Participants from the second focus group evidenced as factor to facilitate the larger and more visible letters used in nutritional claims, which are different from the lettering used in nutritional information, that they judged to be too small.

### **Normative beliefs**

Only one modal salient normative belief was identified: “food product producers”. Prepackage food

product producers were mentioned in both groups as people who would approve of the use of nutritional claims on packaging.

## **DISCUSSION**

Reading of nutritional information and claims at the time of purchasing is a habit reported by all the students, with the exception of one who did not read nutritional claims. Considering that in this study the participants in the focus groups were students of nutrition, it was expected that they would read nutritional information and claims, since this course addresses, among other subjects, the importance of healthy eating and reading food labels. This behavior also seems to occur among other populations. Turkish consumers showed interest and considered reading of nutritional information to be important<sup>10</sup>.

In relation to behavioral beliefs, participants from both groups reported as an advantage the use of nutritional information, the possibility to know more about a food’s composition, since it allows them to choose a product that has nutrients that best provide what they want. It should be emphasized that nutritional information has been considered a valuable tool in the nutritional education of consumers, since they recognize it is important and necessary to have these statements on food labels.

Nutritional information makes a product’s contents explicit and allows comparison with the nutritional claims. This allows consumers to assume that a product may not be as appropriate as advertising claims, revealing possible contradictions between nutritional claims and information. This was an advantage indicated by group 1. Another advantage presented by the majority of the second focus group was the possibility that nutritional information would lead to the selection of healthier foods. Other studies also found that nutritional information led to this<sup>11</sup>.

One disadvantage of nutritional claims raised by both focus groups is that prepackage food products that have them are normally more expensive. Participants believed that these claims are a tool that companies use to attract consumers and present their product as better because it has a particular property, for which reason the price is higher. Another study among 25 UK-based female nutrition information users aged 23-35 years found

that nutritional claims were considered to be marketing strategies<sup>12</sup>.

When asked about control beliefs, the interpretation of portion sizes was mentioned as a difficulty by both groups. In focus group 1, this difficulty was determined by the inability to perceive that the portion sizes presented in the tables on food packaging are relative to a specific quantity, and not to the whole package. Yet, members of group 2 considered it difficult to use the tables to calculate the quantity they wanted to consume. Miller and Cassady<sup>13</sup>, recognizing the difficulty in interpreting these portions, discussed and identified opportunities to improve this aspect of nutritional information on food labels. Among these improvements would be markings on the package indicating portion size and how much that would represent in comparison to the whole package, thereby how many portions there are in the package.

Other aspect emerged from the second focus group related to the printing of nutritional information, because they found the tables and letters to be too small and, sometimes, even blurred, making reading difficult. This shows the need to change the presentation of nutritional information on food labels, requiring bigger tables and letters with less complex data.

Among the participants from group 1 who mentioned having a facility in using health claims, fast access to information was cited. This was classified as important, because this facilitates purchasing decisions. Focus group 2 identified the use of larger and more visible letters to present health claims as facilitating a decision. It was suggested that any structured and legible presentation of key nutrient and energy information on the front-of-pack label is sufficient to enable consumers to detect a healthier alternative within a food category when provided with foods<sup>14</sup>.

In relation to normative beliefs, parents were mentioned as people who would like participants to use nutritional information at the time of purchase. However, the first group mentioned this is not always positive, because some parents considered that this makes shopping more time consuming and normally leads to choosing more expensive products. The groups also mentioned that siblings would also approve using the information, because they see the participants as reference in the family because they are nutrition students, so they can thus teach the family members

some nutrition concepts. All these aspects were also observed by Lim et al<sup>15</sup> that studied the mainly beliefs explaining nutrition label use of 275 female college students from a university in Seoul, Korea. This shows that people who have closer ties and who have lived together with participants can have a greater influence on the use of nutritional information and claims.

Other family members, beyond parents and siblings, also approved that participants from the second focus group paid attention to nutritional information when buying food. Moreover, in this group health professionals were mentioned as those who would most approve of the use of this information, since they help to choose foods more appropriate for consumers' health.

Both focus groups in this study identified prepackage food product manufactures as those who would certainly approve of the use of health claims on packages, since they may influence consumers to buy their products. This aspect was also revealed in the study of Wahlich et al<sup>12</sup>, since the participants of the focus group believed that food producers used nutritional claims as a strategy to disclose particular information that they believed important when influencing consumers to acquire their product.

Based on these findings, some limitations were observed in this study, and are related to that only two focus groups were conducted with college students studying nutrition. Therefore, the results may not reflect modal salient beliefs of other students or consumers. Thus, generalizations must be made cautiously. Nevertheless, considering that beliefs change over time, future focus groups and monitoring could be done with participants from focus group 2 to identify possible changes in modal salient beliefs after they attend the course that involves "food labeling".

## CONCLUSION

Modal salient behavioral, normative and control beliefs in this study are related to participants' behavior in relation to the use of nutritional information and claims at the time of purchase. Eleven modal salient beliefs were identified that relate to the use of nutritional information when buying prepackage food products and nine modal salient beliefs related to health claims. When considering the two focus groups, some differences and similarities

were observed between the beliefs identified, mainly between behavioral and control beliefs, demonstrating the importance of considering different consumer groups to better understand this subject.

Results from this study can contribute to a reflection by responsible authorities, and professionals in the field and by the food industry about how nutritional information and nutritional claims are presented to consumers. It is believed that the use of these elements can be improved by standardizing formats and greater coherence of labels contents. Furthermore, better legibility of nutritional information is essential at the time of purchase.

Based on this knowledge of consumer beliefs, it is possible to develop actions and measures aimed at health education, to increase consumer knowledge and so that nutritional information and claims are more realistic. Considering the results of this study, a point to be highlighted could be the interpretation of information present on food labels and how to use them to choose healthier or more appropriate products, according to the state of health of each individual.

Future studies with consumers with other profiles could be made, to increase understanding of beliefs about nutritional information and claims. However, the modal salient beliefs identified in this study can already be used as research tools to better understand consumer behavior about the use of nutritional information and claims when buying prepackage food products. Future studies with this focus could be conducted with consumers, to identify psychosocial predictors of the realization of this behavior.

## REFERENCES

1. World Health Organization - WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO. Food labelling. 5.ed, Rome: WHO/FAO; 2007. Available in: <http://www.fao.org/docrep/010/a1390e/a1390e00.htm>
2. Temple NJ, Fraser J. Food labels: a critical assessment. *Nutrition*. 2014, 30(3):257-60. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.06.012>
3. Hawkes C. Nutrition labels and health claims: the global regulatory environment. Geneva: World Health Organization; 2004. Available in: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42964/1/9241591714.pdf>
4. Christoph MJ, An R, Ellison B. Correlates of nutrition label use among college students and young adults: a review. *Public Health Nutr*. 2016;19(12):2135-48. <https://doi.org/10.1017/S1368980015003183>
5. Fishbein M, Ajzen I. Predicting and changing behavior: the reasoned action approach. 1.ed New York: Psychology Press. Taylor & Francis group; 2010. <https://doi.org/10.4324/9780203838020>
6. Conner M, Sparks P. Theory of Planned Behaviour and Health Behaviour. In: Conner M, Norman P, editors. Predicting Health Behaviour. 2.ed. New York: Open University Press; 2005. p. 170-222. Available in: [https://soh.iuums.ac.ir/uploads/32\\_282\\_44\\_13.pdf](https://soh.iuums.ac.ir/uploads/32_282_44_13.pdf)
7. Kitzinger J. Focus groups with users and providers of health care. In: Pope C, Mays N, editors. Qualitative Research in Health Care. 2.ed. London: BMJ Books; 2000. p. 20-29.
8. Brazilian Market Research Association. Brazilian Economic Classification Criteria. 2015 and social class distribution update for 2016. Available in: [www.abep.org/Servicos/Download.aspx?id=13](http://www.abep.org/Servicos/Download.aspx?id=13)
9. Gagné C, Godin G. Les théories sociales cognitives: guide pour la mesure des variables et le développement de questionnaire. Québec: Bibliothèque Nationale. 1999. Available in: <https://pdfs.semanticscholar.org/0e2b/2f92f199f9f6939fb7b0bde04c80856ca90e.pdf>
10. Besler HT, Buyuktuncer Z, Uyar MF. Consumer understanding and use of food and nutrition labeling in Turkey. *J Nutr Educ Behav*. 2012;44(6):584-91. <https://doi.org/10.1016/j.jneb.2012.01.005>

11. Cooke R, Papadaki A. Nutrition label use mediates the positive relationship between nutrition knowledge and attitudes towards healthy eating with dietary quality among university students in the UK. *Appetite*. 2014;83:297-303. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2014.08.039>
12. Wahlich C, Gardner B, McGowan L. How, when and why do young women use nutrition information on food labels? A qualitative analysis. *Psychol Health*. 2013;28(2):202-216. <https://doi.org/10.1080/08870446.2012.716439>
13. Miller LM, Cassady DL. The effects of nutrition knowledge on food label use. A review of the literature. *Appetite*. 2015;92:207-16. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2015.05.029>
14. Hodgkins CE, Raats MM, Fife-Schaw C, Peacock M, Gröppel-Klein A, Koenigstorfer J et al. Guiding healthier food choice: systematic comparison of four front-of-pack labelling systems and their effect on judgements of product healthiness. *Br J Nutr*. 2015;113(10):1652-63. <https://doi.org/10.1017/S0007114515000264>
15. Lim HJ, Kim MJ, Kim KW. Factors associated with nutrition label use among female college students applying the theory of planned behavior. *Nutr Res Pract*. 2015;9(1):63-70. <https://doi.org/10.4162/nrp.2015.9.1.63>





# Análise comparativa da rotulagem das embalagens de melados de cana-de-açúcar com a legislação vigente

## Comparative analysis of the sugarcane syrup package labeling with the current legislation

RIALA6/1773

Carolina Medeiros VICENTINI-POLETTE<sup>1\*</sup>, Maria Teresa Mendes Ribeiro BORGES<sup>2</sup>, Marta Regina VERRUMA-BERNARDI<sup>2</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>2</sup>Departamento de Tecnologia Agroindustrial e Socioeconomia Rural, UFSCar, Rodovia Anhanguera, km 174 Araras, SP, Brasil, CEP: 13600-970. Tel: 19 3543 2614. E-mail: [vicentini-polette@outlook.com](mailto:vicentini-polette@outlook.com)

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Agroecologia e Desenvolvimento Rural, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos

Recebido: 13.06.2018 - Aceito para publicação: 22.05.2019

### RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar as informações contidas no rótulo de embalagem de melados de cana-de-açúcar disponíveis no mercado, seguindo-se as regulamentações vigentes no Brasil. As marcas dos melados indicaram nos respectivos rótulos, a denominação, os dados, a origem e a validade dos produtos. Contudo não houve a apresentação do padrão de rotulagem quanto à tabela nutricional de melado de cana-de-açúcar, e seis (40%) das marcas avaliadas não indicaram todas as informações requisitadas. Dada a importância da rotulagem para o entendimento e o conhecimento do produto e na sua compra consciente pelo consumidor, bem como na relevância destas informações para a valorização do produto, fica evidente a necessidade de efetuar estudos abrangentes sobre o assunto, a fim de regularizar a rotulagem de forma fiável, considerando-se que esta seja uma fonte segura de informação ao consumidor.

**Palavras-chave.** rotulagem de alimentos, rotulagem nutricional, qualidade de alimentos, embalagem de alimentos.

### ABSTRACT

This study aimed at evaluating the information contained in the label of the commercial sugarcane syrup, in accordance with the prevailing regulations in Brazil. All of the samples presented the denomination, the origin data, and the validity, in their respective labels. However a no labeling standard for the nutritional table of sugarcane syrup was shown, and six (40%) of the evaluated brands did not indicated all of the required information. Given the importance of labeling for the customer understanding and for the conscious buying, and also the relevance of this information for the product appreciation, it becomes evident the need for performing the comprehensive studies on the product, in order to regulate the labeling to become reliable, and being a safe source for consumer information.

**Keywords.** food labeling, nutritional labeling, food quality, food packaging.

## INTRODUÇÃO

O melado também chamado de xarope ou mel de cana é definido como um líquido xaroposo obtido pela evaporação do caldo de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L). Não deve ser fermentado; deve estar isento de matéria terrosa, parasitas e outras sujidades, com aspecto líquido viscoso, coloração amarelo-ambar, aroma próprio, gosto doce sem adição de essências, corantes naturais ou artificiais, conservadores e edulcorantes<sup>1</sup>.

O rótulo de um produto é fonte de informação ao consumidor para compra. Bendino et al<sup>2</sup> afirmaram que há dificuldades por parte dos consumidores para interpretar as informações contidas nos rótulos dos alimentos e na tabela de informações nutricionais, dado que cerca de 70% declararam entender parcialmente as informações contidas nos rótulos dos alimentos. O valor calórico é a informação mais compreendida; o sódio, a mais negligenciada pelos consumidores avaliados. Verificou-se que os consumidores com menor grau de escolaridade apresentaram desconfiança quanto às informações contidas no rótulo e na tabela nutricional, o que pode ser justificado pela falta de compreensão dos termos utilizados e a importância deles.

De acordo com Araújo<sup>3</sup>, os rótulos alimentícios, sejam gerais ou nutricionais, são regulamentados visando à promoção de escolhas saudáveis de alimentação, permitindo que os consumidores alcancem a garantia de segurança alimentar e nutricional ao se analisar e comparar informações inscritas nas embalagens dos alimentos; é indispensável que a rotulagem apresente informações sérias e fidedignas, sendo aliada ao consumo alimentar equilibrado e sadio do ser humano.

No Brasil, existem diversas normas que regulamentam a rotulagem de alimentos. De acordo com a RDC nº 259 todo alimento que seja comercializado embalado na ausência do cliente e pronto para oferta deve ser rotulado segundo o regulamento, no idioma do país de origem e não devem conter vocábulos ou objetos que possam tornar a informação incorreta, insuficiente ou que induza ao equívoco em relação a qualquer informação, atributo ou utilização do produto e suas origens<sup>4</sup>.

De forma complementar, a RDC nº 360 regulamenta a rotulagem nutricional de alimentos embalados, possibilitando ao consumidor conhecer

as propriedades nutricionais dos alimentos por meio dela, de forma definida, que deve estar presente em alimentos embalados e comercializados<sup>5</sup>.

Por padronização, as unidades que devem ser utilizadas na rotulagem nutricional são: quilocalorias (kcal) e quilojoules (kJ) para valor energético, gramas (g) para proteínas, carboidratos, gordura e fibra alimentar, miligramas (mg) para sódio e colesterol, miligramas (mg) ou microgramas (µg) para vitaminas e minerais. É obrigatório que os valores sejam dados pela porção adequada ao uso para massa (gramas: g) ou volume (mililitros: mL) e, medidas caseiras; também obrigatório, o Valor Diário (VD%), exceto para gordura *trans*<sup>5</sup>.

O cálculo do VD% considera tanto os Valores Diários de Referência de nutrientes (VDR) como os de Ingestão Diária Recomendada (IDR). Deve apresentar a advertência que tais valores podem variar dependendo das necessidades energéticas particulares<sup>5</sup>.

Se um alimento possui propriedades nutricionais é possível inserir no rótulo Informações Nutricionais Complementares particulares (INC); em caráter optativo, seu teor de vitaminas e minerais<sup>6</sup>.

A RDC nº 360 e a 54 especificam que os alimentos com INC não podem ser apresentados de maneira que levem a interpretação errônea, que possam incentivar o consumo excessivo de determinados alimentos e, sugeriram que o alimento seja nutricionalmente completo<sup>5,6</sup>.

Existem também leis que regulamentam a informação da presença ou não de componentes potencialmente alergênicos de forma clara e destacada. São exemplos: glúten em qualquer quantidade, lactose se acima de 100 miligramas por 100 gramas ou mililitros e diversos outros componentes citados na RDC nº 26, tais como: castanhas, soja e leite<sup>7-9</sup>.

Considerando o melado de cana-de-açúcar como produto de interesse com poucas informações ao público consumidor, neste estudo foi avaliado se as embalagens das marcas estavam adequadas ao regulamento específico para alimentos embalados (denominação do produto, validade, lote, conteúdo líquido, lista de ingredientes, instruções de armazenamento, dados do produtor e/ou distribuidor e origem do produto). Além da existência e adequação da rotulagem nutricional, informação nutricional complementar, advertência quanto à presença de glúten e lactose no produto e se há a indicação da possibilidade de alergênicos por contaminação cruzada.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Método

Foi realizada pesquisa qualitativa de caráter expositivo, informativo e comparativo.

### Obtenção das marcas

Foram adquiridos 15 frascos de marcas de melados de cana-de-açúcar em mercados, feiras e lojas *online*. O período de aquisição foi de maio a julho de 2017 e as análises foram realizadas de junho a agosto do mesmo ano. As marcas foram procedentes dos estados: São Paulo (A, H e K), Paraná (B, E e G), Santa Catarina (C, F e J), Rio Grande do Sul (D, I e L), Mato Grosso do Sul (M e N) e Rio de Janeiro (O).

### Análise da rotulagem

Os rótulos das marcas de melados foram avaliados e comparados com os regulamentos, RDC n<sup>o</sup>: 259, 360, 54, 26, 136, e Lei n<sup>o</sup> 10.674,<sup>4-9</sup> e também, com a Tabela de Composição de Alimentos (TACO)<sup>10</sup>. Foram verificadas as informações obrigatórias para alimentos

embalados como: denominação do produto, validade, lote, conteúdo líquido, lista de ingredientes, instruções de armazenamento, dados do produtor e/ou distribuidor, origem do produto, a advertência “contém glúten”, e tabela nutricional (porção e medida caseira, valor energético, carboidratos, proteínas, gorduras totais, saturadas e trans, fibra alimentar, e informação nutricional complementar).

Para fins de comparação entre as marcas e discussão foi considerada uma porção de melado como uma colher de sopa (20 gramas).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na **Tabela 1** são apresentadas as informações da presença ou não dos itens obrigatórios no rótulo de alimentos embalados. Obrigatoriamente, o rótulo deve especificar: a denominação de venda do alimento, lista de ingredientes incluindo aditivos alimentares, conteúdos líquidos, identificação da origem, nome ou razão social do produtor, identificação do lote, prazo de validade e instruções sobre o preparo e uso do alimento, quando necessário<sup>4</sup>.

**Tabela 1.** Conteúdo dos rótulos das embalagens das 15 diferentes marcas de melado de cana-de-açúcar relativo à presença ou não de informação dos itens obrigatórios

Marca	Den	Val	Lot	Ctd	TN	Arm	Ing	Glú	Org
A	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B	S	S	S	S	S	S	S	S	S
C	S	S	S	S	S	S	S	S	S
D	S	S	S	S	S	NI	S	S	S
E	S	S	S	S	S	S	S	S	S
F	S	S	NI	S	S	S	S	S	S
G	S	S	S	S	S	S	S	S	S
H	S	S	S	S	S	S	S	S	S
I	S	S	S	S	S	S	S	S	S
J	S	S	S	S	S	S	S	S	S
K	S	S	S	S	S	S	S	S	S
L	S	S	S	S	S	NI	S	S	S
M	S	S	NI	S	S	S	S	S	NI
N	S	S	NI	S	NI	NI	NI	NI	NI
O	S	S	NI	S	NI	NI	S	S	NI

NI= valor não informado; S= valor informado; Den= denominação do produto; Val= prazo de validade; Lot = lotes de produção; Ctd = conteúdo líquido; TN= tabela nutricional; Arm= orientação de armazenamento; Ing= ingredientes; Glu= advertência: contém de glúten; Org= dados de origem e produção

Os rótulos das 15 (100%) diferentes marcas de melados apresentaram: denominação do produto, data de validade, conteúdo líquido e dados de origem e produção. Dentre as marcas: 4 (27%) não apresentaram a identificação de lote e modo de armazenamento; 2 (13%) não constava a tabela nutricional obrigatória, 3 (20%) não continha a advertência “contém glúten” e 6 (40%) apresentaram todas as informações obrigatórias no rótulo.

As marcas M e N foram as que apresentaram menos informações ou dados incompletos, e isso pode ser atribuído pelo fato de serem as únicas de produção e envasamento artesanal.

Quando existentes, a descrição de aditivos alimentares deve constar a função principal ou fundamental do aditivo no alimento e/ou seu nome completo ou seu número INS (Sistema Internacional de Numeração FAO/OMS)<sup>4</sup>. Três marcas apresentam ácido cítrico como aditivo, sendo apenas citado na lista de ingredientes da marca B como “ácido cítrico”, da F como “suco de limão” e declarado como acidulante na J. O ácido cítrico é um importante aditivo no melado, uma vez que dificulta a cristalização do xarope pela quebra da molécula de sacarose em glicose e frutose<sup>11</sup>. Porém, a Resolução 12/33 de 1978 estipula que não é permitida a adição de essências, corantes naturais ou artificiais, conservadores ou edulcorantes no melado de cana<sup>1</sup>. A marca J também continha na lista de ingredientes: caldo de cana, a adição de sacarose e glicose.

Na identificação de origem deve ser indicado o nome do fabricante, produtor, fracionador ou titular da marca e seu endereço completo, além do número de registro ou código de identificação do estabelecimento fabricante junto ao órgão competente<sup>4</sup>.

Todas as marcas forneceram o nome do produtor e ou comerciante, o Cadastro Nacional de Pessoa Jurídica (CNPJ) e endereço. Dependendo do local de origem também foi fornecido número de inscrição estadual ou cadastro municipal de saúde.

Para produtos que possuem prazo de validade superior a três meses, é necessário especificar ao menos o mês e o ano de vencimento. Caso existam condições especiais para sua conservação, antes ou após abertura da embalagem, deve ser incluída uma legenda com caracteres bem legíveis, indicando as precauções necessárias para manter suas características normais<sup>4</sup>. As marcas de

melado apresentaram prazos de validade variando entre três meses (marca M) e dois anos (marcas E, F e H). Três marcas não apresentaram a data de fabricação junto ao lote, não sendo possível a identificação da vida útil do produto (marcas A, G e J). Os melados J e O apresentaram data de validade com apenas mês e ano, embora tenham prazo superior a três meses. Com exceção da marca J, todas as datas de validade estavam claramente visíveis.

Quanto às orientações de armazenamento, das 15 marcas, três não forneceram orientações (marcas L, N e O), enquanto seis recomendaram o armazenamento em local seco e fresco ou arejado ou temperatura ambiente (A, B, C, E, I e K), cinco definiram 30 ou 60 dias como um novo limite para consumo (B, C, F, H, e J), quatro indicaram refrigeração após abertura (F, H, J e M), uma marca (G) orientou a evitar temperaturas acima de 40°C, e a marca D indicou a fervura do xarope em caso de cristalização.

No Brasil há também regulamento para composição do painel principal, devendo constar a denominação de venda do alimento, sua qualidade, pureza (quando regulamentada), e conteúdo do produto em conjunto com o desenho, quando existente. É obrigatório que as informações estejam em contraste de cores que assegure sua correta visibilidade e que o tamanho das letras e números, exceto a indicação dos conteúdos líquidos, não seja inferior a 1 mm<sup>4</sup>. Quanto a esses parâmetros, a marca J, não apresentou visibilidade do lote e prazo de validade, uma vez que foi necessário esvaziar a embalagem, ou virá-la de forma que não houvesse melado nos últimos centímetros do recipiente, para que as informações fossem legíveis, dado que estavam apenas gravadas no plástico, sem qualquer contraste ou destaque.

A RDC n°360 exige que sejam declaradas o valor energético, carboidratos, proteínas, gorduras totais, gorduras saturadas, gorduras *trans*, fibra alimentar e sódio<sup>5</sup>. Optativamente, podem ser declarados os minerais, as vitaminas e outros nutrientes quando em quantidade igual ou maior a 5% da Ingestão Diária Recomendada (IDR) por porção indicada no rótulo<sup>5</sup>.

Para cálculo dos valores nutricionais, devem ser utilizados os valores e fatores de referência da composição, na disposição o realce e a ordem da

informação nutricional devem estar baseados na RDC nº360, a qual determina que a informação nutricional apareça agrupada, estruturada em forma de tabela, com os valores e as unidades em colunas, ou em forma linear no caso de espaços não suficientes<sup>5</sup>. Nenhuma marca rotulada com a tabela nutricional (13 marcas) indicou presença de proteínas, gorduras totais, gorduras saturadas e gordura trans. A marca A indicou teor de fibras (3g). Embora a TACO<sup>10</sup> especifique que não há lipídeos, proteínas e fibras no melado, é possível que sejam encontradas pequenas fibras provenientes da cana-de-açúcar, o que pode justificar os 3g apresentados na rotulagem da marca A.

Quanto ao valor energético, a que apresentou maior valor foi a marca A (100 kcal), enquanto a marca G apresentou apenas 15 kcal por porção. Desconsiderando os dois extremos, a média encontrada para o valor energético foi 58 kcal em 20 g de melado. Para carboidratos, os extremos foram novamente às marcas A(25 g) e G(3,6 g). Excetuando esses extremos, a média indicada para carboidratos foi 15g por porção. A TACO<sup>10</sup> especifica que, para 20 g, são encontrados 59,4 kcal e 15,32g de carboidratos. Desta maneira embora as médias estejam próximas do recomendado, existe uma variação significativa na composição do produto. Nogueira et al<sup>12</sup> analisaram minerais

de diversos melados comerciais, e encontraram valores diferentes dos definidos pela TACO<sup>10</sup>. Melados feitos com caldos contendo teores iguais de determinado mineral podem apresentar teores diferentes deste mineral, mesmo que o Brix ou o teor de umidade dos melados sejam semelhantes, uma vez que a concentração de cada caldo depende do teor de açúcar inicialmente presente nesse caldo<sup>12</sup>.

Dentre as 13 marcas com rótulo nutricional três não apresentaram informações de INC (G, J e L). De acordo com a RDC nº 54, é considerada INC qualquer representação que afirme, sugira ou implique que um alimento possui propriedades nutricionais particulares, não sendo consideradas a menção de substâncias na lista de ingredientes e como parte obrigatória da rotulagem nutricional, nem a declaração de alguns nutrientes, ingredientes ou do valor energético no rótulo. Porém, a quantidade de qualquer nutriente sobre o qual se faça uma INC deve ser obrigatoriamente declarada na Tabela de Informação Nutricional, e no caso de açúcares a quantidade deve estar indicada abaixo dos carboidratos<sup>6</sup>.

Os nutrientes indicados são variados, sendo isto devido à variabilidade do próprio produto, ou falta de padronização da rotulagem nutricional (**Tabela 2**).

**Tabela 2.** Nutrientes declarados nos rótulos das embalagens das amostras de melado de cana-de-açúcar

Amostra	Nutrientes(mg/20g)					
	Ferro	Cálcio	Magnésio	Fósforo	Vitamina B6	Potássio
A	2,0	NI	NI	NI	NI	NI
B	4,0	NI	NI	NI	NI	NI
C	2,0	NI	NI	NI	NI	NI
D	1,1	NI	NI	NI	NI	NI
E	2,1	6,6	NI	NI	NI	NI
F	2,0	40,0	NI	NI	NI	NI
H	1,1	20,0	23,0	15,0	NI	NI
I	5,0	118,0	NI	24,6	NI	NI
K	0,8	41,0	32,0	25,0	0,1	30,6
M	0,5	8,7	NI	NI	NI	NI

NI: valor não informado



As 10 marcas que apresentaram INC indicaram presença de ferro, sendo, numa porção de 20 g de melado, a marca I com a maior quantidade do mineral (5 mg), e a M com o menor teor (0,5 mg). Excluindo-se esses extremos, a média calculada para ferro nas rotulagens das 13 demais marcas foi de 2 mg por porção.

As marcas E, F, H, I, K e M indicaram teor de cálcio, porém com valores variando de 6,6 a 118 mg. O magnésio estava citado em 3 rótulos, variando de 15 a 25 mg por porção. A TACO<sup>10</sup> relata 20,4 mg de cálcio e 24 g de magnésio na mesma porção, evidenciando mais uma vez a grande variação na rotulagem nutricional deste produto. A vitamina B6, assim como o potássio, foi citada por apenas uma marca (K e I, respectivamente).

Nenhuma marca especificou características nutricionais de forma destacada, apresentou INC em local outro que não a tabela nutricional, e de nenhuma forma levou ao mau entendimento. O fato das características inerentes do melado serem muito variadas, devido à diferença da matéria prima e do processamento, pode dificultar o processo de identificação e divulgação de seus benefícios.

O melado de cana-de-açúcar, por sua composição intrínseca, não possui glúten. Das 15 marcas analisadas, 12 continham o aviso “não contém glúten” de forma claramente visível, e três não apresentaram a informação (marcas M, N e O). De mesma forma, o aviso de lactose em melados de cana-de-açúcar não é necessário, exceto em caso de alta contaminação cruzada<sup>8</sup>, pois assim como no caso do glúten a substância não faz parte de sua composição. Ainda assim, a marca C apresentou o aviso “não contém lactose”, junto ao “não contém glúten”, de forma destacada.

Uma vez que o melado de cana-de-açúcar não contém nenhum alergênico em sua formulação, sendo um produto de único ingrediente, é necessário se atentar aos casos em que não for possível garantir a ausência de contaminação cruzada dos alimentos, ingredientes, aditivos alimentares ou coadjuvantes de tecnologia por alérgenos alimentares, devendo constar no rótulo a declaração “Alérgicos: pode conter” quando aplicável à situação<sup>9</sup>. Este aviso não foi encontrado em nenhuma das marcas analisadas, seja por não haver o risco de contaminação cruzada no local de produção, envasamento, ou por

desconhecimento.

## CONCLUSÃO

Sendo o melado um alimento de produção tanto artesanal como industrial, e sujeito à variabilidade da matéria prima, e considerando o melado de cana-de-açúcar como produto de interesse com poucas informações ao público consumidor, é de extrema importância sua regulamentação, em particular quanto à rotulagem, que deve ser fiável, uma vez que é a principal fonte de informação ao consumidor.

Entretanto, nossos resultados evidenciaram que não há um padrão de rotulagem quanto à tabela nutricional de melado de cana-de-açúcar, especialmente quanto ao valor energético, sódio e informação nutricional complementar. Assim, fica clara a necessidade de estudos abrangentes sobre a composição e rotulagem do melado de cana-de-açúcar, bem como de legislação específica e atualizada para o produto.

## REFERÊNCIAS

1. Ministério da Saúde (BR). Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Resolução nº 12, de 24 de julho de 1978. Normatização brasileira relativa a açúcar mascavo, melado e rapadura. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 24 jul 1978. Seção 1. Disponível em: [http://www.editoramagister.com/doc\\_308643\\_RESOLUCAO\\_N\\_12\\_DE\\_MARCO\\_DE\\_1978.aspx](http://www.editoramagister.com/doc_308643_RESOLUCAO_N_12_DE_MARCO_DE_1978.aspx)
2. Bendino NI, Popolim WD, Oliveira, CRA. Avaliação do conhecimento e dificuldades de consumidores frequentadores de supermercado convencional em relação à rotulagem de alimentos e informação nutricional. *J Health Sci Inst*. 2012;30(3):261-5. Disponível em: [https://www3.unip.br/presencial/comunicacao/publicacoes/ics/edicoes/2012/03\\_jul-set/V30\\_n3\\_2012\\_p261a265.pdf](https://www3.unip.br/presencial/comunicacao/publicacoes/ics/edicoes/2012/03_jul-set/V30_n3_2012_p261a265.pdf)
3. Araújo WDR. Importância, estrutura e legislação da rotulagem geral e nutricional de alimentos industrializados no Brasil. *Rev Acad Conecta FASE*. 2017;2(1):35-50. Disponível em: <http://revista.fasf.edu.br/index.php/conecta/article/view/49/pdf>
4. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 259, de

- 20 de setembro de 2002. Regulamento Técnico sobre Rotulagem de Alimentos Embalados. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 23 jan 2002. Seção 1(148):33. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC\\_259\\_2002.pdf/e40c2ecb-6be6-4a3d-83ad-f3cf7c332ae2](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_259_2002.pdf/e40c2ecb-6be6-4a3d-83ad-f3cf7c332ae2)
5. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 25 dez 2003. Seção 1(251):33. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/res0360\\_23\\_12\\_2003.pdf/5d4fc713-9c66-4512-b3c1-afee57e7d9bc](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/res0360_23_12_2003.pdf/5d4fc713-9c66-4512-b3c1-afee57e7d9bc)
  6. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 54, de 12 de novembro de 2012. Regulamento Técnico sobre Informação Nutricional Complementar. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 12 nov 2012. Seção 1(219):122. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0054\\_12\\_11\\_2012.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0054_12_11_2012.html)
  7. Ministério da Saúde (BR). Lei nº 10.674, de 15 de maio de 2003. Obriga a que os produtos alimentícios comercializados informem sobre a presença de glúten, como medida preventiva e de controle da doença celíaca. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 16 mai 2003. Seção 1:1. Disponível em: [https://www.camara.leg.br/proposicoesWeb/prop\\_mostra\\_rintegra?codteor=440852&filename=Legislacao](https://www.camara.leg.br/proposicoesWeb/prop_mostra_rintegra?codteor=440852&filename=Legislacao)
  8. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 136, de 08 de fevereiro de 2017. Requisitos para declaração obrigatória da presença de lactose nos rótulos dos alimentos. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 09 fev 2017. Seção 1(29):44. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2955920/RDC\\_136\\_2017\\_.pdf](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2955920/RDC_136_2017_.pdf)
  9. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 26, de 02 julho de 2015. Dispõe sobre os requisitos para rotulagem obrigatória dos principais alimentos que causam alergias alimentares. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 03 jul 2015. Seção 1(125):52. Disponível em: <http://segurancaalimentar.mprs.mp.br/alergenicos/RDC-26-2015.pdf>
  10. Unicamp (Campinas – Brasil). Tabela brasileira de composição de alimentos - TACO. 4. ed. rev. e ampl. Campinas (SP): UNICAMP/NEPA; 2011. 161 p. [Acesso 2018 Jun 01]. Disponível em: [https://www.cfn.org.br/wp-content/uploads/2017/03/taco\\_4\\_edicao\\_ampliada\\_e\\_revisada.pdf](https://www.cfn.org.br/wp-content/uploads/2017/03/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada.pdf)
  11. Emidio JE. Hidrólise enzimática na fabricação de melado de cana-de-açúcar [dissertação de mestrado]. Araras (SP): Universidade Federal de São Carlos; 2016. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/7956>
  12. Nogueira FS, Ferreira KS, Carneiro Junior JB, Passoni LC. Minerais em melados e em caldos de cana. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2009;29(4):727-31. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cta/v29n4/05.pdf>



# ***Listeria* spp. em queijos Minas Frescal e avaliação das condições higiênicossanitárias de produção e comercialização em Viçosa, MG, Brasil**

## *Listeria* spp. in Minas Frescal cheeses and assesement of hygienic-sanitary conditions of production and commercialization in Viçosa, MG, Brazil

RIALA6/1774

Mariana Barboza VINHA<sup>1\*</sup>, Cláudia Lúcia de Oliveira PINTO<sup>2</sup>, Maria Cristina Dantas VANETTI<sup>3</sup>, José Benício Paes CHAVES<sup>4</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural, Rua Afonso Sarlo, 160, Bento Ferreira, Vitória, ES, CEP: 29052-010. E-mail: [mariana\\_vinha@hotmail.com](mailto:mariana_vinha@hotmail.com)

<sup>2</sup>Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Região Sudeste, Viçosa, MG, Brasil

<sup>3</sup>Departamento de Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil

<sup>4</sup>Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil

Recebido: 21.06.2017 - Aceito para publicação: 27.05.2019

### RESUMO

A produção de queijo Minas Frescal em propriedades rurais é uma atividade econômica importante em Minas Gerais. Entretanto, a presença de micro-organismos patogênicos compromete a segurança desses produtos, coloca a saúde pública em risco e ameaça esta atividade. Neste estudo, objetivou-se avaliar a ocorrência de *Listeria* spp. em queijos Minas Frescal, as condições de produção e comercialização desses produtos e relacioná-las à presença desses micro-organismos. Foram coletadas 161 amostras, 81 em agroindústrias e 80 em seus pontos de venda. Foram utilizados métodos analíticos oficiais estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para detecção e diferenciação das espécies de *Listeria*. A adoção das boas práticas durante a fabricação e a comercialização foi mensurada mediante avaliação *in loco* direcionada por listas de verificação pré-elaboradas. Constatou-se *Listeria* spp. em 14 amostras (8,7%) provenientes de oito das doze agroindústrias estudadas, quatro inspecionadas e quatro não inspecionadas. *L. monocytogenes* foi isolada em duas amostras. O percentual de atendimento às boas práticas de fabricação variou entre 28,3% e 51,1% e diversas irregularidades foram observadas durante a comercialização dos queijos. Os resultados indicam risco potencial do consumo deste tipo de produto e a necessidade de adoção das boas práticas de fabricação e comercialização para prevenir contaminações.

**Palavras-chave.** inspeção de alimentos, queijo, agroindústria, pasteurização, *Listeria*.

### ABSTRACT

The production of Minas Frescal cheese on rural properties is an important economic activity in Minas Gerais, Brazil. However, the presence of pathogenic microorganisms compromises the safety of these products, puts public health at risk and threatens this activity. The purpose of this paper was to evaluate the conditions of production and commercialization of the Minas Frescal cheese produced in family agroindustries of Viçosa, MG and to connect them to presence of *Listeria* spp. A total of 161 samples of Minas Frescal cheese were collected, 81 which were in agroindustries and 80 in their respective market. Were adopted official analytical methods established by the Agriculture Ministry for the detection and differentiation of *Listeria* spp. The conditions of manufacture and commercialization were evaluated through observations directed by pre-elaborated checklists. *Listeria* spp. was detected in 14 samples (8.7%) from eight different establishment, four inspected and four non-inspected. *L. monocytogenes* was isolated in two samples. The compliance with good manufacturing practices ranged from 28.3% to 51.1% and several irregularities were observed during the marketing of the cheeses. These results indicate the potential risk of consumption of this product and the need to prevent contamination of this product in manufacturing and marketing stages.

**Keywords.** food inspection, cheese, agroindustry, pasteurization, *Listeria*.

## INTRODUÇÃO

A fabricação do queijo Minas Frescal em pequenas queijarias localizadas em propriedades rurais é muito comum no Brasil, em especial no Estado de Minas Gerais. Esta atividade caracteriza-se pela produção em pequena escala, uso de técnicas simples e baixa capacidade tecnológica, e tem como objetivo agregar valor à produção agropecuária desenvolvida na propriedade rural. As pequenas queijarias contribuem para a construção de um modelo de desenvolvimento regional mais equilibrado, geram renda e ocupam a mão de obra. No entanto, para garantir a rentabilidade e sustentabilidade desta atividade é necessário atender as exigências legais e garantir que esses produtos não ofereçam riscos à saúde do consumidor.

O gênero *Listeria* inclui 18 espécies, das quais apenas duas, *L. monocytogenes* e *L. ivanovii*, são patogênicas<sup>1</sup>. Caracterizam-se por bastonetes Gram-positivos, anaeróbios facultativos não formadores de esporos, apresentam motilidade típica a temperatura menor ou igual a 30°C, toleram elevadas concentrações de sal (10%) e podem multiplicar-se em ampla faixa de temperatura (0 °C a 45 °C) e pH (6 e 9)<sup>2</sup>. *Listeria monocytogenes* foi a primeira espécie do gênero a ser descoberta e desde então é a principal espécie patogênica ao homem<sup>3</sup>.

A listeriose, infecção provocada por esse patógeno, pode ocorrer de forma assintomática ou provocar diarreia e febre, quando acomete pessoas imunocompetentes, manifestando-se na forma não invasiva<sup>2</sup>. No entanto, indivíduos imunossuprimidos podem apresentar quadro clínico de listeriose invasiva como septicemia, infecção do sistema nervoso central e listeriose materno-fetal, com alto percentual de casos fatais (20-30%)<sup>2,3</sup>. Em gestantes as principais consequências são aborto, parto pré-maturo, má formação do feto e infecção generalizada no recém-nascido<sup>4</sup>.

O consumo de alimentos contaminados é a principal causa da listeriose humana, visto que o patógeno pode contaminar uma grande variedade de produtos e é capaz de sobreviver em condições adversas como alta acidez, congelamento e alta concentração de sal<sup>2</sup>. Queijos frescos contaminados foram responsáveis por surtos de listeriose, ocorridos entre 1983 e 2016, em diferentes países

da Europa e América do Norte<sup>4,5</sup>. Em 2012, na Espanha, dois surtos de listeriose, que envolveram uma gestante e um recém-nascido, também foram relacionados ao consumo deste tipo de produto<sup>4</sup>. Em Portugal, entre 2009 e 2012, trinta indivíduos apresentaram sintomas de listeriose e 11 foram a óbito pela doença após consumirem queijos frescos<sup>5</sup>. Nos Estados Unidos, entre 1998 e 2011, queijos contaminados provocaram doze surtos de infecção por *L. monocytogenes*, com cinco óbitos, sendo a maior parte deles (66%) associada ao consumo de queijos fabricados com leite pasteurizado<sup>6</sup>.

No Brasil, a listeriose é, ainda, subdiagnosticada e subnotificada<sup>3</sup>. Embora haja evidências da ocorrência e caracterização de estirpes de *L. monocytogenes* isoladas de pacientes no país<sup>3,7</sup>, não foram encontradas informações capazes de estabelecer uma relação entre a doença, suas vias de transmissão e os possíveis alimentos envolvidos. A avaliação de trinta e cinco casos de meningite provocados por *Listeria* spp. ocorrido em São Paulo, entre 1999 e 2015, mostrou que 34,3% dos isolados de pacientes caracterizava-se por *L. monocytogenes* e 65,7% por *Listeria* spp<sup>7</sup>. Embora não haja relação estabelecida entre esses casos de listeriose e o consumo de alimentos, o alto número de isolados de *Listeria* spp. em pacientes com meningite é um alerta para o risco de consumir alimentos contaminados com bactérias desse gênero. É necessário intensificar e aprofundar as pesquisas sobre o patógeno em amostras clínicas e alimentos para mensurar a relevância deste micro-organismo no Brasil e propor medidas de prevenção das contaminações para evitar a ocorrência de casos e surtos<sup>3</sup>.

A presença de *Listeria* spp. em queijos frescos foi relatada no Brasil<sup>8-10</sup>. *L. monocytogenes* foi isolada em amostras de queijo Minas Frescal produzidos em Minas Gerais<sup>10,11</sup> e São Paulo<sup>9</sup>, e está relacionada a contaminações ocorridas durante a fabricação e a capacidade de sobrevivência e multiplicação dessas bactérias no produto, mesmo quando mantidos sob refrigeração. Diferentes espécies de *Listeria* foram isoladas em queijos e no ambiente de produção de três laticínios de pequeno porte no norte do estado de São Paulo, sendo *L. innocua* a principal delas<sup>8</sup>. O isolamento de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* em diferentes queijarias torna o ambiente de fabricação uma importante fonte de contaminação<sup>8,12</sup>, visto



que algumas linhagens podem permanecer viáveis por longos períodos de tempo em drenos de piso<sup>12</sup>.

O risco associado ao consumo de queijos frescos contaminados por *L. monocytogenes*, principalmente por indivíduos de grupos de risco, e a relevância deste patógeno para a saúde pública justificam a necessidade de estudos sobre sua ocorrência no produto. Embora *L. monocytogenes* seja a principal espécie patogênica, a presença e o desenvolvimento de outras espécies do gênero em queijos Minas Frescal sugere a possibilidade de contaminação pelo patógeno e representa um risco potencial para os consumidores<sup>9</sup>. Diante disto, este estudo teve como objetivo avaliar a ocorrência de *Listeria* spp. em queijos Minas Frescal produzidos em agroindústrias familiares, identificar as espécies deste gênero e relacionar os resultados às condições de produção e comercialização dos queijos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionadas seis agroindústrias inspecionadas pelo Serviço de Inspeção Municipal (SIM) e seis agroindústrias não inspecionadas. Dentre as agroindústrias informais, três utilizavam leite pasteurizado e as outras três utilizavam leite cru como matéria-prima para a produção dos queijos. As condições de fabricação foram avaliadas e amostras de queijo Minas Frescal foram coletadas para avaliação microbiológica. Amostras do produto também foram coletadas nos respectivos pontos de venda que foram selecionados com base nos critérios de aleatoriedade e disponibilidade do produto. Durante a coleta das amostras avaliou-se as condições higiênicas de comercialização. Entre janeiro e dezembro de 2008 foram realizadas duas coletas em cada uma das estações do ano nas agroindústrias e nos pontos de venda. As amostras foram indicativas de lote, representadas por uma peça em embalagem original fechada pesando aproximadamente 500g. As amostras coletadas na fonte de produção e no comércio foram independentes.

Foram coletadas 161 amostras de queijos Minas Frescal, 81 provenientes da fonte de produção e 80 de seus respectivos pontos de venda. De 81 amostras coletadas na fonte de produção, 42 eram de estabelecimentos inspecionados e 39 de não inspecionados. De 80 amostras coletadas no comércio, 42 foram fabricadas em agroindústrias inspecionadas e 38 em estabelecimentos informais.

As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), Viçosa, MG, segundo a metodologia preconizada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento<sup>13</sup>. Alíquotas de 25 g da amostra foram submetidas ao enriquecimento seletivo primário em 225 mL de caldo Half-Fraser adicionado de ácido nalidíxico e acriflavina, homogeneizadas e incubadas a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ , por 24 horas. Em seguida, uma alíquota foi submetida ao enriquecimento secundário em caldo Fraser suplementado com citrato de amônio e ferro III e incubada a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ , por 24 a 48 horas. A partir do segundo enriquecimento, realizou-se o plaqueamento seletivo diferencial em Palcam *Listeria* Selective Agar e Ágar *Listeria*, de acordo com Ottaviani e Agosti (ALOA). As colônias típicas foram submetidas às provas de catalase, motilidade típica, redução de nitrato e VM-VP para identificação do gênero. As culturas caracterizadas como *Listeria* spp. foram diferenciadas quanto a espécie por meio de provas bioquímicas que incluem produção de beta-hemólise, CAMP teste e fermentação de carboidratos: xilose, manitol e ramnose.

A frequência de isolamento de cada espécie foi dada pela razão entre o número de vezes que uma espécie foi detectada e número total de detecções. A ocorrência de acordo com *Listeria* spp. foi relacionada ao tipo de agroindústria (inspecionada ou não inspecionada), ao percentual de adequação às Boas Práticas de Fabricação (BPF), à matéria-prima utilizada (leite cru ou pasteurizado) e à origem da amostra (produção ou comércio).

As condições de fabricação e comercialização foram avaliadas durante a coleta das amostras por meio de observações *in loco* direcionadas por listas de verificação elaboradas pelos autores que abordavam requisitos de boas práticas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Constatou-se *Listeria* spp. em 14 amostras (8,7%) provenientes de oito agroindústrias diferentes, quatro inspecionadas e quatro não inspecionadas. Dentre as seis espécies de *Listeria* identificáveis pela metodologia adotada, quatro foram detectadas



nas amostras de queijo, o que caracteriza alta diversidade de espécies deste gênero neste tipo de produto. *L. innocua* foi a mais frequente (72%), seguida de *L. monocytogenes* (14%), *L. ivanovii* (7%) e *L. seeligeri* (7%). Não foram identificadas espécies diferentes em uma mesma amostra de queijo. As quatro espécies do gênero foram isoladas de amostras provenientes de uma agroindústria não inspecionada (K), que utilizava leite pasteurizado como matéria-prima, sendo duas delas coletadas na fonte de produção e duas no comércio. A contaminação recorrente dos queijos fabricados neste estabelecimento por *Listeria* spp. sugere que haja persistência deste grupo de bactérias no ambiente de produção, o que aumenta o risco de contaminação pelo patógeno.

Queijos Minas Frescal comercializados em Campinas, SP, apresentaram maior percentual de amostras contaminadas por *Listeria* spp. (11,8%), no entanto, constatou-se menor diversidade de espécies do gênero, com prevalência de *L. innocua* (72,7%) seguida de *L. monocytogenes* (27,3%)<sup>9</sup>. Maior contaminação por bactérias do gênero *Listeria* (16,2%) também foi constatada em queijos coloniais comercializados no Rio Grande do Sul, representada por *L. innocua* (42,9%), *L. seeligeri* (35,7%) e *L. monocytogenes* (21,4%)<sup>14</sup>. Em unidades de processamento de São Paulo, *Listeria* spp. foi detectada em superfícies, salmoura e queijos, com destaque para presença de *L. innocua* (56,5%) frente a *L. monocytogenes* (32,9%), *L. seeligeri* (9,4%) e *L. welshimeri* (1,2%)<sup>8</sup>. No sul da Itália, fábricas de laticínios que utilizavam leite de cabra e ovelha apresentaram alta diversidade de espécies de *Listeria* isoladas na matéria prima (leite refrigerado), produtos (queijos frescos) e subprodutos (coalhada e soro), enquanto que nas unidades que beneficiavam apenas leite bovino, a diversidade foi menor, representada por *L. innocua* e *L. monocytogenes*<sup>12</sup>.

*Listeria* spp. foi detectada em amostras de queijo Minas Frescal provenientes de agroindústrias inspecionadas e não inspecionadas, no entanto, a maior parte dos isolados (64,3%) foram obtidos de queijos não inspecionados (**Tabela**). Amostras oriundas de agroindústrias inspecionadas apresentaram contaminações por *L. innocua* (4/5) e *L. monocytogenes* (1/5), enquanto que as amostras fabricadas em estabelecimentos não inspecionados apresentaram maior diversidade de espécies: *L. innocua* (6/9), *L. monocytogenes*

(1/9), *L. ivanovii* (1/9) e *L. seeligeri* (1/9). Estes resultados sugerem que a regularização sanitária contribui para redução do número de amostras contaminadas e reforça a hipótese de que produtos fabricados à margem da fiscalização oferecem maior risco à saúde. A fabricação dos queijos nos estabelecimentos não inspecionados ocorria em áreas comuns às residências, como varandas e cozinha, o que dificulta a implantação de medidas para evitar a contaminação dos produtos e favorece a ocorrência de contaminações cruzadas durante a fabricação.

A presença de *Listeria* spp. em amostras coletadas nas unidades de produção (6/14) indica possível contaminação durante a fabricação dos queijos. Outra possibilidade é a utilização de matéria-prima contaminada, uma vez que esse grupo de bactérias pode estar presente no leite cru. O baixo percentual de atendimento às BPF, constatado em todas as agroindústrias (**Tabela**), demonstra deficiência na adoção de medidas para evitar a contaminação dos produtos nestas unidades. A agroindústria que apresentou menor percentual de adequação entre as inspecionadas apresentou contaminação por *L. innocua* em duas amostras coletadas na produção. Entre as amostras coletadas nas agroindústrias não inspecionadas, *L. innocua* foi detectada em três (G, K e L) e *L. monocytogenes* foi identificada em uma amostra (K).

A maior parte das amostras contaminadas foi coletada no comércio (8/14) (**Tabela**). Diversas irregularidades foram constatadas nos pontos de venda durante a coleta, tais como, limpeza insuficiente dos balcões de refrigeração (58,2%), temperatura de armazenamento superior a 10°C (49,4%), hábitos de higiene e práticas inadequadas de manipulação (48,1%), comprometimento da capacidade de refrigeração dos balcões (43,0%), armazenamento concomitante com carne crua ou seus derivados (38,0%), focos visíveis de contaminação (31,6%) e acúmulo de gelo nos balcões (22,8%). Falhas ocorridas durante a comercialização podem ser a causa das contaminações observadas, no entanto, não é possível afirmar a origem da contaminação dessas amostras, pois diversos fatores podem ter contribuído para este resultado.

**Tabela.** Adequação aos requisitos de Boas Práticas de Fabricação, tipo de matéria-prima utilizada e presença de *Listeria* spp. em queijos Minas Frescal produzidos em agroindústrias familiares – 2008

Unidades de produção	Adequação às BPF (%)	Uso de leite pasteurizado	Número de amostras coletadas		Número de amostras contaminadas por <i>Listeria</i> sp.			
			Produção	Comércio	Produção	Comércio	Total	
Inspeccionada	A	41,1	Sim	8	8	0	1	1
	B	33,7	Sim	8	8	2	0	2
	C	40,8	Sim	8	8	0	0	0
	D	51,1	Sim	8	8	0	1	1
	E*	41,6	Sim	2	2	0	0	0
	F	35,9	Sim	8	8	0	1	1
Não Inspeccionada	G	33,9	Sim	8	8	1	1	2
	H	45,0	Não	8	8	0	1	1
	I	44,4	Sim	8	8	0	0	0
	J**	31,8	Não	4	7	0	0	0
	K	43,3	Sim	8	5	2	2	4
	L**	28,3	Não	3	2	1	1	2

\* O estabelecimento encerrou as atividades após a primeira coleta

\*\* Produção eventual

Queijos fabricados com leite pasteurizado apresentaram maior frequência de isolamento de *Listeria* spp. (11/14) e alta diversidade de espécies (*L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii* e *L. seeligeri*). A pasteurização do leite é eficaz para reduzir ou eliminar este grupo de bactérias na matéria-prima, no entanto, a presença de *Listeria* spp. no ambiente de produção pode resultar na contaminação de queijos<sup>2,12</sup>. Contaminações pós-pasteurização do leite geralmente ocorrem em baixas contagens microbianas, no entanto, a capacidade de multiplicação de *Listeria* spp. em alimentos refrigerados contribui para aumento desta população, possibilitando sua detecção em etapas subsequentes àquela em que ocorreu a contaminação<sup>2</sup>. A contaminação de queijos fabricados com leite pasteurizado é ainda mais preocupante, uma vez que, a velocidade de multiplicação de *L. monocytogenes*, e das demais espécies, é maior neste tipo de produto<sup>15</sup>. Portanto, o uso de leite pasteurizado deve estar associado à adoção de boas práticas de fabricação e comercialização para obtenção de queijos seguros.

*L. monocytogenes* foi identificada em 1,2% das amostras analisadas (2/161). Estudo semelhante

identificou maior percentual de isolamento de *L. monocytogenes* (9,6%) em queijos Minas Frescal fabricados com leite pasteurizado em laticínios da Zona da Mata Mineira<sup>10</sup>. Em Juiz de Fora, MG, queijos de uma mesma marca, produzidos com leite pasteurizado, coletados em dois pontos de venda, apresentaram contaminação por *L. monocytogenes* (6/10). Avaliações realizadas na unidade de produção constataram a presença do patógeno em diferentes pontos da planta e identificaram que os resfriadores foram as fontes de contaminação<sup>11</sup>. O patógeno também foi isolado de queijos fabricados com leite pasteurizado (3/93) comercializados em Campinas, SP<sup>8</sup>.

Observou-se maior ocorrência de *Listeria* spp. em amostras coletadas na primavera (64,3%), seguida do outono (35,7%) e não foi constatada ocorrência em amostras coletadas no inverno e no verão. Zaffari et al<sup>14</sup> avaliaram a influência das estações do ano no isolamento de *Listeria* spp. em queijos coloniais comercializados no Rio Grande do Sul e, assim como neste estudo, identificaram maior ocorrência deste grupo de bactérias em amostras coletadas na primavera (7/80), seguida do outono (6/80) e em uma amostra coletada no verão<sup>14</sup>.

## CONCLUSÃO

A presença de *L. monocytogenes* e *Listeria* spp. em queijos Minas Frescal produzidos em agroindústrias familiares inspecionadas e não inspecionadas está relacionada à ocorrência de falhas nos procedimentos de boas práticas durante a produção e comercialização dos queijos. O queijo Minas Frescal, produzido a partir de leite cru ou pasteurizado, em estabelecimentos que não atendem aos requisitos de BPF, oferece risco potencial à saúde do consumidor. A implantação das boas práticas nas etapas de fabricação e comercialização é uma medida fundamental para garantir a inocuidade dos produtos comercializados por pequenas agroindústrias.

Os órgãos fiscalizadores necessitam aprimorar o monitoramento da ocorrência do patógeno em agroindústrias inspecionadas por meio de análises fiscais e programas específicos para controle de *Listeria* spp. em ambientes industriais. A prevalência deste grupo de bactérias em queijos frescos provenientes de agroindústrias não inspecionadas evidencia o perigo de se consumir este tipo de produto e reforça a necessidade de regularização dos pequenos empreendimentos para evitar problemas de saúde pública e garantir a sustentabilidade da produção artesanal de queijos.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

## REFERÊNCIAS

1. Doijab SP, Poharkar KV, Kale SB, Kerkar S, Kalorey DR, Kurkure NV et al. *Listeria goaensis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2018;68(10):3285–91. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002980>
2. Wang S, Orsi RH. Foodborne infections: *Listeria*. In: Morris GJ, Potter ME. *Foodborne Infections and Intoxications*. Atlanta: Elsevier; 2013. p. 199-210.
3. Cruz CD, Martinez MB, Destro MT. *Listeria monocytogenes*: um agente infeccioso ainda pouco conhecido no Brasil. *Alim Nutr* 2008;19(2):195-206. Disponível em: <http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/alimentos/article/view/247/241>
4. Castro V, Escudero JM, Rodrigues JI, Muniozguren N, Uribarri J, Saez D et al. Listeriosis outbreak caused by Latin-style fresh cheese, Bizkaia, Spain, August 2012. *Euro Surveill*. 2012;17(42):pii=20298. Disponível em: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20298>
5. Rios VM, Dalgaard P. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in European cheeses: A systematic review and meta-analysis. *Food Control*. 2018;84:205-14. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.07.020>
6. Gould HL, Mungai E, Behravesh CB. Outbreaks Attributed to Cheese: Differences Between Outbreaks Caused by Unpasteurized and Pasteurized Dairy Products, United States, 1998–2011. *Foodborne Pathog Dis*. 2014;11(7):545-51. <https://doi.org/10.1089/fpd.2013.1650>
7. Silva P, Silva JO, Carneiro AMM, Reche SHC, Medeiros MIC. Estudo retrospectivo de meningite por *Listeria* sp ocorridos na região de Ribeirão Preto/SP, Brasil. *Bol Inst Adolfo Lutz*. 2016; 26(U):1-2. Disponível em: [http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/bial/bial\\_26/26u\\_art-3.pdf](http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/bial/bial_26/26u_art-3.pdf)
8. Barancelli GV, Camargo TM, Gagliardi GN, Porto E, Souza RA, Campioni F et al. Pulsed-Field Gel Electrophoresis characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from cheese manufacturing plants in São Paulo, Brazil. *Int J Food Microbiol*; 2014;173:21-9. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.018>
9. Carvalho JDG, Viotto WH, Kuaye AY. The quality of Minas Frescal cheese produced by different technological processes. *Food Control*. 2007;18(3):262-7. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.10.005>

10. Apolinário TCC, Santos GS, Lavorato JAA. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo Minas Frescal produzido por laticínios do estado de Minas Gerais. *Rev Inst Laticínios Cândido Tostes*. 2014;69(6):433-42. <https://doi.org/10.14295/2238-6416.v69i6.290>
11. Brito JR, Santos EM, Arcuri EF, Lange CC, Brito MA, Souza GN et al. Retail survey of Brazilian milk and Minas frescal cheese and a contaminated dairy plant to establish prevalence, relatedness, and sources of *Listeria monocytogenes* isolates. *Appl Environ Microbiol* 2008;74(15):4954-61. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01828-07>
12. Parisi A, Latorre L, Fracalvieri R, Miccolupo A, Normanno G, Caruso M et al. Occurrence of *Listeria* spp. in dairy plants in Southern Italy and molecular subtyping of isolates using AFLP. *Food Control* 2013;29(1):91-7. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.05.036>
13. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BR). Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 18 set 2003. Seção 1:14. Disponível em: <https://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?journal=1&pagina=14&data=18/09/2003>
14. Zaffari CB, Mello JF, Costa M. Qualidade bacteriológica de queijos artesanais comercializados em estradas do litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciênc Rural*. 2007;37(3):862-67. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782007000300040>
15. Tiwari U, Walsh D, Rivas L, Jordan K, Duffy G. Modelling the interaction of storage temperature, pH, and water activity on the growth behaviour of *Listeria monocytogenes* in raw and pasteurised semi-soft rind washed milk cheese during storage following ripening. *Food Control*. 2014;42:248-56. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.02.005>



# Determinação de baixas concentrações de lítio em águas de abastecimento público por cromatografia de íons: validação de método

## Determination of low concentrations of lithium in public water supply by the ion chromatography: method validation

RIALA6/1776

Sergio DOVIDAUSKAS\*, Isaura Akemi OKADA, Felipe Rodrigues dos SANTOS

\*Endereço para correspondência: Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas, Centro de Laboratório Regional Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto VI. Rua Minas nº 877, Ribeirão Preto, SP, Brasil, CEP: 14085-410. Tel: 16 3625 5046. E-mail: [sergio.dovidauskas@ial.sp.gov.br](mailto:sergio.dovidauskas@ial.sp.gov.br)

Recebido: 13.02.2019 - Aceito para publicação: 13.06.2019

### RESUMO

Esta nota apresenta a validação de um método para realizar a determinação de lítio em concentrações menores do que  $40 \mu\text{g L}^{-1}$  em amostras de águas de abastecimento público, utilizando-se cromatografia de íons e calibração externa, com a curva analítica obtida por regressão linear (mínimos quadrados ordinários). O método é seletivo, e apresenta limite de detecção igual a  $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$  e limite de quantificação igual a  $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$ . Os ensaios de recuperação em três níveis de concentração apresentaram resultados entre 99,4 e 101,9%. Na avaliação da precisão nos mesmos três níveis de concentração, os coeficientes de variação exibiram valores entre 1,1 e 4,0%.

**Palavras-chave.** validação de método, cromatografia de íons, lítio, águas de abastecimento.

### ABSTRACT

This note presents the validation of a method for determining the lithium at concentrations less than  $40 \mu\text{g L}^{-1}$  in the public water supply, by using the ion chromatography and external calibration, and the analytical curve was obtained by the linear regression (ordinary least squares). The employed method is selective, showing the detection limit equal to  $1.0 \mu\text{g L}^{-1}$  and the quantification limit equal to  $2.0 \mu\text{g L}^{-1}$ . Recovery tests in three concentration levels presented results from 99.4 to 101.9%. On the precision evaluation in the same three concentration levels, the coefficients of variation exhibited values between 1.1 and 4.0%.

**Keywords.** method validation, ion chromatography, lithium, water supply.



Lítio é utilizado no tratamento do transtorno bipolar, depressão unipolar e prevenção de suicídio<sup>1</sup> sendo comuns, para administração via oral, as preparações de carbonato de lítio na forma de comprimidos de 300 mg contendo 56,3 mg de Li<sup>+</sup>. No início do tratamento do transtorno bipolar, por exemplo, podem ser utilizadas doses mais elevadas do medicamento, seguindo-se um ajuste para uma dose de manutenção que pode variar entre 900 e 1.500 mg Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> por dia (169,1 a 281,8 mg Li<sup>+</sup> por dia)<sup>2</sup>. Por outro lado, pesquisas têm encontrado correlações negativas entre taxas de suicídio e baixas concentrações de lítio em águas para consumo humano (abaixo de 219 µg L<sup>-1</sup>)<sup>3</sup>. Em adição, tem sido sugerido também um efeito benéfico da presença de baixas concentrações de lítio em águas (até 27 µg L<sup>-1</sup>) na prevenção da demência<sup>4</sup>.

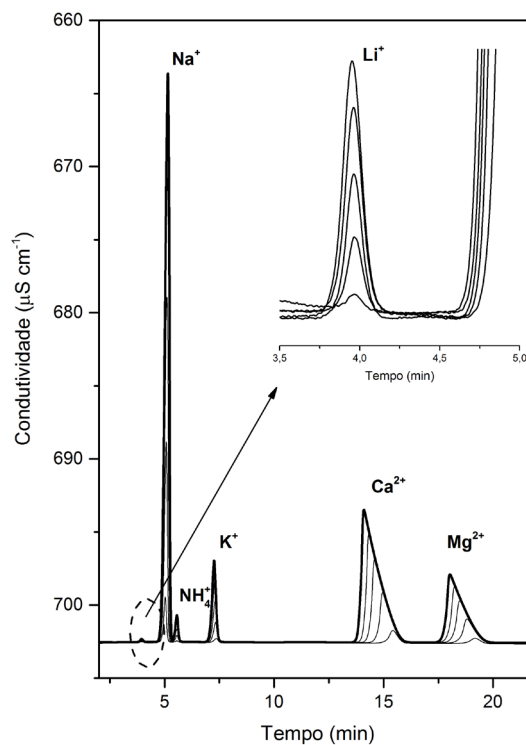
Em um recente estudo realizado em águas de abastecimento de 88 municípios da região nordeste do Estado de São Paulo, Brasil, foram encontradas pequenas quantidades de lítio em 34,8% de 4.347 amostras analisadas, sendo 28 µg L<sup>-1</sup> a concentração máxima obtida<sup>5</sup>. Para a determinação das concentrações de lítio utilizou-se a cromatografia de íons e calibração externa, com curva analítica obtida a partir de soluções padrão de concentrações entre 10 e 200 µg L<sup>-1</sup>, e o método usado incluiu também determinações simultâneas dos íons Na<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> em diferentes níveis de concentração; no caso do lítio, para a obtenção da função linear de calibração foi realizado um ajuste por mínimos quadrados ordinários, obtendo-se 2 µg L<sup>-1</sup> como limite de detecção (LD) e 5 µg L<sup>-1</sup> como limite de quantificação (LQ)<sup>6</sup>. Uma vez que naquele trabalho exploratório não se dispunha a priori de informações sobre os níveis do íon nas águas de abastecimento da região, as concentrações mensuradas se distribuíram em apenas 14% do intervalo de concentrações da curva analítica utilizada. Não obstante, em uma segunda etapa pretende-se aumentar o número de amostras analisadas naqueles municípios onde o lítio foi quantificado, com o objetivo de se obter um perfil mais preciso sobre a sua ocorrência na região, o que inclui também as determinações de outros íons e variáveis<sup>5</sup>. Do ponto de vista analítico, para que essa segunda etapa possa ser

realizada de maneira mais precisa, o intervalo de concentrações da curva analítica do lítio deve ser reduzido de modo a compreender de 0 a 150% das concentrações esperadas, seguindo recomendações da International Union of Pure and Applied Chemistry<sup>7</sup>. Assim, um novo método foi planejado utilizando uma curva incluindo as seguintes concentrações: 2; 10; 20; 30; e 40 µg L<sup>-1</sup>. Por outro lado, mantiveram-se as determinações simultâneas dos íons Na<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> nas condições previamente validadas<sup>6</sup>. Tendo em vista que essa curva inclui o LD do lítio da curva anterior e que, portanto, as inferências estatísticas relacionadas a essa região de concentrações passam a ser questionáveis quanto às possíveis distribuições normais dos erros<sup>7</sup>, optou-se por uma validação completa do novo método de determinação de lítio. Esse trabalho descreve esta validação, que seguiu documento orientativo da Coordenação Geral da Acreditação do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro)<sup>8</sup> e normas da International Organization for Standardization (ISO)<sup>9</sup>.

Todos os reagentes utilizados eram de grau analítico (Sigma-Aldrich e Merck) e todas as soluções aquosas de padrões e eluentes foram preparadas com água tipo I obtida em um sistema de purificação marca Millipore, modelo Milli-Q Direct 8. A cromatografia dos cátions Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup>, foi realizada em equipamento marca Metrohm, modelo 930 COMPACT IC FLEX DEG, nas seguintes condições: eluente, solução de HNO<sub>3</sub> 1,7 mmol L<sup>-1</sup> contendo 0,7 mmol L<sup>-1</sup> de ácido dipicolínico; vazão, 0,9 mL min<sup>-1</sup>; temperatura ambiente; coluna marca Metrohm, modelo Metrosep C4 150/4.0. Antes da análise cromatográfica, as amostras foram filtradas em filtros 0,45 µm. No tratamento dos dados foram utilizados os softwares Microsoft Excel<sup>®</sup> 2013 e Origin<sup>®</sup> 9.1Pro.

A seletividade do método é evidenciada na **Figura**, que apresenta os cromatogramas de cinco soluções padrão contendo os seis cátions; no detalhe observa-se o sinal analítico do Li<sup>+</sup>, correspondendo às concentrações 2; 10; 20; 30; e 40 µg L<sup>-1</sup> (as concentrações dos íons Na<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> foram previamente descritas<sup>6</sup>). A **Tabela** exhibe as áreas de pico do

íon  $\text{Li}^+$  para essas cinco soluções em dez curvas analíticas independentes, incluindo-se também as respectivas médias, variâncias e desvios padrão, uma vez que o teste de Shapiro-Wilk ( $\alpha = 0,05$ ) indicou distribuição normal para todas as cinco séries de 10 medidas, constatando-se ainda a ausência de valores aberrantes por meio do teste de Grubbs ( $\alpha = 0,05$ ). Quando o teste de homogeneidade de variâncias foi aplicado conforme ISO 8466-1<sup>9</sup> ( $\alpha = 0,01$ ), o resultado indicou homoscedasticidade, enquanto o resultado do teste de linearidade, aplicado de acordo com a mesma norma e usando as médias de áreas de pico de cada solução padrão, indicou que a função de calibração é linear ( $\alpha = 0,05$ ). Assim, utilizando-se o ajuste da função por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ordinários, obteve-se uma equação do tipo  $y = a + b.x$ , sendo  $a = 2,85.10^{-4} \mu\text{S cm}^{-1} \text{ min}$  e  $b = 8,27.10^{-4} \mu\text{S cm}^{-1} \text{ min } \mu\text{g}^{-1} \text{ L}$ ; o desvio padrão residual foi igual  $2.10^{-4} \mu\text{S cm}^{-1} \text{ min}$ , com coeficiente de determinação ajustado ( $R^2_{aj}$ ) igual a 0,9997.



**Figura.** Cromatogramas das cinco soluções padrão contendo os seis íons ( $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ )

**Tabela.** Áreas de pico do íon lítio contido nas cinco soluções padrão da Figura

Curva	Áreas de pico ( $\mu\text{S cm}^{-1} \text{ min}$ )				
	Padrão 1 ( $2 \mu\text{g L}^{-1}$ )	Padrão 2 ( $10 \mu\text{g L}^{-1}$ )	Padrão 3 ( $20 \mu\text{g L}^{-1}$ )	Padrão 4 ( $30 \mu\text{g L}^{-1}$ )	Padrão 5 ( $40 \mu\text{g L}^{-1}$ )
1	0,00237	0,00830	0,01659	0,02447	0,03383
2	0,00199	0,00906	0,01653	0,02470	0,03378
3	0,00233	0,00823	0,01691	0,02527	0,03331
4	0,00221	0,00864	0,01670	0,02471	0,03367
5	0,00183	0,00853	0,01685	0,02503	0,03431
6	0,00168	0,00906	0,01628	0,02464	0,03282
7	0,00193	0,00896	0,01615	0,02508	0,03376
8	0,00190	0,00879	0,01684	0,02574	0,03340
9	0,00171	0,00868	0,01639	0,02479	0,03362
10	0,00220	0,00833	0,01704	0,02511	0,03333
Média	0,00202	0,00866	0,01663	0,02495	0,03358
Variância	6,2E-08	9,6E-08	8,5E-08	1,4E-07	1,6E-07
Desvio padrão	0,00025	0,00031	0,00029	0,00037	0,00040

O cálculo do LD do método envolveu a equação abaixo<sup>8</sup>:

$$LD = 3,3 \cdot \frac{s}{b}$$

onde  $b$  é o valor do coeficiente angular da curva analítica obtida com as médias de áreas de pico de cada solução padrão, e  $s$  é o desvio padrão das áreas de pico da solução padrão de menor concentração (ver **Tabela**). Dessa forma, o LD apresentou um valor igual a  $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Com relação ao LQ do método, assumiu-se o seu valor como a menor concentração entre aquelas utilizadas nas soluções padrão para a construção da curva analítica, ou seja,  $LQ = 2,0 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Tanto o valor de LD como o valor de LQ foram confirmados experimentalmente através de análises de duas séries de amostras de águas de abastecimento isentas de lítio, cada série com seis replicatas. As amostras foram contaminadas de modo que a primeira série apresentasse concentrações iguais ao LD, e a segunda série apresentasse concentrações iguais ao LQ. No caso do LD, o método foi capaz de detectar a presença do íon  $\text{Li}^+$  em todas as replicatas, enquanto a análise das seis replicatas ao nível do LQ indicou uma média de  $1,9 \mu\text{g L}^{-1}$  (recuperação = 95%) com desvio padrão igual a  $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$  (coeficiente de variação = 15%). Tanto a exatidão como a precisão para o LQ foram consideradas satisfatórias.

Para avaliar a tendência do método e a sua precisão em condições de repetibilidade, realizaram-se ensaios de recuperação em três níveis de concentração ( $4, 20$  e  $36 \mu\text{g L}^{-1}$ ), obtidos pela adição de solução padrão de lítio a amostras de águas de abastecimento isentas do íon. Cada nível envolveu seis replicatas e as recuperações calculadas foram: para  $4 \mu\text{g L}^{-1}$ , 101,9% de recuperação, com coeficiente de variação igual a 4,0%; para  $20 \mu\text{g L}^{-1}$ , 99,4% de recuperação, com coeficiente de variação igual a 1,1%; para  $36 \mu\text{g L}^{-1}$ , 100,2% de recuperação, com coeficiente de variação igual a 1,4%. Tanto a exatidão como a precisão foram consideradas satisfatórias.

Em conclusão: todos os parâmetros avaliados na validação descrita nesta nota apresentaram características adequadas para a determinação de baixas concentrações de lítio (menores que  $40 \mu\text{g L}^{-1}$ )

em amostras de águas de abastecimento público. Não obstante, cabe aqui salientar que o valor do LD obtido ( $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ) é menor que o normalmente atingido na absorção atômica com chama ar-acetileno ( $2 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e na espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente ( $4 \mu\text{g L}^{-1}$ )<sup>10</sup>. Assim, a cromatografia de íons para a determinação de pequenas quantidades de lítio em amostras de águas é uma alternativa viável em relação a métodos envolvendo equipamentos mais dispendiosos.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro (Processo FAPESP nº 2017/24883-0) e pela bolsa concedida a Felipe Rodrigues dos Santos (Processo FAPESP nº 2018/20342-7).

## REFERÊNCIAS

1. Aprahamian I, Sousa RT, Valiengo LCL, Machado-Vieira R, Forlenza OV. Lithium safety and tolerability in mood disorders: a critical review. *Rev Psiquiatr Clín*. 2014;41(1):9-14. <http://dx.doi.org/10.1590/0101-60830000411914>
2. Rosa AR, Kapczinski F, Oliva R, Stein A, Barros HMT. Monitoramento da adesão ao tratamento com lítio. *Rev Psiquiatr Clín*. 2006;33(5):249-61. <https://doi.org/10.1590/S0101-60832006000500005>
3. Vita A, Peri LD, Sacchetti E. Lithium in drinking water and suicide prevention: a review of the evidence. *Int Clin Psychopharmacol*. 2015;30(1):1-5. <https://doi.org/10.1097/YIC.0000000000000048>
4. Kessing LV, Gerds TA, Knudsen NN, Jorgensen LF, Kristiansen SM, Voutchkova D et al. Association of lithium in drinking water with the incidence of dementia. *JAMA Psychiatry*. 2017;74(10):1005-10. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2017.2362>
5. Dovidauskas S, Okada IA, Iha MH, Cavallini ÁG, Okada MM, Briganti RC et al. Mapeamento da qualidade da água de abastecimento público no nordeste do Estado de São Paulo (Brasil). *Vigil Sanit Debate*. 2017;5(2):53-63. <https://doi.org/10.22239/2317-269x.00862>

6. Dovidauskas S, Okada IA, Iha MH, Cavallini ÁG, Okada MM, Briganti RC. Parâmetros físico-químicos incomuns em água de abastecimento público de um município da região nordeste do Estado de São Paulo (Brasil). *Vigil Sanit Debate*. 2017;5(1):106-15. <https://doi.org/10.22239/2317-269X.00840>
7. Thompson M, Ellison SLR, Wood R. Harmonized Guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure Appl Chem*. 2002;74(5):835-55. <http://dx.doi.org/10.1351/pac200274050835>
8. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - INMETRO. DOQ-CGCRE-008 - Orientação sobre validação de métodos analíticos. Rev 07. Rio de Janeiro (RJ): Coordenação Geral de Acreditação; 2018. Disponível em: [http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8\\_07.pdf](http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_07.pdf)
9. International Organization for Standardization - ISO. ISO 8466-1. Water quality - Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics. Part 1: Statistical evaluation of the linear calibration function, 1990.
10. APHA, AWWA, WEF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22.ed. Eaton AD, Clesceri LS, Greenberg AE, editors. Washington (DC): American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation; 2012.

## AGRADECIMENTOS

O Corpo Editorial agradece a todos os relatores abaixo relacionados que, com seu trabalho voluntário e anônimo ao longo de 2019, contribuíram para o bom andamento das atividades e elevação do nível dos artigos publicados pela Revista

- **Adriane Alexandre Machado de Melo** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. São Paulo, SP
- **Aláise Gil Guimarães** Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, Departamento de Análises Bromatológicas. Salvador, BA
- **Alexandre Tourino Mendonça** Universidade Vale do Rio Verde. Três Corações, MG
- **Ana Paula Sayuri Sato** Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Epidemiologia. São Paulo, SP
- **Anelise Christ Ribeiro** Universidade Federal do Rio Grande, Escola de Química e Alimentos. Rio Grande, RS
- **André Gustavo Tempone** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Parasitologia e Micologia. São Paulo, SP
- **Carla da Silva Carneiro** Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Faculdade de Farmácia, Departamento de Produtos Naturais e Alimentos. Rio de Janeiro, RJ
- **Cátia Regina Storck** Centro Universitário Franciscano. Santa Maria, RS
- **Cecilia Cristina Marques dos Santos** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Laboratórios Regionais de São José do Rio Preto, Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas. São José do Rio Preto, SP
- **Claudia Maria Antunes Uchôa Souto Maior** Universidade Federal Fluminense, Instituto Biomédico, Departamento de Microbiologia e Parasitologia. Niterói, RJ
- **Clayton Luiz Borges** Universidade Federal de Goiás, Departamento de Bioquímica, Laboratório de Biologia Molecular. Goiânia, GO
- **Cristiane Gattini Sbampato** Universidade Vale do Rio Verde. Três Corações, MG
- **Daniela Mayumi Usuda Prado Rocha** Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG
- **Eliandra Mirlei Rossi** Universidade do Oeste de Santa Catarina, Laboratório de Pesquisa e Diagnóstico em Microbiologia. São Miguel do Oeste, SC
- **Emerson Carraro** Universidade Estadual do Centro-Oeste, Departamento de Farmácia, Setor de Saúde, Laboratório de Virologia e Biologia Molécula. Guarapuava, PR
- **Fernando Mauro Pereira Soares** Universidade Federal do Sul da Bahia, Centro de Formação em Tecno-Ciências e Inovação. Itabuna, BA
- **Francisca Janaina Soares Rocha** Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde. Recife, PE
- **Francisca Neide Costa** Universidade Estadual do Maranhão, Centro de Ciências Agrárias. São Luis, MA
- **Françoise Vasconcelos Botelho** Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Genética e Bioquímica. Uberlândia, MG
- **Gleize Villela** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Laboratórios Regionais, Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas. Campinas, SP





- **Hans Fröder** Centro Universitário Univates. Lageado, RS
- **Isabel Cristina Ferreira Damim** Laboratório Nacional Agropecuário do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS
- **Jacqueline Tanury Macruz Peresi** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Laboratórios Regionais, Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas. São José do Rio Preto, SP
- **Josué Moraes** Universidade de Guarulhos. Guarulhos, SP
- **Juliana Alves Parente Rocha** Universidade Federal de Goiás, Departamento Bioquímica, Laboratório de Biologia Molecular. Goiânia, GO
- **Juliana Mariotti Guerra** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Patologia, Núcleo de Patologia Quantitativa. São Paulo, SP
- **Jussara Carvalho de Moura Della Torre** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Alimentos, Núcleo de Química, Física e Sensorial. São Paulo, SP
- **Kátia Maria Vieira Avelar Bittencourt Cipolli** Instituto Tecnologia de Alimentos, Laboratório de Análise Física, Sensorial e Estatística. Campinas, SP
- **Ligia Manuel Martins** Instituto de Tecnologia de Alimentos. Campinas, SP
- **Lucile Tiemi Abe-Matsumoto** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Alimentos, Núcleo de Química, Física e Sensorial, São Paulo, SP
- **Manoela Alano Vieira** Instituto Federal de Santa Catarina, Escola Técnica Federal de Santa Catarina. Xanxerê, SC
- **Márcia de Souza Melhem** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Parasitologia e Micologia, Núcleo de Micologia. São Paulo, SP
- **Márcia Elena Zanuto** Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar de Saúde. Vitória da Conquista, BA
- **Maria Carmela Kasnowski Holanda Duarte** Universidade Federal Fluminense, Faculdade de Medicina Veterinária, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Laboratório de Controle Microbiológico. Niterói, RJ
- **Maria Claudia Dantas Porfirio Borges** Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Departamento de Microbiologia. Goiânia, GO
- **Mariângela Dutra de Oliveira** Instituto Federal do Espírito Santo. Vitória, ES
- **Nelma de Mello Silva Oliveira** Universidade José do Rosário Vellano, Laboratório de Biologia e Fisiologia de Microrganismo. Alfenas, MG
- **Patricia de Souza Santos** Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Coordenadoria de Controle de Doenças, Programa de Pós-Graduação em Ciências. São Paulo, SP
- **Paula Araujo Opromolla** Secretaria de Estado da Saúde do Estado de São Paulo, Centro de Vigilância Sanitária. São Paulo, SP
- **Paulo Afonso Lopes** Instituto Militar de Engenharia, Seção de Engenharia de Construção. Rio de Janeiro, RJ
- **Rita Goreti Amaral** Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Farmácia. Goiânia, GO
- **Rodrigo Caciano de Sena** Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, Diretoria de Metrologia Científica e Industrial, Divisão de Metrologia Química, Laboratório de Análise Inorgânica, Laboratório de Análise Inorgânica. Duque de Caxias, RJ
- **Rozane Marcia Triches** Universidade Federal da Fronteira Sul. Realeza, PR

- **Silvia Yuko Eguchi** Allergisa Pesquisa Dermato-Cosmética. São Paulo, SP
- **Vera Lúcia Pereira Chioccola** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Parasitologia e Micologia, Laboratório de Biologia Molecular de Parasitas e Fungos. São Paulo, SP
- **Viviane de Paula Acosta Iglesia** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Alimentos, Núcleo de Química, Física e Sensorial. São Paulo, SP
  
- **Mirthes Ueda** Agradecimento especial pela revisão do inglês

## INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Os manuscritos submetidos à publicação na RIAL devem ser apresentados de acordo com as Instruções aos Autores.

Serão aceitos manuscritos nos idiomas: português ou inglês.

O manuscrito deve ser encaminhado em formato eletrônico (e-mail), aos cuidados do editor-chefe da RIAL, pelo endereço eletrônico [rial@saude.sp.gov.br](mailto:rial@saude.sp.gov.br).

Os itens exigidos para apresentação do manuscrito estão descritos a seguir:

### 1. Categoria De Artigos

**1.1 Artigos Originais:** incluem estudos relacionados à prevenção e controle de agravos e à promoção à saúde. Devem ser baseados em dados originais e perspectivas relevantes para saúde pública. Cada artigo deve conter objetivos e hipóteses claras, desenho e métodos utilizados, resultados, discussão e conclusões.

#### Informações Complementares:

- ◆ Devem conter no máximo 6000 palavras, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.
- ◆ Tabelas, figuras, gráficos e fotos, serão limitados a 5 (cinco) no conjunto, e devem incluir apenas os dados imprescindíveis em arquivos separados. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas.
- ◆ As referências bibliográficas, limitadas a 50, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.
- ◆ Os resumos em português e em inglês (abstract) devem ter até 200 palavras, com a indicação de 3 a 6 palavras-chave (keywords).

A estrutura dos artigos originais de pesquisa é a convencional: Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão e Conclusão, respeitando a lógica da estrutura de artigos científicos.

**1.2 Artigos de Revisão:** dedicados à apresentação e à discussão de temas de interesse científico e de relevância para a saúde pública. Devem apresentar formulação clara de um objeto científico de interesse, argumentação lógica, crítica teórico-metodológica dos trabalhos consultados e síntese conclusiva.

#### Informações complementares:

- ◆ Devem conter no máximo 7500 palavras, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.
- ◆ Tabelas, figuras, gráficos e fotos, serão limitados a 3 (três) no conjunto, e devem incluir apenas os dados imprescindíveis em arquivos separados. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas.
- ◆ As referências bibliográficas, limitadas a 80, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.
- ◆ Os resumos em português e em inglês (abstract) devem ter até 200 palavras, com a indicação de 3 a 6 palavras-chave (keywords).

**1.3 Comunicações Breves:** são contribuições de importância no campo da pesquisa de interesse em saúde pública, mas que não comportam pela sua complexidade e extensão uma análise mais abrangente. Serão consideradas, também, nesta categoria descrições de novos métodos ou técnicas que tragam avanços para a área de conhecimento.

#### Informações complementares:

- ◆ Devem conter no máximo 3000 palavras, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.
- ◆ Tabelas, figuras, gráficos e fotos, serão limitados a 2 (dois) no conjunto, e devem incluir apenas os dados imprescindíveis em arquivos separados. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas.

- ◆ As referências bibliográficas, limitadas a 15, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.
- ◆ Os resumos em português e em inglês (abstract) devem ter até 200 palavras, com a indicação de 3 a 6 palavras-chave (keywords).

**1.4 Notas Científicas:** são relatos sucintos destinados à rápida divulgação de resultados relevantes, com reconhecido impacto para a comunidade científica, que justifique a publicação de resultados parciais a critério do corpo editorial.

**Informações complementares:**

- ◆ Devem conter no máximo 1800 palavras, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.
- ◆ Tabelas, figuras, gráficos e fotos, serão limitados a 2 (dois) no conjunto, e devem incluir apenas os dados imprescindíveis em arquivos separados. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas.
- ◆ As referências bibliográficas, limitadas a 10, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.
- ◆ Os resumos em português e em inglês (abstract) devem ter até 1800 palavras, com a indicação de 3 a 6 palavras-chave (keywords).

**1.5 Comentários Técnico-Científicos:** contribuições de interesse em saúde pública destinadas a veiculação de informações científicas e tecnológicas comentadas e discutidas sob o ponto de vista dos seus autores, podendo ser de natureza individual ou institucional.

**Informações complementares:**

- ◆ Devem conter no máximo 1800 palavras, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.
- ◆ As referências bibliográficas, limitadas a 30, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.
- ◆ Os resumos em português e em inglês (abstract) devem ter até 100 palavras, com a indicação de 3 a 6 palavras-chave (keywords).
- ◆ Sua apresentação deve ser na forma de texto único.

**1.6 Relatos de Caso:** são textos que contemplam principalmente as áreas médica e veterinária, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada.

**Informações complementares:**

- ◆ Devem conter no máximo 1000 palavras, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.
- ◆ Tabelas, figuras, gráficos e fotos, serão limitados a 2 (dois) no conjunto, e devem incluir apenas os dados imprescindíveis em arquivos separados. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas.
- ◆ As referências bibliográficas, limitadas a 10, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.
- ◆ Os resumos em português e em inglês (abstract) devem ter até 100 palavras, com a indicação de 3 a 6 palavras-chave (keywords).
- ◆ Devem apresentar Introdução, Relato de caso, Discussão e Conclusão, na forma de texto único.

**1.7 Resumos de Teses e Dissertações:** são aceitos resumos de teses e dissertações até um ano após a defesa.

**Informações complementares:**

- ◆ Devem ter até 400 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (keywords).
- ◆ Sua apresentação deve conter o nome do autor e do orientador, título do trabalho em português e em inglês, nome da instituição em que foi apresentado, área de concentração, ano da defesa e endereço eletrônico onde a tese/dissertação está disponível.

## 2. Apresentação do manuscrito:

Os textos devem ser redigidos em processador de texto *Word* ou compatível, no formato A4, espaço duplo, fonte *Times New Roman*, tamanho 12. As tabelas e legendas devem utilizar fonte *Times New Roman*, tamanho 10, e as notas e figuras a fonte *Times New Roman*, tamanho 9. Devem ser evitados arquivos compactados (zip). A estrutura do manuscrito deve estar em conformidade com as normas do Sistema Vancouver – Título; Autores e Instituições; Resumo e Abstract; Introdução; Material e Métodos; Resultados; Discussão; Conclusão; Agradecimentos; Referências; Tabelas; Figuras e Fotografias.

### 2.1 Página de Identificação:

Devem constar:

**Título em português e em inglês:** o título, limitado a 180 caracteres com espaço, deve ser conciso e conter informações que expresse o conteúdo do manuscrito; se o mesmo for submetido em inglês, deve ser informada a tradução do título em português.

**Autores:** são considerados autores, aqueles que contribuíram substancialmente para a concepção e planejamento, ou análise e interpretação dos dados; contribuíram significativamente na elaboração do rascunho ou na revisão crítica do conteúdo e participaram da aprovação da versão final do mesmo, de acordo com o *International Committee of Medical Journal Editors*– ICMJE – (<http://www.icjme.org>). Deve constar o nome completo, sem abreviações e com o último sobrenome em caixa alta (exemplo: Ana Maria Camargo da SILVA) e o e-mail do autor responsável. O autor responsável pela troca de correspondência deve estar assinalado com asterisco (\*) e apresentar também o endereço institucional completo.

**Afiliação:** deve ser indicada a instituição à qual cada autor está afiliado, na seguinte ordem de hierarquias institucionais de afiliação: laboratório, setor, seção, serviço, divisão, departamento, instituto, faculdade e universidade. Não incluir cargos e funções dos autores.

**Financiamento da pesquisa:** se a pesquisa foi subvencionada, indicar o tipo de auxílio, o nome da agência financiadora e o respectivo número do processo no final do artigo.

**Nota de apresentação:** quando baseado em tese ou dissertação, indicar o nome do autor, título, ano, nome do programa de pós-graduação e instituição onde foi apresentada. Quando apresentado em evento científico, indicar o nome do evento, local e ano da realização. Nas duas situações indicar a informação no final do artigo.

### 2.2 Preparo do manuscrito:

**Resumo/Abstract:** todos os textos deverão ter resumos em português e inglês, dimensionados conforme a categoria do artigo. Como regra geral, o resumo deve incluir objetivos do estudo, principais procedimentos metodológicos, principais resultados e conclusões.

**Palavras-chave/keywords:** Devem ser indicados entre 3 a 6 descritores do conteúdo, extraídos do vocabulário Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) da Bireme (disponível em <http://www.bireme.br>) nos idiomas português e inglês. Em inglês, com base no *Medical Subject Headings* (MeSH).

Caso não sejam encontrados descritores adequados para a temática do manuscrito, poderão ser indicados termos não existentes nos conjuntos citados, limitados a um terço do total dos descritores.



### Estrutura do texto:

**A) Introdução:** Deve ser breve, relatando o contexto e a justificativa do estudo, apoiados em referências pertinentes ao objetivo do manuscrito, sintetizando a importância e destacando as lacunas do conhecimento abordadas. Não deve incluir dados ou conclusões do estudo em referência

**B) Material e Métodos:** Os procedimentos adotados devem ser descritos claramente, bem como as variáveis analisadas, com a respectiva definição, quando necessária, e a hipótese a ser testada. Devem ser descritas a população e a amostra, instrumentos de medida, com a apresentação, se possível, de medidas de validade e conter informações sobre a coleta e processamento de dados. Deve ser incluída a devida referência para os métodos e técnicas empregados, inclusive os métodos estatísticos; métodos novos ou substancialmente modificados devem ser descritos, justificando as razões para seu uso e mencionando suas limitações.

Os critérios éticos da pesquisa devem ser respeitados; os autores devem explicitar que a pesquisa foi conduzida dentro de padrões éticos e foi aprovada por comitê de ética, indicando o nome do comitê de ética, número e data do registro.

**C) Resultados:** Devem ser apresentados em uma sequência lógica, iniciando-se com a descrição dos dados mais importantes. Tabelas e figuras devem ser restritas àquelas necessárias para argumentação e a descrição dos dados no texto deve ser restrita aos mais importantes. Os gráficos devem ser utilizados para destacar os resultados mais relevantes e resumir relações complexas. Dados em gráficos e tabelas não devem ser duplicados nem repetidos no texto. Os resultados numéricos devem especificar os métodos estatísticos utilizados na análise.

**D) Discussão:** A partir dos dados obtidos e resultados alcançados, os novos e importantes aspectos observados devem ser interpretados à luz da literatura científica e das teorias existentes no campo. Argumentos e provas baseadas em comunicação de caráter pessoal ou divulgadas em documentos restritos não podem servir de apoio às argumentações do autor. Tanto as limitações do trabalho quanto suas implicações para futuras pesquisas devem ser esclarecidas. Incluir somente hipóteses e generalizações baseadas nos dados do trabalho. As conclusões podem finalizar esta parte, retomando o objetivo do trabalho ou serem apresentadas em item separado.

**E) Agradecimentos:** Este item é opcional e pode ser utilizado para mencionar os nomes de pessoas que, embora não preencham os requisitos de autoria, prestaram colaboração ao trabalho. Será preciso explicitar o motivo do agradecimento, por exemplo, consultoria científica, revisão crítica do manuscrito, coleta de dados etc. Deve haver permissão expressa dos nomeados e o autor responsável deve anexar a Declaração de Responsabilidade pelos Agradecimentos. Também pode constar desta parte apoio logístico de instituições.

**2.3 Citação no texto:** A exatidão das referências é de responsabilidade dos autores. Devem ser indicadas pelo seu número na listagem, na forma de expoente, sem uso de parênteses, colchetes e similares. Nos casos em que há citação do nome do autor, o número da referência deve ser colocado a seguir do nome do autor. Trabalhos com dois autores devem fazer referência aos dois autores ligados por “e”. Nos outros casos apresentar apenas o primeiro autor (seguido de et al, em caso de autoria múltipla).

### Exemplos:

- ◆ Nos Estados Unidos e Canadá, a obrigatoriedade da declaração dos nutrientes no rótulo do alimento é mais antiga e foram desenvolvidos métodos hidrolíticos, como o AOAC 996.061, de extração e determinação da GT por cálculo a partir dos AG obtidos por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (GC/DIC)<sup>2,3</sup>.
- ◆ Segundo Chang et al<sup>31</sup>, o aumento do tamanho das partículas resulta numa redução da área de superfície conferindo uma melhora na retenção e estabilidade das mesmas.

### 2.4 Referências:

Listadas ao final do texto, devem respeitar a quantidade definida para cada categoria de artigos aceitos pela RIAL. As referências devem ser normalizadas de acordo com o estilo *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication*, numeradas consecutivamente na ordem em que foram mencionadas a primeira vez no texto.

Os títulos de periódicos devem ser referidos de forma abreviada, de acordo com o *Medline*, disponível no endereço <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=journals>. Para consultar periódicos nacionais e latino-americanos: <http://portal.revistas.bvs.br/main.php?home=true&lang=pt>.

No caso de publicações com até seis autores, citam-se todos; acima de seis, citam-se os seis primeiros, seguidos da expressão latina “et al”. Referências de um mesmo autor devem ser organizadas em ordem cronológica crescente. Quando existente, incluir o endereço eletrônico contendo o (doi) na citação do artigo para a recuperação do documento.

### Exemplos:

#### Artigos de periódicos:

- ◆ Aued-Pimentel S, Zenebon O. Lipídios totais e ácidos graxos na informação nutricional do rótulo dos alimentos embalados: aspectos sobre legislação e quantificação. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2009;68(2):121-6.
- ◆ Conde MB, Melo FAF, Marques AMC, Cardoso NC, Pinheiro VGF, Dalcin PTR et al. III Diretrizes para Tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. *J Bras Pneumol*. 2009;35(10):1018-48. <https://dx.doi.org/10.1590/S1806-37132009001000011>.
- ◆ Lindsay RP, Shin SS, Garfein RS, Rusch MLA, Novotny TE. The association between active and passive smoking and latent tuberculosis infection in adults and children in the United States: results from NHANES. *PLoS One*. 2014;9(3):e93137. <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0093137>.
- ◆ Hennington EA. Acolhimento como prática interdisciplinar num programa de extensão. *Cad Saude Coletiva* [Internet]. 2005;21(1):256-65. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/csp/v21n1/28.pdf>.

#### Livros:

- ◆ Ringsven MK, Bond D. *Gerontology and leadership skills for nurses*. 2.ed. Albany (NY):Delmar Publishers;1996.
- ◆ Lopez D, organizador. *Estudos epidemiológicos qualitativos*. São Paulo: James Martim; 2009.
- ◆ Institute of Medicine (US). *Looking at the future of the Medicaid program*. Washington (DC): The Institute; 1992.
- ◆ Foley KM, Gelband H, editors. *Improving palliative care for cancer*. Washington: National Academy Press; 2001 [acesso 2003 Jul 13]. Disponível em: [http://www.nap.edu/catalog.php?record\\_id=10149](http://www.nap.edu/catalog.php?record_id=10149).

#### Capítulos de livro:

- ◆ Wirdh L. História da Epidemiologia. *In*: Lopez D, organizador. *Estudos epidemiológicos qualitativos*. São Paulo: James Martim; 2009.p.64-76.

#### Dissertações, teses e monografias:

- ◆ Santos EP. Estabilidade química da manteiga da terra [dissertação de mestrado]. Bananeiras (PB): Universidade Federal da Paraíba;1995.
- ◆ Moreschi ECP. Desenvolvimento e validação de métodos cromatográficos e avaliação da estabilidade de vitaminas hidrossolúveis em alimentos [tese de doutorado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2006.

#### Trabalhos de congressos, simpósios, encontros, seminários e outros:

- ◆ Colombo FA, Vidal JE, Oliveira ACP, Focaccia R, Pereira-Chioccola VL. O uso de métodos moleculares na avaliação do diagnóstico da toxoplasmose cerebral em pacientes com AIDS. III Encontro do Programa de Pós-Graduação em Infecções e Saúde Pública; agosto de 2004; São Paulo: *Rev Inst Adolfo Lutz*. p. 30 [resumo 28-PLSP].

#### Dados eletrônicos:

- ◆ Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo – SABESP. O que fazemos/Qualidade da água. [acesso 2008 Set 17]. Disponível em: <http://www.sabesp.com.br/CalandraWeb/CalandraRedirect/?temp=4&proj=sabesp&pub=T&db=&doci>.

### Legislação:

- ♦ Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 18, de 27 de abril de 2010. Dispõe sobre alimentos para atletas. Aprova o Regulamento Técnico sobre Alimentos para Atletas. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 28 abr 2010. Seção 1(79):211-2.

### Autoria institucional:

- ♦ Instituto Adolfo Lutz (São Paulo - Brasil). Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 4. ed. [1. ed. digital]. São Paulo (SP): Instituto Adolfo Lutz; 2008. Disponível em: [http://www.ial.sp.gov.br/resources/editorinplace/ial/2016\\_3\\_19/analisedealimentosial\\_2008.pdf](http://www.ial.sp.gov.br/resources/editorinplace/ial/2016_3_19/analisedealimentosial_2008.pdf).
- ♦ Organización Mundial de la Salud – OMS. Como investigar el uso de medicamentos em los servicios de salud. Indicadores seleccionados del uso de medicamentos. Ginebra; 1993. (DAP. 93.1).

### Patente:

- ♦ Larsen CE, Trip R, Johnson CR, inventors: Novoste Corporation, assignee. Methods for procedures related to electrophysiology of the heart. US patent 5,529,067. 1995 Jun 25.

Casos não contemplados nesta instrução devem ser citados conforme indicação em: Patrias K, Wendling D, Technical Editor. The NLM Style Guide for Authors, Editors, and Publishers. Citing Medicine. 2.ed. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7256/>.

Referências a documentos não indexados na literatura científica mundial, em geral de divulgação circunscrita a uma instituição ou a um evento (teses, relatórios de pesquisa, comunicações em eventos, dentre outros) e informações extraídas de documentos eletrônicos, não mantidas permanentemente em sites, se relevantes, devem figurar no rodapé das páginas do texto onde foram citadas.

**2.5 Números de figuras e tabelas:** A quantidade de figuras e tabelas de cada manuscrito deve respeitar a quantidade definida para cada categoria de artigos aceitos pela RIAL. Todos os elementos gráficos ou tabulares apresentados serão identificados como figura ou tabela, e não como quadros, gráficos etc. Figuras e tabelas serão numeradas separadamente, na sequência, a partir de um.

**A) Tabelas:** Devem ser redigidas em processador de texto *Word* ou compatível e serem apresentadas em arquivos separados, numeradas consecutivamente com algarismos arábicos, na ordem em que foram citadas no texto. A cada uma deve-se atribuir um título breve, não se utilizando traços internos horizontais ou verticais. As notas explicativas devem ser limitadas ao menor número possível e colocadas no rodapé das tabelas, e redigidas com a fonte *Times New Roman* tamanho 9. Se houver tabela extraída de outro trabalho, previamente publicado, os autores devem solicitar formalmente autorização da revista que a publicou, para sua reprodução.

**B) Figuras:** As ilustrações (fotografias, desenhos, gráficos etc.) devem ser citadas como Figuras, apresentadas em arquivos separados e numeradas consecutivamente com algarismos arábicos na ordem em que foram citadas no texto. Devem conter título e legenda apresentados na parte inferior da figura. Só serão admitidas para publicação as figuras suficientemente claras e com qualidade digital, no formato jpeg ou tif, com resolução mínima de 300 dpi. Figuras em pdf só serão aceitas em alta resolução (300 dpi). Se houver figura extraída de outro trabalho, previamente publicado, os autores devem solicitar autorização, por escrito, para sua reprodução.

**3. Declarações e documentos solicitados:** Em conformidade com as diretrizes do *International Committee of Medical Journal Editors*, são solicitados alguns documentos e declarações do(s) autor(es) para a avaliação de seu manuscrito. Observe a relação dos documentos abaixo e, nos casos em que se aplique, anexe o documento ao processo. O momento em que tais documentos serão solicitados é variável:

Documento/declaração	Quem assina	Quando anexar
Carta de Apresentação	Todos	Submissão
Responsabilidade pelos Agradecimentos	Autor responsável	Aprovação
Transferência de Direitos Autorais	Todos	Aprovação

A carta de Apresentação do manuscrito deve conter:

- ◆ A indicação da categoria do artigo em submissão.
- ◆ Assinatura de todos os autores e os respectivos endereços eletrônicos.
- ◆ Um parágrafo declarando a responsabilidade de cada autor: ter contribuído substancialmente para a concepção e planejamento ou análise e interpretação dos dados; ter contribuído significativamente na elaboração do rascunho ou na revisão crítica do conteúdo; e ter participado da aprovação da versão final do manuscrito. Para mais informações sobre critérios de autoria, consulte a página do ICMJE (<http://www.icjme.org>).
- ◆ Um parágrafo contendo a declaração de potenciais conflitos de interesses dos autores.
- ◆ Um parágrafo contendo a declaração que o trabalho não foi publicado, parcial ou integralmente, em outro periódico e que não se trata de plágio ou autoplágio. Todos os autores devem ler, assinar e enviar documento transferindo os direitos autorais. O artigo só será liberado para publicação quando esse documento estiver em posse da RIAL.
- ◆ Indicação de até três revisores, com afiliação e endereço eletrônico para contato.

#### 4. Verificação dos itens exigidos na submissão:

- a) Nome e instituição de afiliação de cada autor, incluindo endereço eletrônico e telefone do autor responsável.
- b) Título do manuscrito, em português e inglês.
- c) Texto apresentado em fonte *Times New Roman*, tamanho 12, em formato *Word* ou similar (doc, txt, rtf).
- d) Resumos em português e em inglês.
- e) Carta de Apresentação assinada por todos os autores.
- f) Nome da agência financiadora e número(s) do(s) processo(s).
- g) No caso de artigo baseado em tese/dissertação, indicar o nome da instituição/Programa, grau e o ano de defesa.
- h) Referências normalizadas segundo estilo *Vancouver*, ordenadas pela citação no texto e numeradas; verificar se todas estão citadas no texto.
- i) Tabelas numeradas sequencialmente, com título em fonte *Times New Roman*, tamanho 10 e notas em fonte *Times New Roman*, tamanho 9, e no máximo com 12 colunas, em formato *Word* ou similar (doc, txt, rtf).
- j) Figura nos formatos (tif, jpeg ou pdf), com resolução mínima 300 dpi.

**5. Avaliação preliminar:** Os manuscritos submetidos serão analisados inicialmente pelos editores quanto ao escopo, à redação científica, gramatical e ao atendimento às normas da RIAL. A baixa qualidade da redação acarretará na devolução do trabalho para revisão da linguagem pelo(s) autor(es) antes de iniciar o processo de submissão.

**6. Avaliação por pares:** Os manuscritos selecionados serão encaminhados para avaliação por relatores da área pertinente. Após receber os pareceres, o Corpo Editorial, que detém a decisão final sobre a publicação ou não do texto, avalia a sua aceitação sem modificações, a recusa ou a devolução ao(s) autor(es) com as sugestões apontadas pelos relatores. Caso sejam solicitadas modificações, o(s) autor(es) tem o prazo de até três semanas para reenviar o trabalho, para continuidade da avaliação.

**7. Revisão de estilo:** Após sua aprovação pelos editores, o manuscrito será submetido à revisão de estilo em língua portuguesa e/ou inglesa. A RIAL se reserva o direito de introduzir alterações nos originais, visando a manutenção da homogeneidade e qualidade da publicação, respeitando, porém, o estilo e as opiniões dos autores.

**8. Provas:** O manuscrito, revisado e aprovado, será encaminhado para diagramação. O autor responsável pela correspondência receberá as provas gráficas para revisão, em formato pdf (*portable document format*), por correio eletrônico. O Corpo Editorial poderá solicitar figuras com melhor resolução, caso seja necessário. Nesta fase, não serão aceitas mudanças no conteúdo do trabalho. O prazo máximo para a revisão da prova é de dois dias. É importante cumprir os prazos de revisão para evitar atrasos e garantir a publicação na sequência programada do volume.

**9. Publicação:** A partir de 2016 a RIAL adotou o sistema de publicação continuada em volume único. Os artigos serão publicados *online* no Portal do Instituto Adolfo Lutz <http://www.ial.sp.gov.br> em ordem cronológica de aprovação. As datas de recebimento e de aprovação do artigo constarão obrigatoriamente na publicação. Textos completos com acesso livre serão disponibilizados no Portal de Revistas em Veterinária e Zootecnia <http://revistas.bvs-vet.org.br/rialutz>, Portal LILACS <http://lilacs.bvsalud.org/>, BVS Rede de Informação e Conhecimento <http://ses.sp.bvs.br/>.

É permitida a reprodução, no todo ou em parte, de artigos publicados na RIAL, desde que sejam indicados a origem e o nome do autor, em conformidade com a legislação sobre os direitos autorais.







SECRETARIA  
DA SAÚDE

