

# A Produção do Conhecimento nas **Ciências** da **Saúde**

**Benedito Rodrigues da Silva Neto**  
(Organizador)



**Atena**  
Editora

Ano 2019

**Benedito Rodrigues da Silva Neto**

(Organizador)

# **A Produção do Conhecimento nas Ciências da Saúde**

Atena Editora  
2019

2019 by Atena Editora

Copyright © da Atena Editora

Editora Chefe: Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Diagramação e Edição de Arte: Lorena Prestes e Geraldo Alves

Revisão: Os autores

#### Conselho Editorial

- Prof. Dr. Alan Mario Zuffo – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas  
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília  
Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa  
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná  
Prof. Dr. Darllan Collins da Cunha e Silva – Universidade Estadual Paulista  
Profª Drª Deusilene Souza Vieira Dall’Acqua – Universidade Federal de Rondônia  
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul  
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria  
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionele delle Figlie de Maria Ausiliatrice  
Profª Drª Juliane Sant’Ana Bento – Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense  
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins  
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão  
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará  
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista  
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará  
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas  
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande  
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

#### Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)

P964 A produção do conhecimento nas ciências da saúde [recurso eletrônico] / Organizador Benedito Rodrigues da Silva Neto. – Ponta Grossa (PR): Atena Editora, 2019. – (A Produção do Conhecimento nas Ciências da Saúde; v. 1)

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader.

Modo de acesso: World Wide Web.

Inclui bibliografia

ISBN 978-85-7247-298-2

DOI 10.22533/at.ed.982193004

1. Abordagem interdisciplinar do conhecimento. 2. Saúde – Pesquisa – Brasil. I. Silva Neto, Benedito Rodrigues da. II. Série.

CDD 610.7

Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores.

2019

Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

[www.atenaeditora.com.br](http://www.atenaeditora.com.br)

## APRESENTAÇÃO

Com grande entusiasmo apresentamos o primeiro volume da coleção “A Produção do Conhecimento nas Ciências da Saúde”. Um trabalho relevante e sólido na área da saúde composto por atividades de pesquisa desenvolvidas em diversas regiões do Brasil.

Tendo em vista a importância dos estudos à nível microbiológico, para o avanço do conhecimento nas ciências da saúde, reunimos neste volume informações inéditas apresentadas sob forma de trabalhos científicos que transitam na interface da importância da microbiologia à nível clínico, patológico, social, ergonômico e epidemiológico.

Com enfoque direcionado às análises, avaliações, caracterização e determinantes ambientais, parasitológicos e econômicos, a obra apresenta dados substanciais de informações que ampliarão o conhecimento do leitor e que contribuirão com a formação e possíveis avanços nos estudos correlacionados às temáticas abordadas.

O interesse cada vez maior em conhecer e investigar no ambiente novos focos parasitários tem como base transformações provocadas por mudanças econômicas ou sociais, urbanização crescente, tratamentos e descartes inadequados de antibióticos, que propiciam aparecimento de novos focos. Assim, dados obtidos em diferentes locais sobre diferentes condições ambientais ou de desenvolvimento microbiano/ parasitário são relevantes para atualização do conhecimento sobre mecanismos de ação do agente patológico assim como diagnóstico e tratamento eficaz.

Uma vez que a interdisciplinaridade tem sido palavra chave nas ciências da saúde observaremos aqui um fio condutor entre cada capítulo que ampliará nossos horizontes e fomentará propostas de novos trabalhos científicos.

Assim, o conteúdo de todos os volumes é significativo não apenas pela teoria bem fundamentada aliada à resultados promissores, mas também pela capacidade de professores, acadêmicos, pesquisadores, cientistas e da Atena Editora em produzir conhecimento em saúde nas condições ainda inconstantes do contexto brasileiro. Desejamos que este contexto possa ser transformado a cada dia, e o trabalho aqui presente pode ser um agente transformador por gerar conhecimento em uma área fundamental do desenvolvimento como a saúde.

Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>1</b>
AVALIAÇÃO QUÍMICA, MICROBIOLÓGICA E SENSORIAL DE JAMBU ( <i>Spilanthes oleracea</i> L.) MINIMAMENTE PROCESSADO	
Laiane Cristina Freire Miranda Fernanda Rafaela Santos Sousa Alessandra Eluan da Silva Bielly Yohanne Pereira Costa Ana Carla Alves Pelais	
<b>DOI 10.22533/at.ed.9821930041</b>	
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>9</b>
PRESENÇA DE MICROFILÁRIAS DO GÊNERO LITOMOSOIDES ( <i>Nematoda: onchocercidae</i> ) EM MORCEGOS ( <i>Chiroptera: phyllostomidae</i> )	
Juliane da Silva Nantes Maria Clara Bomfim Brigatto Edvaldo dos Santos Sales Érica Verneque Martinez Marcelo Bastos de Rezende Jania Rezende Felipe Bisaggio Pereira Daniele Bier Carina Elisei De Oliveira	
<b>DOI 10.22533/at.ed.9821930042</b>	
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>18</b>
A CONTRIBUIÇÃO DA EDUCAÇÃO AMBIENTAL NA AGRICULTURA URBANA E PERIURBANA NO BRASIL	
Ernane Raimundo Maurity	
<b>DOI 10.22533/at.ed.9821930043</b>	
<b>CAPÍTULO 4</b> .....	<b>29</b>
ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE POLPAS DE AÇAÍ VENDIDAS POR AMBULANTES NA CIDADE DE CUIABÁ – MT	
Ana Paula de Oliveira Pinheiro Eliane Ramos de Jesus James Moraes de Moura	
<b>DOI 10.22533/at.ed.9821930044</b>	
<b>CAPÍTULO 5</b> .....	<b>38</b>
ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DE DRAGEADOS DE SOJA [ <i>Glycine max</i> (L.)] COM COBERTURA CROCANTE, SALGADA E SEM GLÚTEN	
Lúcia Felicidade Dias Isabel Craveiro Moreira Andrei Thais Garcia Bortotti Sumaya Hellu El Kadri Nakayama Deivid Padilha Schena	
<b>DOI 10.22533/at.ed.98219300445</b>	

**CAPÍTULO 6 ..... 47**

**AS LEISHMANIOSES NOS MUNICÍPIOS QUE COMPÕEM A SUPERINTENDENCIA REGIONAL DE SAÚDE DE DIAMANTINA – MG**

Ana Flávia Barroso  
Maria da Penha Rodrigues Firmes  
Daisy de Rezende Figueiredo Fernandes  
Carolina Di Pietro Carvalho

**DOI 10.22533/at.ed.98219300446**

**CAPÍTULO 7 ..... 62**

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS OBTIDOS DAS FRUTAS *Theobroma grandiflorum* E *Mauritia flexuosa***

George Barros Chaves  
Gabrielle Damasceno Evangelista Costa  
Maria Clara Caldas Costa  
Yasmim Costa Mendes  
Gabrielle Pereira Mesquita  
Lívia Muritiba Pereira de Lima Coimbra  
Luís Cláudio Nascimento da Silva  
Adrielle Zagnignan

**DOI 10.22533/at.ed.98219300447**

**CAPÍTULO 8 ..... 75**

**AVALIAÇÃO DE DISTÚRBIOS PULMONARES E MUDANÇA NAS ATIDADES DIÁRIAS EM TRABALHADORES CANAVIEIROS EM RUBIATABA-GO**

Menandes Alves de Souza Neto  
Jéssyca Rejane Ribeiro Vieira  
Juliana Aparecida Correia Bento  
Suellen Marçal Nogueira  
Luiz Artur Mendes Bataus  
Luciano Ribeiro Silva

**DOI 10.22533/at.ed.98219300448**

**CAPÍTULO 9 ..... 86**

**AVALIAÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA DE COMPÓSITOS OBTIDOS A PARTIR DE PEEK/CaCO<sub>3</sub>**

Mayelli Dantas de Sá  
José William de Lima Souza  
Michele Dayane Rodrigues Leite  
José Filipe Bacalhau Rodrigues  
Hermano de Vasconcelos Pina  
Marcus Vinicius Lia Fook

**DOI 10.22533/at.ed.98219300449**

**CAPÍTULO 10 ..... 98**

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DE PRODUTO TIPO CAVIAR DEFUMADO PROVENIENTE DA TRUTA ARCO-ÍRIS (*Onchorynchus mykiss*)**

André Luiz Medeiros de Souza  
Flávia Aline Andrade Calixto  
Frederico Rose Lucho  
Marcos Aronovich  
Eliana de Fátima Marques de Mesquita

**DOI 10.22533/at.ed.982193004410**

<b>CAPÍTULO 11</b> .....	<b>103</b>
AVALIAÇÃO DO TESTE RÁPIDO PARA DETECÇÃO DO VÍRUS HIV EM APARECIDA DE GOIÂNIA – GO	
Mariley Gomes da Silva Lucas Alexander Itria	
<b>DOI 10.22533/at.ed.982193004411</b>	
<b>CAPÍTULO 12</b> .....	<b>117</b>
AVALIAÇÃO DOS ASPECTOS HIGIÊNICO-SANITÁRIOS DA COMERCIALIZAÇÃO DE PESCADO “IN NATURA” NO MERCADO DE PEIXES DO VER-O-PESO NO MUNICÍPIO DE BELÉM, PARÁ	
Sheylle Marinna Martins Garcia Nathalia Rodrigues Cardoso Malena Marília Martins Gatinho	
<b>DOI 10.22533/at.ed.982193004412</b>	
<b>CAPÍTULO 13</b> .....	<b>126</b>
CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DE <i>NUGGETS</i> DE FRANGO ENRIQUECIDO COM B-GLUCANA	
Evellin Balbinot-Alfaro Karen Franzon Kari Cristina Pivatto Alexandre da Trindade Alfaro Cristiane Canan	
<b>DOI 10.22533/at.ed.982193004413</b>	
<b>CAPÍTULO 14</b> .....	<b>136</b>
DETERMINING CONTAMINANTS IN MINCED MEAT FROM BUTCHERIES IN CUIABÁ AND VÁRZEA GRANDE – MT	
Luan Stewart de Paula Jales de Oliveira James Moraes de Moura Alan Tocantins Fernandes	
<b>DOI 10.22533/at.ed.982193004414</b>	
<b>CAPÍTULO 15</b> .....	<b>144</b>
EPIDEMIOLOGIA DO HPV (PAPILOMAVÍRUS HUMANO) EM ADOLESCENTES, NA CIDADE DE ARAÇATUBA-SP	
Mayara Pepece Brassioli Gislene Marcelino Rossana Abud Cabrera-Rosa Juliane C.T. Sanches Natalia Félix Negreiros	
<b>DOI 10.22533/at.ed.982193004415</b>	
<b>CAPÍTULO 16</b> .....	<b>153</b>
INFECÇÃO SIMULTÂNEA POR MORBILIVÍRUS CANINO E ADENOVÍRUS EM UM MÃO-PELADA ( <i>Procyon cancrivorus</i> )	
Mariana de Mello Zanim Michelazzo Nayara Emily Viana Zalmir Silvino Cubas Selwyn Arlington Headley	
<b>DOI 10.22533/at.ed.982193004416</b>	

<b>CAPÍTULO 17</b> .....	<b>156</b>
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA: EPIDEMIOLOGIA DA FORMA MUCOSA NO ESTADO DO TOCANTINS NO PERÍODO DE 2011 A 2015	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Bruna Silva Resende</li> <li>Ana Livia Fonseca Ferreira</li> <li>Fernanda da Silva Ferreira</li> <li>Joandson dos Santos Souza</li> <li>Deyse Sabrinne de Souza Lopes</li> <li>Carina Scolari Gosch</li> </ul>	
<b>DOI 10.22533/at.ed.982193004417</b>	
<b>CAPÍTULO 18</b> .....	<b>173</b>
MICROBIOLOGICAL AND HUMIDITY ASSESSMENT OF BEANS GRAINS MARKETED IN THE MARKET OF PORTO, CUIABÁ - MT	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Gabriela Campos Caxeiro</li> <li>James Moraes de Moura</li> <li>Daniela Fernanda Lima de Carvalho Cavenaghi</li> <li>Alan Tocantins Fernandes</li> </ul>	
<b>DOI 10.22533/at.ed.982193004418</b>	
<b>CAPÍTULO 19</b> .....	<b>183</b>
OPTIMIZATION OF HYDROALCOHOLIC EXTRACTION OF CRUDE GUARANA SEEDS: PHENOLIC CONSTITUENTS, METHYLYXANTHINES AND ANTIOXIDANT CAPACITY	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Ádina Lima de Santana</li> <li>Gabriela Alves Macedo</li> </ul>	
<b>DOI 10.22533/at.ed.982193004419</b>	
<b>CAPÍTULO 20</b> .....	<b>197</b>
PERFIL DE SENSIBILIDADE DE STAPHYLOCOCCUS SPP. ENTEROCOCCUS SPP. E ESCHERICHIA COLI ISOLADOS DE MUÇARELA A ANTIBIÓTICOS DE USO FARMACÊUTICO	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Juliana dos Santos Loria de Melo</li> <li>Carolina Riscado Pombo</li> </ul>	
<b>DOI 10.22533/at.ed.982193004420</b>	
<b>CAPÍTULO 21</b> .....	<b>205</b>
PERFIL DE SENSIBILIDADE DE <i>Staphylococcus</i> SPP. <i>Enterococcus</i> SPP. E ESCHERICHIA COLI ISOLADOS DE SALSICHA A ANTIBIÓTICOS DE USO FARMACÊUTICO	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Juliana dos Santos Loria de Melo</li> <li>Carolina Riscado Pombo</li> </ul>	
<b>DOI 10.22533/at.ed.982193004421</b>	
<b>CAPÍTULO 22</b> .....	<b>213</b>
POTENCIAL PRODUÇÃO DE BIOMATERIAL PELA CIANOBACTÉRIA AMAZÔNICA <i>Tolypothrix</i> SP. CACIAM 22	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Diana Gomes Gradíssimo</li> <li>Murilo Moraes Mourão</li> <li>Samuel Cavalcante do Amaral</li> <li>Alex Ranieri Jerônimo Lima</li> <li>Evonnildo Costa Gonçalves</li> <li>Luciana Pereira Xavier</li> <li>Agenor Valadares Santos</li> </ul>	
<b>DOI 10.22533/at.ed.982193004422</b>	



<b>CAPÍTULO 23</b> .....	<b>225</b>
PRODUÇÃO DE LIPASE POR <i>Yarrowia lipolytica</i> PARA APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Jully Lacerda Fraga</li> <li>Adejanildo da Silva Pereira</li> <li>Fabiane Ferreira dos Santos</li> <li>Kelly Alencar Silva</li> <li>Priscilla Filomena Fonseca Amaral</li> </ul>	
<b>DOI 10.22533/at.ed.982193004423</b>	
<b>CAPÍTULO 24</b> .....	<b>230</b>
QUALIDADE DA FARINHA DE MANDIOCA ( <i>Manihot esculenta Crantz</i> ) EM COMUNIDADE TRADICIONAL DO MUNICÍPIO DE MACAPÁ-AP	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Lia Carla de Souza Rodrigues</li> <li>Roberto Quaresma Santana</li> <li>Jorge Emílio Henriques Gomes</li> <li>Marília de Almeida Cavalcante</li> </ul>	
<b>DOI 10.22533/at.ed.982193004424</b>	
<b>CAPÍTULO 25</b> .....	<b>236</b>
QUANTIFICAÇÃO DE TMA EM CARANHAS DESCONGELADAS E RECONGELADAS POR RMN DE <sup>1</sup> H	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Vinícius Silva Pinto</li> </ul>	
<b>DOI 10.22533/at.ed.982193004425</b>	
<b>CAPÍTULO 26</b> .....	<b>248</b>
RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE ENTEROBACTÉRIAS ISOLADAS A PARTIR DE FRUTAS E HORTALIÇAS COMERCIALIZADAS EM CAPANEMA, PARÁ	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Suania Maria do Nascimento Sousa</li> <li>Cintya de Oliveira Souza</li> <li>Fagner Freires de Sousa</li> <li>Patrícia Suelene Silva Costa Gobira</li> <li>Hellen Kempfer Philippsen</li> </ul>	
<b>DOI 10.22533/at.ed.982193004426</b>	
<b>CAPÍTULO 27</b> .....	<b>259</b>
USO DE FERMENTAÇÃO POR LACTOBACILOS PARA AUMENTO DAS CARACTERÍSTICAS ANTIOXIDANTES DE <i>Theobroma grandiflorum</i>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Amanda Caroline de Souza Sales</li> <li>Brenda Ferreira de Oliveira</li> <li>Hermerson Sousa Maia</li> <li>Warlison Felipe de Silva Saminez</li> <li>Tiago Fonseca Silva</li> <li>Rita de Cássia Mendonça de Miranda</li> <li>Adrielle Zagnignan</li> <li>Luís Cláudio Nascimento da Silva</li> </ul>	
<b>DOI 10.22533/at.ed.982193004427</b>	
<b>CAPÍTULO 28</b> .....	<b>276</b>
VIGILÂNCIA DE EPIZOOTIAS EM PRIMATAS NÃO HUMANOS (PNH) ENTRE 2015	

A 2017 NO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE, BRASIL

Danielle Domingos da Silva

Durval Moraes da Silva

Cintia de Sousa Higashi

Fabiola de Souza Medeiros

**DOI 10.22533/at.ed.982193004428**

**SOBRE O ORGANIZADOR..... 284**

## AVALIAÇÃO QUÍMICA, MICROBIOLÓGICA E SENSORIAL DE JAMBU (*Spilanthes oleracea* L.) MINIMAMENTE PROCESSADO

### **Laiane Cristina Freire Miranda**

Universidade do Estado do Pará (UEPA)  
Belém - Pará.

### **Fernanda Rafaela Santos Sousa**

Universidade do Estado do Pará (UEPA)  
Belém - Pará.

### **Alessandra Eluan da Silva**

Universidade do Estado do Pará (UEPA)  
Belém - Pará.

### **Bielly Yohanne Pereira Costa**

Universidade Federal do Pará (UFPA)  
Belém - Pará

### **Ana Carla Alves Pelais**

Universidade do Estado do Pará (UEPA)  
Belém - Pará.

**RESUMO:** O jambu é uma hortaliça muito consumida na região Norte, porém para o seu consumo é necessário um certo preparo. Dessa forma esse estudo tem por objetivo o processamento mínimo de jambu. O mesmo foi obtido em feira local, processado nas etapas de seleção, lavagem, corte da raiz, sanitização, enxágue final, drenagem e acondicionamento. Em seguida foi realizada sua caracterização química, microbiológica e aceitação sensorial. Foi quantificado o teor de umidade, proteína, lipídio, acidez, pH, sólidos solúveis e vitamina C. As análises microbiológicas foram coliformes a 35°C e 45°C, bactérias psicrotróficas e

salmonella. A aceitação sensorial foi realizada com 100 julgadores, pedindo que indicassem uma nota para os atributos aparência e odor, de acordo com a escala hedônica de 9 pontos, além de verificarem a intenção de compra. O resultado físico-químico mostrou que a umidade foi de 91,58% para o produto, o que contribui para uma rápida deterioração e teor de vitamina C 10,33 mg/g. Os resultados microbiológicos estão de acordo com a legislação. A aceitação para aparência foi de 85,80% e intenção de compra foi de 46,5%. Assim o produto pode ser comercializado mantendo sua característica semelhante ao do jambu *in natura*; seguridade microbiológica e aceitação sensorial.

**PALAVRAS-CHAVE:** processamento mínimo; análise sensorial; comercialização; seguridade microbiológica.

**ABSTRACT:** Jambu is a vegetable, is very consumed in the North, but for its consumption it's necessary to prepare. Thus, the goal of this study is the minimum processing of jambu. The same was obtained in local fair, processed in the stages of selection, washing, root cutting, sanitization, final rinsing, drainage and packaging. The chemical characterization, microbiology and sensorial acceptance were then performed. Moisture, protein, lipid, acidity, pH, soluble solids and vitamin C were quantified. Microbiological analyzes were coliforms at 35

° C and 45 ° C, psychrotrophic bacteria and salmonella. Sensory acceptance was performed with 100 judges, asking them to indicate a note for the appearance and odor attributes, according to the hedonic scale and another for purchase intention. The physical-chemical result showed that moisture was 91.58% for the product, which contributes to fast deterioration and vitamin C content 10.33 mg / g. The microbiological results are in accordance with the legislation. Acceptance for appearance was 85.80% and purchase intention was 46.5%. Thus the product can be commercialized maintaining its characteristic similar to that of jambu *in natura*; microbiological safety and sensory acceptance.

**KEYWORDS:** Minimum processing; sensory analysis; commercialization; microbiological safety.

## 1 | INTRODUÇÃO

As hortaliças são plantas de suma importância para o fornecimento principalmente de vitaminas, sais minerais e fibras, com algumas delas também servindo como fonte de carboidratos e proteínas. Dessa forma, ações que visem a incentivar o consumo de hortaliças e, particularmente, de variedades locais são importantes para a diversidade e riqueza da dieta das populações e perpetuação de bons hábitos alimentares (BRASIL, 2010).

O jambu (*Spilanthes oleracea*. L.) é uma hortaliça típica da região Norte, principalmente do Estado do Pará, onde é consumido em grande escala nos pratos típicos, como o pato no tucupi, tacacá, arroz com jambu, pizza, e nas bebidas alcoólicas, como a cachaça e o licor de jambu. Sua demanda é maior nos períodos festivos, como festas juninas, Natal e principalmente no mês de outubro, em que se comemora o Círio de Nazaré (SILVA, 2015).

No Brasil, embora haja grande disponibilidade de produtos hortícolas acessíveis à substancial parcela da população, observam-se níveis inaceitáveis de perdas destes produtos devido a técnicas inadequadas adotadas desde a colheita até o armazenamento (ALVES *et al.*, 2009).

Chitarra & Chitarra (2005) explicam que as perdas de hortaliças começam no ato da colheita e se seguem no decorrer da cadeia produtiva, o resultado é o murchamento e alteração na coloração, além da questão microbiológica.

As cadeias agroalimentares de hortaliças vêm sendo beneficiadas pelo uso da tecnologia de processamento mínimo. A qualidade e a comodidade são motivações para a compra. As pessoas estão cada vez mais em busca de refeições saudáveis e de praticidade na preparação das refeições, sendo assim, a procura por hortaliças minimamente processadas têm sido cada vez mais constante entre os consumidores. Além disso, o impacto desta tecnologia favorece a redução do desperdício e de perdas pós-colheita (BRECHT *et al.*, 2007; ALMEIDA, 2013).

Dessa forma, o trabalho tem como objetivo adequar a técnica do processamento mínimo do jambu, e avaliar suas características químicas, microbiológicas e a aceitação sensorial.

## **2 | METODOLOGIA**

O trabalho foi desenvolvido no Centro de Ciências Naturais e Tecnologia (CCNT) da Universidade do Estado do Pará (UEPA), em Belém do Pará, nos Laboratórios de processamento de alimentos, microbiologia de alimentos e química.

### **2.1 Processamento mínimo de jambu**

Foram realizados testes preliminares de adequação do fluxograma do processamento. A matéria-prima foi adquirida em uma feira local e transportada até o laboratório. O jambu foi submetido à lavagem em água corrente para retirada de sujidades mais grosseiras. Em seguida foi feita a pesagem da planta inteira e a retirada de partes injuriadas como folhas amassadas, rasgadas, escurecidas e a retirada da inflorescência. Após, realizou-se um corte com faca inoxidável para a remoção de um 1/3 da raiz e novamente pesada a parte comestível, e em seguida um enxágue das folhas em água em torno de 5 °C, para a retirada do suco celular. Na sequência, o jambu foi imerso na solução de dicloro isocianurato de sódio dihidratada na concentração de 200 mg.L<sup>-1</sup> por 15 min. Em seguida ocorreu o enxágue final do material em solução de dicloro isocianurato de sódio dihidratada na concentração de 5 mg.L<sup>-1</sup> por 5 minutos. Após, foi realizada a drenagem em escuradores brancos de polietileno, tendo leves movimentos a cada 3 minutos, para facilitar a retirada de água, com duração em torno de 10 minutos. Em seguida o jambu foi colocado em embalagem estéril de polietileno e foi feita a pesagem de 30 g de produto.

### **2.2 Caracterização Química**

O jambu processado foi caracterizado de acordo com análises de umidade; proteína; lipídeos; acidez potenciométrica; pH por leitura direta em pHmetro e determinação de sólidos solúveis por refratometria, com o auxílio de um Refractometer e vitamina C, de acordo com o método da AOAC (2012).

### **2.3 Caracterização Microbiológica**

O jambu processado foi analisado microbiologicamente quanto aos coliformes a 35 °C e 45 °C, bactérias psicrotróficas e Salmonella de acordo com a metodologia proposta em VANDERZANT e SPLITTSTOESSER (1992).

## 2.4 Avaliação sensorial

Para a realização do teste sensorial, o projeto foi aprovado na avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa (1.965.326) do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da Universidade do Estado do Pará (UEPA), atendendo para atender às exigências éticas e científicas dispostas na resolução de 12 de dezembro de 2012 do Conselho Nacional de Saúde (CNS, 2012). Foram avaliados amostras de jambu minimamente processados após o processamento com 100 consumidores em 2 repetições. Cada consumidor recebeu a amostra de 5g de jambu dentro de um saco plástico selado e uma ficha de avaliação para cada amostra, utilizando a escala hedônica de 9 pontos, sendo atribuído nota 9 para gostei extremamente e 1 para desgostei extremamente, de acordo com Minim (2006). Foi solicitado que avaliassem a aparência e odor, logo após a abertura da embalagem. Na mesma ficha, para cada amostra foi avaliada a intenção de compra com cinco pontos onde: Certamente compraria (5), Possivelmente compraria (4), Talvez comprasse/Talvez não comprasse (3), Possivelmente não compraria (2) e Certamente não compraria (1) de acordo com Dutcosky (2011).

## 3 | RESULTADO E DISCUSSÃO

Os valores de caracterização química estão expressos na Tabela 1, no qual há os menores valores para acidez (0,09 %), lipídios (0,61 %) e proteínas (2,35 %).

Determinação	Pesquisa
Proteínas %	2,35 ± 0,0
Umidade %	91,58 ± 0,2
Lipídios %	0,61
pH	7,01 ± 0,4
Acidez %	0,09 ± 0,0
SST**	5 ± 1,4
Vitamina C*	10,66 ± 2,18

Tabela 1 - Média e desvio padrão da caracterização química do jambu minimamente processado.

\*Expresso em ácido ascórbico, \*\* Expresso em °BRIX

Não existem valores para jambu minimamente processado em literatura. No entanto, O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (2011) caracterizou o jambu *in natura*, este obteve resultado menor de proteínas e lipídios, (1,90 %) e (0,30 %), respectivamente. Essa diferença, segundo Mücke et al (2012), pode ser explicada devido ao tipo de tratamento dado durante a pós-colheita, como também, sua genética, já que ela define sua composição química.

O alto teor de umidade encontrado no jambu minimamente processado confirma a necessidade de cuidados no armazenamento para evitar possíveis deteriorações. A umidade está relacionada com a composição, qualidade e estabilidade e pode afetar a estocagem; embalagem e processamento (CECCHI, 2003).

O de pH neutro encontrado nas folhas do jambu evidencia a estreita relação da hortaliça com a faixa de crescimento ótimo da maioria das bactérias. Verifica-se que pH em torno da neutralidade, isto é, entre 6,5 e 7,5, é o mais favorável para a maioria dos microrganismos (FRANCO LANDGRAF, 2008).

A análise de concentração de sólidos solúveis totais obteve resultado equivalente ao encontrado por Silva (2015) em jambu *in natura*, 5 °Brix. A quantificação dos sólidos solúveis se faz importante porque os carboidratos conferem o sabor doce do vegetal, além de serem fontes energéticas para o crescimento microbiano (SILVA, 2015).

O valor de vitamina C encontrado nesta pesquisa foi menor quando comparado ao exposto por Silva (2015), 12,94 mg/100g. A vitamina C ou ácido ascórbico, está amplamente distribuída na natureza em altas concentrações, é encontrada principalmente nas frutas cítricas (laranja, limão etc.) e em várias outras frutas e verduras. O teor de ácido ascórbico não é uniforme entre as diversas fontes, diferindo com a espécie (MORETTO, 2002). É um nutriente indispensável para o organismo humano, sendo bom agente antioxidante encontrado em uma ampla variedade de vegetais (TEIXEIRA NETO, 2009; BELCHIOR; BUENO, 2014).

Os resultados microbiológicos estão apresentados na Tabela 2 e preconizados segundo a RDC nº 12 de 02 de Janeiro de 2001 (BRASIL, 2001), estabelecendo limites apenas para coliformes termotolerantes e *salmonella* sp. No entanto, foram feitas análises com coliformes totais e bactérias psicrotróficas. Segundo Silva (2015) os coliformes totais são um indicativo de qualidade. Já as psicrotróficas, no qual foram estudadas por Pinto (2007), evidencia que as hortaliças minimamente processadas quando expostas a temperaturas de refrigeração podem se tornar meios para produção desse tipo de organismos.

<b>Determinações</b>	<b>Jambu minimamente processado</b>
<b>Coliformes totais (NMP/g)</b>	1,5 x 10 <sup>2</sup>
<b>Coliformes termotolerantes (NMP/g)</b>	9,3 x 10 <sup>1</sup>
<b><i>Salmonella</i> sp. (em 25 g)</b>	Ausência
<b>Bactérias psicrotróficas (UFC/g)</b>	7,0 x 10 <sup>1</sup>

Tabela 2 - Caracterização microbiológica do jambu minimamente processado.

Os resultados para os coliformes totais de 1,5 x 10<sup>2</sup> NMP/g em comparação com Frittoli e Rodrigues (2014), que analisaram hortaliças minimamente processadas e encontraram o valor de 1,5 x 10<sup>2</sup> para algumas amostras e estabeleceu com base em outras literaturas que estas eram seguras para consumo. Para Berbari et al (2001) há

a contaminação por coliformes totais quando este é superior a  $1,1 \times 10^3$  NMP.

Para coliformes termotolerantes foi encontrado  $9,3 \times 10^1$  NMP/g e ausência de Salmonella, isso mostra que estão de acordo com a legislação vigente. Segundo Brasil (2001) a tolerância para este grupo é de  $10^2$  NMP/g e ausência de Salmonella em 25 gramas de amostra, provando que os resultados obtidos estão em conformidade com a resolução.

Para bactérias psicotróficas foi encontrado o valor de  $7 \times 10$  UFC/g. De acordo com Vitti et al. (2004), por questão de perdas sensoriais e uma possível contaminação, é preconizada um valor acima de  $10^5$  UFC/g um risco de contaminação por este microrganismo.

Com relação aos resultados da avaliação sensorial, para o atributo aparência e odor, os índices de aceitação foram de 90,55 % e 81,05 % (respectivamente), o que comprova que mesmo sofrendo pequenas perdas pós-colheita e de processamento, ainda adquire índices altos de aceitabilidade. Segundo Meilgaard et al. (1991), o índice de aceitabilidade com boa repercussão é igual ou superior a 70 %.

A Tabela 3 tem-se os resultados da intenção de compra para o jambu minimamente processado com resultados positivos para possivelmente compraria (46,5 %) e certamente compraria (40 %). Isso mostra que se o produto fosse vendido teria possíveis compradores.

<b>Atributos</b>	<b>Resultado %</b>
<b>Certamente compraria</b>	40,0 %
<b>Possivelmente compraria</b>	46,5 %
<b>Talvez sim/talvez não</b>	9,5 %
<b>Possivelmente não compraria</b>	4,0 %

Tabela 3 - Resultado em percentual do teste de intenção de compra para o jambu minimamente processado.

Almeida (2013) mostrou em seus estudos que nos últimos anos a compra do minimamente processado aumentou devido, principalmente, a comodidade que o produto oferece, além da questão de qualidade, já que no processamento mínimo usa-se sanitizantes para diminuir a carga microbiana.

#### **4 | CONCLUSÃO**

Na caracterização físico-química notou-se que o jambu tem alto valor de umidade, desta forma o cuidado com o armazenamento se faz necessário, pois é grande o risco de contaminação microbiológica.



O produto se mostrou uma boa fonte de vitamina C, sendo este um antioxidante indispensável na dieta do homem. Todos os testes microbiológicos estão de acordo com legislação e algumas literaturas e comprovam qualidade da sanitização feita no processamento.

Na sensorial verificou-se um bom índice de aceitação e um potencial produto com um público de compra. Diante dos resultados, constata-se a extrema importância para futuras análises, visto que ainda são poucas as pesquisas no âmbito de minimamente processados envolvendo o Jambu que é bastante consumido na região norte do Brasil.

## REFERÊNCIAS

AOAC. Association Of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of Chemistry**. 19 ed. 2012.

ALMEIDA, A. G. **Hortaliças minimamente processadas: Percepção dos consumidores sobre os atributos de qualidade e evolução do mercado**. 2013. 137 p. Dissertação (Mestrado em agronegócios) - Universidade de Brasília, 2013.

ALVES, J. A. et al. Qualidade de produto minimamente processado à base de abóbora, cenoura, chuchu e mandioquinha-salsa. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 30(3): 625-634, jul.-set. 2010

BELCHIOR, L. G. & BUENO, S. M. **Determinação do teor de vitamina c em comprimidos efervescentes de diferentes marcas comerciais**. 2014; Trabalho de Conclusão de Curso; (Graduação em Farmácia) - União das Faculdades dos Grandes Lagos. 2014.

BERBARI, S.A.G.; *et al.*, N.F.A. Efeito do cloro na água de lavagem para desinfecção de alface minimamente processada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.21, n.2, p. 197-201, maio/ago. 2001.

DUTCOSKY, Silva Debovi. **Análise Sensorial de Alimentos**. Curitiba: Champagnat. 3ed. Ver. E ampl. p 175. 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de hortaliças não-convencionais**. 1 ed. Brasília: Mapa/ACS, 2010. 92 p.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – **ANVISA. Resolução RDC nº. 12 de 2 de Janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC\\_12\\_2001.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC_12_2001.pdf?MOD=AJPERES).

BRECHT, J.K.; et al. **Manual de Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2007. 531p.

CECCHI, H. M. **fundamentos teórico e prático em análise de alimentos**. 2a edição. Campinas, SP: editora da Unicamp, 2003.

CHITARRA, M.I.F; CHITARRA, A.B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2. ed. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2005. 785 p.

FRANCO, Bernadette Dora Gombossy de Melo; LANDGRAF, Mariza. **Microbiologia dos alimentos**. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 196 p.

FRITTOLI, R. B.; RODRIGUES, L. H. Análise de coliformes termotolerantes e salmonella sp. em

amostras de hortaliças minimamente processadas. **Revista Científica da FHOIUNIARARAS** v. 2, n. 2, 2014.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. **Tabelas de composição nutricional dos alimentos consumidos no Brasil**. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009, Rio de Janeiro: IBGE, 2011. 351p

MENEZES, E.M.S.; et al. Folhas de alface lisa (*lactuca sativa*) minimamente processadas armazenadas em atmosfera modificada: análises físicas, químicas e físico-químicas. **Ciência e Tecnologia Alimentos**, v.25, n.1, p.060-062, 2005

MEILGAARD, M. et al.. **Sensory evaluation techniques**. 2. ed. London: CRC Press, 1991. 354 p.

MINIM, V. P. R. **Análise Sensorial: estudo com consumidores**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2006. 225 p.

MORETTO, E. FETT R.; GONZAGA, L.V.; KUSKOSKI, E.M. **Introdução à ciência de alimentos**. Editora da UFSC, 255p., 2002.

MÜCKE, L. R. et al. **Avaliação comparativa de parâmetros físico-químicos entre vegetais minimamente processados e in natura**. 2012. 73 f. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Medianeira, 2012.

PINTO, A. R. C. **Qualidade microbiológica de frutas e hortaliças minimamente processadas: uma revisão**. 2007. 49 f. Monografia (Especialização em Tecnologia de Alimentos)-Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

SILVA, A. E. **Jambu (*Spilanthus oleracea* Linn.) minimamente processado: compostos bioativos e caracterização físico-química, microbiológica e sensorial**. 2015. 91 p. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa. 2015.

TEIXEIRA NETO, F.; **Nutrição clínica Rio de Janeiro: Guanabara Koogan**, 2009; p. 76.

VANDERZANT, C. & SPLITTSTOESSER, D.F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3. ed. Washington: American Public Health Association, 1992.

VITTI, M.C.D.; et al. Aspectos fisiológicos e microbiológicos de beterrabas minimamente processadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.10, p. 1027-1032, out. 2004.

## PRESENÇA DE MICROFILÁRIAS DO GÊNERO LITOMOSOIDES (*Nematoda: onchocercidae*) EM MORCEGOS (*Chiroptera: phyllostomidae*)

### **Juliane da Silva Nantes**

Universidade Católica Dom Bosco  
Campo Grande – Mato Grosso do Sul

### **Maria Clara Bomfim Brigatto**

Universidade Católica Dom Bosco  
Campo Grande – Mato Grosso do Sul

### **Edvaldo dos Santos Sales**

Universidade Católica Dom Bosco  
Campo Grande – Mato Grosso do Sul

### **Érica Verneque Martinez**

Universidade Católica Dom Bosco  
Campo Grande – Mato Grosso do Sul

### **Marcelo Bastos de Rezende**

Universidade Católica Dom Bosco  
Campo Grande – Mato Grosso do Sul

### **Jania Rezende**

Universidade Católica Dom Bosco  
Campo Grande – Mato Grosso do Sul

### **Felipe Bisaggio Pereira**

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
Bolsista Pós Doc do Programa de Pós-Graduação  
em Biologia Animal  
Campo Grande – Mato Grosso do Sul

### **Daniele Bier**

Universidade Católica Dom Bosco  
Campo Grande – Mato Grosso do Sul

### **Carina Elisei De Oliveira**

Universidade Católica Dom Bosco  
Campo Grande – Mato Grosso do Sul

**RESUMO:** O conhecimento sobre os animais silvestres, bem como os possíveis agentes patogênicos que estes podem hospedar vem ganhando ênfase mundial, tendo em vista que sua proximidade com seres humanos e animais domésticos torna-se cada vez mais frequente, o que os fazem potenciais disseminadores e reservatórios de patógenos. O presente estudo tem como objetivo relatar a presença de microfilárias de *Litomosoides* sp. (hemoparasitos) em morcegos. Para a realização do estudo foram capturados 93 morcegos pertencentes a quatro espécies *Artibeus lituratus*, *Artibeus planirostris*, *Carollia perspicillata* e *Glossophaga soricina*. O material coletado consistiu em amostras sanguíneas para esfregaço sanguíneo e fragmentos de fígado, pulmão, coração e baço para a técnica de imprint. As amostras foram submetidas a extração de DNA e posteriormente, amplificado pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com os pares de oligonucleotídeos para a região DNA ribossomal 18S e 28S. Nos esfregaços sanguíneos e *imprint's* foi possível observar a presença de hemoparasitos do gênero *Litomosoides* em quatro animais, sendo três da espécie *A. planirostris* e um de *A. lituratus*. O produto amplificado pela PCR foi sequenciado e posteriormente à pesquisa no banco de dados GenBank. Com identidade de 93% para *Litomosoides sigmodontis* (acesso

156927) com 93% de cobertura da região 18S e, 82% de identidade para *Litomosoides hamletti* (acesso 168509); 63% de cobertura da região 28S. Com resultados obtidos no sequenciamento e a confrontação com o banco de dados conclui-se que a espécie de microfilária encontrada pode ser uma espécie nova, entretanto para confirmar essa hipótese seria necessário a descrição das formas adultas do parasito.

**PALAVRAS-CHAVE:** Parasitologia, Chiroptera, *Litomosoides*.

**ABSTRACT:** Knowledge about wild animals, as well as the possible pathogens that they can host, is gaining worldwide emphasis, since their proximity to humans and domestic animals is becoming more frequent, making them potential disseminators and reservoirs of pathogens. The present study reports the presence of microfilariae of *Litomosoides* sp. (hemoparasites), which parasitize bats. For the collection of biological material, 93 bats belonging to four species *Artibeus lituratus*, *Artibeus planirostris*, *Carollia perspicillata* and *Glossophaga soricina* were captured. The material collected consisted of blood samples for blood smear and fragments of liver, lung, heart and spleen for the imprint technique. The samples were submitted to DNA extraction and later to PCR with 18S and 28S oligonucleotides. In blood smears and imprint it was possible to observe the presence of hemoparasites of the *Litomosoides* genus in four animals, three of the species *A. planirostris* and one of *A. lituratus*. The biological material submitted to PCR was used to carry out the sequencing and after the database search, BLAST. The result for use of the 18S oligonucleotide showed 93% identity to *Litomosoides sigmodontis*, (accession 156927), for 28S oligonucleotide the sequencing showed 82% identity to *Litomosoides hamletti voucher*, (accession 168509). With results obtained in the sequencing and the confrontation with the BLAST database it is concluded that the species of microfilaria found may be a new species, however to confirm this hypothesis it would be necessary to describe the adult forms of the parasite.

**KEYWORDS:** Parasitology, Chiroptera, *Litomosoides*.

## INTRODUÇÃO

A ordem Chiroptera compreende o segundo maior grupo de mamíferos do mundo, com cerca de 1.200 espécies já relatadas, ficando atrás somente da ordem Rodentia (UIEDA e BRED, 2016). Possuem ampla distribuição geográfica, encontrados em regiões tropicais e temperadas, porém com ressalva de algumas ilhas oceânicas isoladas e áreas polares (SIMMONS et al., 2005).

No Brasil, são encontradas nove famílias, 68 gêneros e 178 espécies (NOGUEIRA et al., 2014). Estes animais são de suma importância para a fauna e flora, desempenhando papel importante na disseminação de sementes de árvores frutíferas, controlando o número de insetos, e executando a polinização de variadas espécies de plantas (REIS et al., 2007).

Os hábitos alimentares dos morcegos são carnívoros, frutíferos, insetívoros,

hematófagos, polinívoros e nectarívoros (REIS et al., 2007), sendo que os animais insetívoros equivalem a 70% do total de espécies mundialmente distribuídas, devido à grande variedade de insetos (UIEDA e BRED, 2016).

Os morcegos podem se abrigar na natureza ou em grandes centros urbanos, sendo estes, cavernas, ocas de árvores, construções humanas, troncos, folhagens de árvores, entre outros. Estes locais fornecem local seguro para repouso, reprodução e contra as variações climáticas (UIEDA e BRED, 2016).

Os morcegos podem atuar como hospedeiros de vírus, bactérias, fungos, protozoários e helmintos e também podem atuar como vetores mecânicos de *Trypanosoma evansi* (parasito de mamíferos domésticos e silvestres) além de atuar como reservatório de algumas zoonoses, sendo a raiva e a histoplasmose as mais conhecidas (BARROS et al, 2008; SAVANI et al., 2008).

Dos helmintos parasitos de quirópteros a família Onchocercidae ((Nematoda: Filarioidea) compreende os nematóides de importância médica e veterinária e das 42 espécies de *Litomosoides* descritas em mamíferos 16 foram reportadas em morcegos. Diversos estudos revelaram a presença das microfilárias pertencente ao gênero *Litomosoides* em morcegos de espécies distintas e em várias regiões geográficas (tabela 1). O ciclo biológico desses parasitos é pouco conhecido, entretanto podendo ser heteróximo e a transmissão pode ocorrer através de ectoparasitos ((BAIN et al., 1989). As formas adultas são encontradas na cavidade abdominal e peritoneal e as fases larvais na circulação periférica).

A (tabela 1).

Espécie de morcego	Parasito	Cavidade parasitada	Região	Autor
Artibeus jamaicensis	<i>Litomosoides guiterasi</i>	Abdominal	Cuba	Vigueras, 1934
Anoura caudifer	<i>L. brasiliensis</i>	Abdominal	Rio de Janeiro - Brasil	Rêgo, 1961b
Glossophaga soricina	<i>L. brasiliensis</i>	Abdominal	Rio de Janeiro - Brasil	Rêgo, 1961b
Glossophaga soricina	<i>L. guiterasi</i>	Abdominal	São Paulo - Brasil	Rêgo, 1961b
Carollia perspicillata	<i>L. brasiliensis</i>	Abdominal	Botucatu - Brasil	Linnaeus, 1758
Anoura caudifer	<i>L. guiterasi</i>	Abdominal	Botucatu - Brasil	Geoffroy, 1818
Artibeus jamaicensis	<i>Litomosoides</i> sp.	Circulatório	Panamá	Cottontail et al., 2009
Myotis sp.	<i>L. brasiliensis</i>	Abdominal	Mato Grosso - Brasil	Almeida, 1936
Artibeus planirostris	<i>L. brasiliensis</i>	Abdominal	Pará - Brasil	Albuquerque, 2016
Carollia perspicillata	<i>L. brasiliensis</i>	Abdominal	Pará - Brasil	Albuquerque et al., 2015
Carollia perspicillata	<i>L. guiterasi</i>	Abdominal	Pará - Brasil	Albuquerque et al., 2016

TABELA 1: Principais espécies de *Litomosoides* descritas em morcegos:

Dessa forma o presente estudo tem como objetivo relatar a presença de microfilárias de *Litomosoides* sp. em morcegos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

As coletas foram realizadas no município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. Foram três áreas de coleta, sendo elas: Área 1, Instituto São Vicente; Área 2, Centro De Educação Ambiental Odilza Fernandes Bittar – CEA IMBIRUSSU; e a Área 3, Chácara Coqueiral. As espécies coletadas foram: *Artibeus lituratus*, *Artibeus planirostris*, *Carollia perspicillata* e *Glossophaga soricina*. Para a execução deste trabalho, foi obtida licença junto ao MMA (Ministério do Meio Ambiente), ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade), SISBIO (Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade) com Número: 48687-1 e CEUA/UCDB sob o protocolo nº (010/201548687-1). A captura dos morcegos ocorreu utilizando-se redes-de-neblina (“mist nets”), que foram distribuídas em diferentes pontos da área de estudo, como clareiras dentro da mata, trilhas e próximas de plantas frutíferas. As redes permaneceram abertas por um período de 6 horas, com vistorias em intervalos de 20 minutos. Os morcegos foram identificados a campo, com o auxílio da chave de identificação de Vizotto, Taddei (1973).

Posteriormente, utilizando-se os laboratórios da Universidade Católica Dom Bosco – UCDB, os animais foram anestesiados e eutanasiados, submetidos à pulsão cardíaca, retirada de órgãos como baço, fígado, e coração para a avaliação da carga parasitária, fazendo-se uso de técnicas de esfregaços sanguíneo e *imprint* dos órgãos. As lâminas foram analisadas por meio de microscopia óptica, em microscópio Nikon ECLIPSE E200, nas objetivas de imersão de 100x, fazendo-se varredura por toda a lâmina. O material biológico também foi utilizado para extração de DNA e para realização da técnica de reação em cadeia da Polimerase (PCR) utilizando-se os oligonucleotídeos ribossômicos eucarióticos 18S com sequência: 5´-CAC GTT ATC TAG AGG AAG GA-3´ e 5´-GCG ATA AGC GGC TGG ATT AG-3´, 28S com sequência 5´-GGC AGC ATT CTC AAG CTG C-3´ e 5´-CCA GTT ACG CTA TGG CAG AG-3´. Os produtos amplificados foram purificados e sequenciados.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os animais capturados pertenciam à família Phyllostomidae, sendo os animais das espécies *Artibeus lituratus*, *Artibeus planirostris*, *Carollia perspicillata*, *Glossophaga soricina* e algumas outras espécies, inclusive algumas não identificadas. Foram observadas as amostras de 36 morcegos, coletados na área 1 (Instituto São Vicente), área 2 (CEA Imbirussu) e área 3 (Chácara Coqueiral). Para cada morcego preparou-se uma lâmina de esfregaço sanguíneo, *imprint* de baço, pulmão, fígado e coração, totalizando cinco lâminas por animal, gerando 180 amostras. Na análise microscópica,

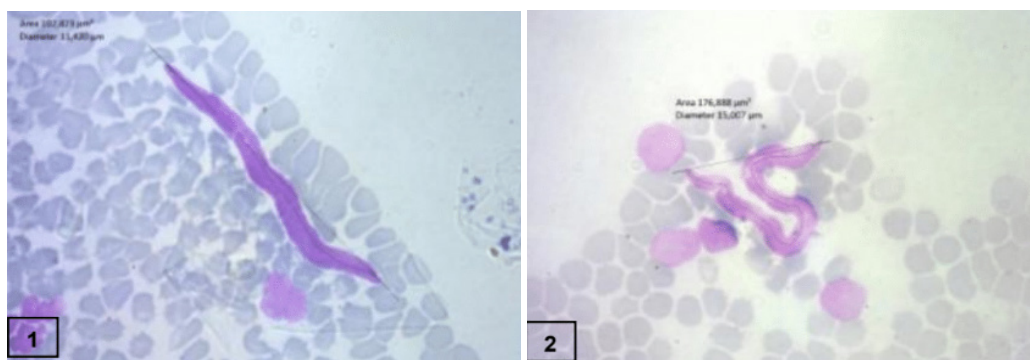
identificou-se microfilárias pertencentes ao gênero *Litomosoides* (tabela 2):

Espécie	Esfregaço sanguíneo	Imprint			
		Baço	Fígado	Pulmão	Coração
<i>Artibeus lituratus</i>	+	+	+	+	Ausente
<i>Artibeus planirostris</i>	+	Ausente	Ausente	Ausente	+
<i>Artibeus planirostris</i>	+	Ausente	Ausente	+	+
<i>Artibeus planirostris</i>	Ausente	Ausente	Ausente	+	Ausente
<i>Artibeus planirostris</i>	+	+		+	+
Não identificado	Ausente	Ausente	Ausente	+	Ausente

Tabela 2: Identificação de microfilárias circulantes em material biológico (esfregaço sanguíneo, imprint de baço, fígado, pulmão e coração):

Dos 36 animais analisados, 16,66% (6/36) apresentaram-se infectados naturalmente por microfilárias. Para espécie *A. planirostris*, verificou-se quatro animais encontrados naturalmente infectados, dos treze coletados, correspondendo a 30,77% (4/13). Já a espécie *A. lituratus*, coletou-se doze animais, e um foi encontrado naturalmente infectado, correspondendo a 8,33% (1/12). Os animais de espécies não identificadas, foram três coletados, sendo um encontrado naturalmente infectado, correspondendo a 33,33% (1/3), (tabela 2).

A morfometria foi realizada utilizando o programa *ZEN lite* para determinar as medidas, com auxílio do microscópio óptico com câmera acoplada ao computador, através de mensurações de diâmetro e área das microfilárias



**Figuras 1 e 2:** Microfilárias de *Litomosoides* sp. observadas em microscópio AxioScope A1 (Zeiss) e Nikon Eclipse E200 com óleo de imersão em objetivas de 100X.

Espécie do animal	Identificação	Material Biológico	Área	Diâmetro	Área de coleta do animal
<i>Artibeus lituratus</i>	1Al11	Imprint coração	176,888 µm <sup>2</sup>	15,007 µm	Instituto São Vicente
<i>Artibeus lituratus</i>	1Al11	Imprint fígado	140,433 µm <sup>2</sup>	13,372 µm	Instituto São Vicente
<i>Artibeus planirostris</i>	1Ap3	Imprint coração	76,074 µm <sup>2</sup>	9,842 µm	Instituto São Vicente

Artibeus planirostris	2Ap5	Imprint baço	155,936 $\mu\text{m}^2$	14,091 $\mu\text{m}$	CEA Imbirussu
Artibeus planirostris	1Ap3	Esfregaço sanguíneo	152,53 $\mu\text{m}^2$	13,936 $\mu\text{m}$	Instituto São Vicente
Artibeus planirostris	1Ap4	Imprint coração	147,85 $\mu\text{m}^2$	13,72 $\mu\text{m}$	Instituto São Vicente
Artibeus planirostris	1Ap4	Esfregaço sanguíneo	232,342 $\mu\text{m}^2$	17,2 $\mu\text{m}$	Instituto São Vicente
Artibeus planirostris	2Ap3	Imprint pulmão	163,425 $\mu\text{m}^2$	14,425 $\mu\text{m}$	CEA Imbirussu
Artibeus planirostris	2Ap5	Esfregaço sanguíneo	304,741 $\mu\text{m}^2$	19,698 $\mu\text{m}$	CEA Imbirussu
Não identificado	3NI2	Imprint pulmão	102,423 $\mu\text{m}^2$	11,42 $\mu\text{m}$	Chácara Coqueiral
Artibeus planirostris	3AP5	Esfregaço sanguíneo	181,537 $\mu\text{m}^2$	15,005 $\mu\text{m}$	Chácara Coqueiral
Artibeus planirostris	2AP1	Imprint coração	228,266 $\mu\text{m}^2$	16,749 $\mu\text{m}$	CEA Imbirussu
Artibeus planirostris	2AP8	Imprint coração	224,894 $\mu\text{m}^2$	16,922 $\mu\text{m}$	CEA Imbirussu
Artibeus planirostris	1AP3	Imprint coração	76,074 $\mu\text{m}^2$	9,842 $\mu\text{m}$	Instituto São Vicente
Artibeus planirostris	1AP4	Esfregaço sanguíneo	232,342 $\mu\text{m}^2$	17,200 $\mu\text{m}$	Instituto São Vicente
Artibeus planirostris	2AP5	Imprint baço	155,936 $\mu\text{m}^2$	14,091 $\mu\text{m}$	CEA Imbirussu
Artibeus lituratus	1AL11	Imprint fígado	140,433 $\mu\text{m}^2$	13,372 $\mu\text{m}$	Instituto São Vicente
Artibeus planirostris	91	Esfregaço sanguíneo	42,686 $\mu\text{m}^2$	7,380 $\mu\text{m}$	Lagoa da Cruz
Artibeus planirostris	115	Esfregaço sanguíneo	99,198 $\mu\text{m}^2$	11,232 $\mu\text{m}$	Lagoa da Cruz
Artibeus planirostris	151	Esfregaço sanguíneo	76,662 $\mu\text{m}^2$	9,875 $\mu\text{m}$	Lagoa da Cruz
Artibeus planirostris	179	Esfregaço sanguíneo	23,221 $\mu\text{m}^2$	5,400 $\mu\text{m}$	Lagoa da Cruz
Platyrrhinus lineatus	184	Esfregaço sanguíneo	74,268 $\mu\text{m}^2$	9,713 $\mu\text{m}$	Lagoa da Cruz
Artibeus planirostris	1AP8	Imprint coração	211,961 $\mu\text{m}^2$	16,428 $\mu\text{m}$	Instituto São Vicente
Artibeus planirostris	1AP8	Esfregaço sanguíneo	69,678 $\mu\text{m}^2$	9,419 $\mu\text{m}$	Instituto São Vicente
Artibeus planirostris	1AP10	Imprint pulmão	133,014 $\mu\text{m}^2$	16,051 $\mu\text{m}$	Instituto São Vicente
Artibeus planirostris	2AP1	Esfregaço sanguíneo	182,380 $\mu\text{m}^2$	27,231 $\mu\text{m}$	CEA Imbirussu
Platyrrhinus lineatus	184	Esfregaço sanguíneo	203,002 $\mu\text{m}^2$	14,889 $\mu\text{m}$	Lagoa da Cruz
Artibeus planirostris	115	Esfregaço sanguíneo	81,941 $\mu\text{m}^2$	9,619 $\mu\text{m}$	Lagoa da Cruz
Artibeus planirostris	87	Esfregaço sanguíneo	124,218 $\mu\text{m}^2$	12,576 $\mu\text{m}$	Lagoa da Cruz

**Tabela 3.** Distribuição das amostras e morfometria das microfílaras encontradas nas espécies: *A. planirostris*; *A. lituratus* e *P. lineatus*.

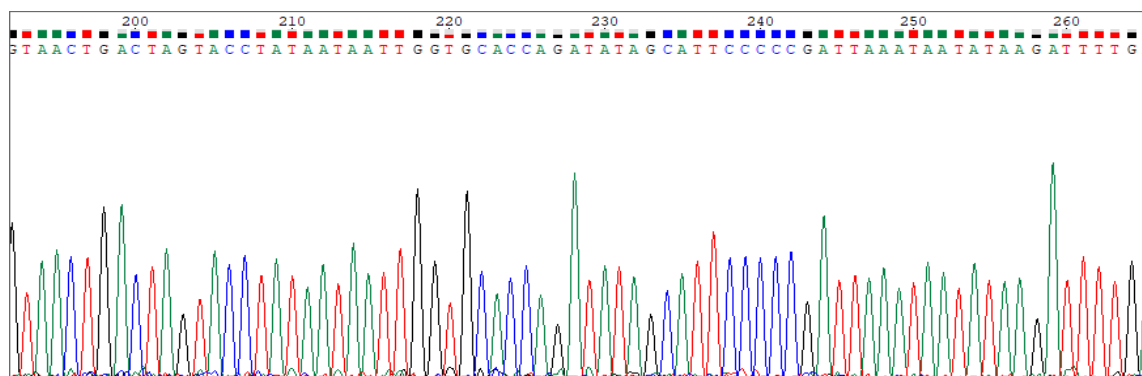


As reações em cadeia da Polimerase (PCR's) foram realizadas utilizando-se os oligonucleotídeos ribossômicos eucarióticos 18S e 28 S', os quais amplificaram de acordo com o esperado. (Tabela 4).

PRIMER	PONTUAÇÃO MÁXIMA	PONTUAÇÃO TOTAL	COBERTURA	VALOR E	IDENTIDADE	BITS
28S	429	429	63%	7e - 116	445/541 - 82%	429
18S	1352	1352	93%	0	863/926 - 93%	1352

**Tabela 4:** Resultados obtidos com o GenBank do material biológico submetido ao sequenciamento:

O sequenciamento realizado com o produto amplificado com o oligonucleotídeos da região rDNA 18S apresentou resultados e correlação com dados já depositados no banco de dados GenBank para *Litomosoides sigmodontis*, acesso 156927 com identidade de 93%, já com utilização do oligonucleotídeo região rDNA28S o sequenciamento apresentou 82% de identidade *Litomosoides hamletti voucher*, acesso 168509 com as informações associadas e a qualidade do sequenciamento produzido pelo Chromas (Figura 3), pode-se concluir que uma boa qualidade do sequenciamento.



**Figura 3:** Eletroesferograma do produto de PCR sequenciado, indicando boa qualidade do sequenciamento.

Segundo Gazarine et al., (2012) as microfilárias do gênero *Litomosoides* são hematófagas, e são encontradas unicamente em regiões geográficas neárticas e neotropicais. Parasitam a cavidade abdominal e pulmonar dos morcegos, porém pode ocorrer uma migração errática e as larvas emigrarem para os tecidos. A transmissão destas microfilárias ocorre através de ectoparasitos (vetores), e também por via transplacentária (GAZARINE et al. 2012; WILIAMS 1948). Em estudo realizado por Reeves et al., (2016) demonstraram grande quantidade de vetores em abrigos de morcegos, os quais provavelmente estavam transmitindo as microfilárias e compartilhar os hospedeiros. A fim de esclarecer a importância do compartilhamento de nicho entre espécies de *Litomosoides*, são necessários estudos adicionais pode parasitar

cavidades pleurais e / ou abdominais (Muniz-Pereira, et al. 2016). Assim, o presente estudo levou à adição de novos dados ao estudo sobre *Litomosoides* sp. e novo registro de hospedeiro vertebrado no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil.

## REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, A. C. A. **ESTUDOS HELMINTOLÓGICOS EM QUIRÓPTEROS NO BIOMA AMAZÔNIA**. Dissertação de mestrado pela Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Campus de Jaboticabal. 2016.
- ALMEIDA, J.L. **SOBRE UM PARASITO DE CHIROPTERA: *Litomosoides brasiliensis***. REVISTA DO DEPARTAMENTO NACIONAL DA PRODUÇÃO ANIMAL, RIO DE JANEIRO, V.3, P.133-139, 1936.
- BAIN O, PETIT G, DIAGNE M. ÉTUDE DE QUELQUES LITOMOSOIDES PARASITES DE RONGEURS; CONSÉQUENCES TAXONOMIQUES. Ann Parasitol Hum Comp 1989; 64(4): 268-289. PMID:2817694. <http://dx.doi.org/10.1051/parasite/1989644268>.
- BARROS, J. H. S. et al. **RELATO DE INFECÇÃO NATURAL DE MORCEGOS POR FLAGELADOS TRIPANOSOMATÍDEOS EM DIFERENTES MUNICÍPIOS DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**. REVISTA DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, V. 41 N.6. NOV/DEZ. P.683-685. 2008.
- CARDIA D. F. F. **HELMINTOS DE QUIRÓPTEROS DA REGIÃO CENTRO-OESTE DO ESTADO DE SÃO PAULO**.
- CUNHA R. M.; CARNEIRO A. J. B.; GONÇALVES R. S.; BECERRA D. R. D.; STÖCKER A.; BARROUIN-MELO S. M.; FRANKE C. R. **ENVOLVIMENTO DO DESMODUS ROTUNDUS NO CICLO EPIDEMIOLÓGICO DAS LEISHMANIOSES NA BAHIA, BRASIL**. 2014
- FILHO D.A., WANKE B., CAVALCANTI S.A.M., MARTINS S.M.L., DEUS B.C.A 2009: **HISTOPLASMOSE NO NORDESTE DO BRASIL**. RELATO DE TRÊS CASOS.114p
- GAZARINI J., PESENT L., TAKEMOTO R.M. **PRIMEIRA EVIDÊNCIA DE TRANSMISSÃO TRANSPLACENTÁRIA DE NEMATODA (*Litomosoides* sp.) NA ORDEM CHIROPTERA (Microchiroptera: Phyllostomidae)**. 2012
- HOUERAUF A, VOLKMANN L, NISSEN-PAEHLE K, SCHMETZ C, AUTENRIETH I, BUTTNER D W. **TARGETING WOLBACHIA ENDOBACTERIA IN *Litomosoides sigmodontis*: COMPARISON OF TETRACYCLINES WITH CHLORAMPHENICOL, MACROLIDES AND CIPROFLOXACIN**. 2000
- JACKSON, W.F; OTTO, G.F. **DETECTION AND DIFFERENTIATION OF MICROFILARIAE**. IN: PROCEEDINGS OF THE HEARTWORM SYMPOSIUM '74. (1974, AUBUM). PROCEEDINGS... AUBUM, 1975. 161 P. P. 21-22.
- MOURÃO, E. D.; AVILLA, L. S.; LENT, H. **REDESCRIÇÃO DE LITOMOSOIDES BRASILIENSIS ALMEIDA, 1936 (NEMATODA: FILARIIDAE) PARASITO DE *Anoura caudifera* (CHIROPTERA: PHYLLOSTOMIDAE)**. MEM. INST. OSWALDO CRUZ, RIO DE JANEIRO. V. 97. N. 4. P. 495-499. 2002.
- NEVES M. F., BIGNARD J. M. P., SANTANA, T. M., MONTEIRO, M. E. Z. & BOTTARI, F. **DOENÇA DE CHAGAS EM CÃES**. REVISTA CIENTÍFICA ELETRÔNICA DE MEDICINA VETERINÁRIA, 6, 1115. 2011
- NOGUEIRA MR, IP de LIMA, R MORATELLI, VC TAVARES, R GREGORIN, AL PERACCHI. 2014. **CHECKLIST OF BRAZILIAN BATS, WITH COMMENTS ON ORIGINAL RECORDS**. Check List

NOTARNICO J., DIGIANI M.C., LOP EZ P.M. 2010: **REDESCRIPTIONS OF THE NEMATODES *Litomosoides patersoni***.

REEVES W. K, BECK J., ORLOVA M. V., DALY J. L., PIPPIN K., REVAN F AND LOFTIS A. D.: **ECOLOGY OF BATS, THEIR ECTOPARASITES, AND ASSOCIATED PATHOGENS ON SAINT KITTS ISLAND**. JOURNAL OF MEDICAL ENTOMOLOGY ADVANCE ACCESS PUBLISHED JUNE 9, 2016.

REGO, A. A. **SOBRE ALGUMAS ESPÉCIES DO GÊNERO *Litomosoides chandler*, 1931 (NEMATODA, FILAROIDEA)**. INSTITUTO OSWALDO CRUZ. RIO DE JANEIRO, GUANABARA. TOMO 59, FASCÍCULO 1. P. 1-9. 1961.

REIS, N.R., PERACCHI, A.L., PEDRO, W.A. & LIMA, I.P. **MORCEGOS DO BRASIL**. Londrina, 253p. 2007

SANDGROUND, J.H. **DESCRIPTION OF A SPECIES OF THE FILARID GENUS *Litomosoides* FROM *Glossophaga soricina* (CHIROPTERA)**. ANNALS AND MAGAZINE OF NATURAL HISTORY, LONDRES, P.595-599. 1934.

SAVANI, E.S.M.M.; PINTO, P.L.S.; ALMEIDA, M.F.; D'AURIA, S.R.N; CAMARGO, M.C.G.O; ROSA, A.R.; MELO, L.C.V.; YAI, L.E.O.; MAEDA, M.M.; SACRAMENTO, D.R.V. **PREVALÊNCIA DE ZOONOSES PARASITÁRIAS EM MORCEGOS DO MUNICÍPIO DE SÃO PAULO, BRASIL**. Instituto Adolfo Lutz. São Paulo, SP, Brasil. Mestrado – Área de Concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública – Programa de Pós-graduação em Ciências. 2008.

SILVA M M S, HARMANI N M S, GONÇALVES E F B. **BATS FROM THE METROPOLITAN REGION OF SÃO PAULO, SOUTHEASTERN, BRAZIL**. Chiropt Neotrop. 1996.

SIMMONS NB., WILSON DE, REEDER DM. **MAMMAL SPECIES OF THE WORLD: A TAXONOMIC AND GEOGRAPHIC REFERENCE**. Baltimore: Johns Hopkins University Press; 2005. P 312-529.

UIEDA W. e BRED A. **MORCEGOS: AGENTES NEGLIGENCIADOS DA SUSTENTABILIDADE**. 2016

VIGUERAS, I.P., **NOTAS SOBRE LAS ESPÉCIES DE FILAROIDEA (Nematoda), ENCONTRADAS EM CUBA**. Memorias de la Sociedad Cubana de História Natural “Felipe Poey”, Havana, v.8, p.55-60, 1934.

WILIAMS, R. W. 1948. **STUDIES ON THE LIFE CYCLE OF *Litomosoides carinii*, FILARIID PARASITE OF THE COTTON RAT, *Sigmodon hispidus litoralis***. J. Parasitol.

## A CONTRIBUIÇÃO DA EDUCAÇÃO AMBIENTAL NA AGRICULTURA URBANA E PERIURBANA NO BRASIL

### **Ernane Raimundo Maurity**

Técnico em Segurança do Trabalho, Gestor Ambiental e Especialista em Educação Ambiental.  
ernanemaurity@outlook.com

Agricultura Urbana; Interdisciplinaridade: Alimentos Orgânicos.

**RESUMO:** A sociedade urbana é globalizada e insustentável, diz a Organização das Nações Unidas (ONU), chegamos à marca de 70% da população mundial vivendo em centros urbanos, essa concentração gera diversos fatores e problemas socioambientais, um deles deve ser tratado aqui e sua proposição como um ataque a esse modelo feroz de urbanização. As contribuições da Educação Ambiental (EA) a Agricultura Urbana (AU) é uma sinalização de que algo pode ser feito. Lembrando que a (AU) se mantém em outros países com a participação de todos, suprimindo a necessidade de muitos habitantes urbanos. A análise desse tema procura elucidar que o papel da Educação Ambiental é encontrar soluções e inovações com outras disciplinas e diversos profissionais. A (AU) pode ser um plano de saída, visto que, o agronegócio é facilitado e inconsequente, o solo não é o mesmo do ano de 1500, precisamos de alimentos com qualidade, adoecer é um desastre invisível. O debate é transversal, cabe à reflexão sobre as responsabilidades público-privada.

**PALAVRA-CHAVE:** Educação Ambiental;

### 1 | INTRODUÇÃO

Ressalta-se que a Agricultura Urbana (AU) trará uma diversidade de estudos, além das práticas sobre os aspectos do desenvolvimento sustentável, dentro desse conjunto apresenta-se a Educação Ambiental (EA), que sem dúvida alguma é um dos expoentes na concretização de conhecimentos para contribuir com a (AU), lembrando que não se pode negligenciar as experiências e sabedorias populares.

Centenas de artigos começam com essas informações, talvez pela importância no contexto: Em 1999 a FAO - ONU (Instituição da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação), elaborou um documento (relatório) chamado “A (AU) e Peri-Urbana” com o objetivo de conhecer os problemas e a necessidade da (AU). Com esse objetivo criou-se iniciativa mundial sobre a (AU) onde participaram os organismos internacionais, destaque para o PNUD (Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento), o CIID (Centro Internacional de Investigação para o Desenvolvimento), o Banco Mundial e outros organismos como a AGUILA, construiu-se

através de 16 países latino-americanos que trocaram informações sobre a agricultura urbana e periurbana. Somente a partir de 1999 foi dado um grande passo para a elaboração de metodologias, através deste relatório citado destaca-se as 10 cidades líderes em (AU) na América Latina. Dentre elas está Belo Horizonte-MG.

A abrangência deste trabalho se dá com melhoria de vida da sociedade que está as margens das periferias dos centros urbanos, em cidades pequenas fora da área metropolitana, em ilhas com acessos aos centros, destacando a figura do ribeirinho e porque não incluir o morador de rua! Cabe pesquisar sobre as ruralidades e seus conceitos e quem sabe encontrar novas afirmações sobre o que é rural e urbano. Obstantemente, existe um fato negativo: Cada vez mais aumenta o deslocamento de pessoas de cidades ditas rurais para os centros urbanos, essa frequência está um caos, estourando todos as demandas de saneamento básico. Algo deve ser feito para conter essas pessoas em seus meios de origem, os centros urbanos não comportam esse aglomerado.

AU tem essa viabilidade de transformar essa sociedade primeiramente pela fome, que é uma das metas de sustentabilidade do planeta, segundo a ONU. Grupos com fome, são envergonhados, não possuem autoestima, doentes e marginalizados, enfrentam o mundo com a violência.

Rever a diminuição desse impacto pode ser através da AU. Que não está resumida apenas o cultivo de hortaliças, envolve a criação de pequenos animais, a piscicultura, ovos de codornas, frutas, leguminosas, plantas medicinais e ornamentais, compostagem e outros produtos.

Vale lembrar que a territorialidade urbana (espaços públicos), podem ser aproveitados para o cultivo, como Praças, Repartições, Escolas, além de terrenos ociosos e baldios. A ocupação desses espaços se faz necessários por dois motivos: Primeiro, pelo equilíbrio biológico do local e a manutenção da biodiversidade. Segundo: fortalecimento do meio social.

Inegavelmente a EA possui instrumentos que possam transversalizar com outras disciplinas ex.: Geografia, Ciências Agrárias, Sociologia e outras. Observando dentro da temática inclusão, necessita-se qualificar pessoas, educar, treinar, criar melhores expectativas, para que elas possam se alimentar melhor, elevar os aspectos culturais, minimizar doenças, aumentar a renda, promover o desenvolvimento sustentável.

## **2 | A PROBLEMÁTICA DA AGRICULTURA URBANA**

A (AU) está submissa aos cuidados de pragas e doenças, contaminação do solo e dos alimentos. Igualmente, a preocupação com o uso da água e a qualidade da mesma, exposição aos riscos de acidentes e doenças ocupacionais.

Na criação da (AU) em uma determinada área, existem pontos problemáticos, mesmo produzida com adubo orgânico (equilíbrio ecológico) todos os riscos devem

ser bem planejados e discutidos com a comunidade que vai concretizar o projeto:

- Verificação in loco, algumas áreas urbanas apresentam características impróprias e que muitas vezes é melhor não fazer nada naquele local, ou dar outra destinação. A AU, mesmo sendo bem cuidada pode provocar a contaminação de lagos, assim como nas áreas de encostas que podem acarretar uma erosão.
- Atividade da AU próxima das residências, pode trazer risco de inalação de odores, principalmente na decomposição de material orgânico, assim como atração de bichos de todas as espécies como os roedores.
- Uso de água não tratada sem uma verificação, à mesma poderá conduzir a contaminação para os alimentos, como diversos protozoários, helmintos e viroses intestinais. A água deverá ser analisada em laboratórios.
- O material retirado do solo pode sofrer contaminação com metais pesados, como o cádmio e chumbo, assim como o solo contaminado com resíduos industriais ou eletroeletrônico. Ao final, esse material será um vetor para as hortaliças, principalmente na alface.
- Os problemas existem em grandes expressões, e mesmo aqueles que surgem no dia a dia, deverão ser tratados e seguidos através de um manual de prevenção, diminuindo a margem de erro, todas as regras de processos se compõe, através de muita informação, capacitação e monitoramento das ações.

### 3 | BENEFÍCIOS DA AGRICULTURA URBANA

Os benefícios da (AU), estão ligados a todos os itens que regem a sustentabilidade, Econômico, Social e Ambiental.:

- Disponibilidade de Alimentos - No que se refere à produção, comercialização e distribuição de alimentos, as pessoas de baixa renda terão acesso a alimentos naturais (orgânico) numa demanda maior do que elas vivem atualmente.
- A qualidade dos alimentos - Depende da qualidade da água utilizada na produção.
- Os produtos orgânicos tem uma grande penetração no mercado.
- O aumento da absorção de águas pluviais, o aumento da biodiversidade nos espaços urbanos, limpeza de quintais e de terrenos baldios, melhoramento na convivência e cooperação entre vizinhos, valorização da cultura local.
- Comercialização da produção excedente, o que melhora a renda da comunidade local, fortalecendo as cooperativas e associações.
- Mitigação da pobreza, valorização da educação e da diminuição da marginalidade, incluindo os moradores de ruas como atores nesse processo.

## 4 | COMPOSTAGEM, O INÍCIO DE TUDO

Compostagem é a elaboração para se produzir adubo, existem de diversas técnicas e formas, aqui trataremos de um produto natural que chamamos de orgânico, dispensa produtos químicos. E de onde possam vir os componentes para a sua elaboração? Do desperdício de nossa pia que vai para o ralo ou para o cesto de lixo: Cascas de frutas, legumes, hortaliças, borras de café, exceto os alimentos cozidos e cítricos. Nessa “separação seletiva” gera-se o material para se compostar, lembrando que aqui está sendo tratada uma das ações de sensibilização da EA no ato de reciclagem. No processo de compostagem está evidente a Reutilização e de que forma isso se dá: 1) Utilização de recipientes que serão usados no processo de compostagem como baldes, bacias plásticas, panelas usadas, toneis, camburões, esses objetos são jogados nas ruas, ou seja, colocar em prática a reutilização. 2) O arenoso, areia ou solo, também faz parte dessa composição, esse material pode vir através da varrição de calçadas, coletas das folhas das árvores, capina de quintais, praças, logradouros, desentupimento de bueiros, canais, também é farto e a disposição de todos. 3) Grande fonte de resíduos orgânicos podem estar nos camburões de restaurantes e cozinhas industriais, o cuidado dessa coleta está na contaminação dos alimentos, sugere-se fazer uma separação antecipada ao cozimento.

O Brasil é um país onde o volume de resíduo sólido é grande e a reciclagem é muito pequena. As ações de redução, reciclagem, reutilização e tratamento dos resíduos e disposição final dos resíduos fazem parte da ordem de prioridade da Política Nacional de Resíduos Sólidos (PNRS), lei no. 12.305/1999.

## 5 | O BIO-FERTILIZANTE, PRODUTO LUCRATIVO

Observa-se que na compostagem orgânica origina outro produto que é o chorume, é um líquido da decomposição natural (orgânica), esse material é muito utilizado por pessoas que possuem hortas caseiras, ou seja, nele está o enriquecimento nutricional das plantas e hortaliças, além do controle de pragas e doenças. A comprovação no uso de fertilizantes químicos é amplamente dito que é maléfico a saúde humana, pois, além de reincidente ao descontrole ambiental, é um agressivo ecológico, com isso abriu-se espaço para os fertilizantes de origem natural. A rentabilidade desse produto se dá através de uma pequena escala de produção o que tornou raro e conseqüentemente caro. É relevante demonstrar que essa produção deva melhorar e ampliar a renda daqueles que fazem a (AU).

## 6 | EXPERIÊNCIA MUNDIAL

Relata-se que a AU percorre o mundo inteiro, principalmente nos países onde

o clima e o espaço urbano favorecem a prática ecológica, como Portugal, Cuba, Argentina e outros, onde essas experiências se concretizaram com a participação de políticas públicas, considerando o fato de todas as esferas.

*Desde 1988, o CEPAR atua nos bairros carentes da cidade de Rosário, implementando projetos de agricultura urbana vinculados à segurança alimentar. O trabalho iniciou-se de modo pontual, envolvendo algumas organizações comunitárias locais, mas logo pôde ampliar sua abrangência ao se vincular a agências do governo municipal de Rosário. Entre 1991 e 1997, o sócio municipal foi o Departamento de Hortas, ligado à Secretaria de Promoção Social e, mais recentemente, a partir de 2002, o projeto ficou sob a responsabilidade do Programa Municipal de Agricultura Urbana, em cuja implementação o CEPAR (Centro de Estudos em Produção Agroecológica de Rosário) desempenha papel ativo.*

Fonte: <http://www.agriculturaurbana.org.br/RAU/AU06estrategia.html>.

*Cuba é o país que mais eficientemente tem aplicado e desenvolvido os princípios da Agricultura Urbana. Nesse sentido o documento 160/2002 faz parte do esforço de apresentar e discutir essa experiência, visando à difusão dessa tecnologia,*

*10 kg.m<sup>-2</sup> de matéria orgânica em organopônicos e hortas intensivas, e no mínimo 20 t.ha<sup>-1</sup> em parcelas e pátios; manter atualizado o inventário das fontes de matéria orgânica existentes no município e em nível de conselho popular; criar ótimas condições para a reprodução das matrizes de minhocas, popularizar e implementar a minhocultura em nível de unidades de produção, determinar as necessidades reais de matéria orgânica de cada território, zelar para que o substrato tenha a qualidade requerida; e otimizar a utilização do lixo urbano, capacitar os produtores e divulgar a atividade em nível de conselho popular.*

*A minhocultura é muito desenvolvida e muito disseminada em Cuba. Em 2001 foram produzidos 145 milhões de toneladas de húmus de minhocas em todo o país. Existem vários Centros de Produção de Húmus de Minhocas. Em Pinar Del Río está localizado o maior deles com produção de 100 mil t de húmus de minhocas por ano, que são comercializados para a produção de tabaco para exportação e para organopônicos e hortas intensivas. Em geral, a minhocultura cubana é feita entre bananeiras, prestando-se assim a dois propósitos: produção de frutos e sombra para as minhocas, já as matrizes de minhocas são mantidas em canteiros e protegidas de intempéries. 1 t de húmus de minhocas é equivalente a 10 t de esterco, provavelmente porque a tecnologia usada em Cuba seja mais eficiente que a utilizada no Brasil. Em Cuba são realizadas camadas de 10 cm, renovadas semanalmente com outras camadas de 10 cm até atingir 60 cm de altura, o que leva 3 meses. Esse processo gera um produto aparentemente de melhor qualidade, possibilita a reciclagem de resíduos que não é possível com a tecnologia brasileira e propicia que o ciclo das minhocas se complete durante o processo. O aproveitamento de resíduos deve ser o mais eficiente possível.*

Fonte: <http://www.minag.gob.cu/search/node/agricultura%20urbana>. 5



*Com a crise ocorrida no início deste século, a agricultura urbana mudou. Milhares de pessoas perderam seus empregos e ficaram sem meios para sustentar suas famílias. Embora o impacto tenha alcançado todos os níveis sociais, foi mais forte nos setores populares e na classe média. Por exemplo, em 2001, 61% da população de Rosário encontrava-se em situação de pobreza, e mais de 30% na indigência.*

Fonte: [http://www.agriculturaurbana.org.br/RAU/AU22/rau22\\_a\\_montevidou\\_rosario.pdf](http://www.agriculturaurbana.org.br/RAU/AU22/rau22_a_montevidou_rosario.pdf).

Na questão do desemprego na cidade de Rosário foi à ponta da lança para crescer o movimento em torno da AU, e por aqui temos altos índices de desemprego, fome, moradores de ruas e porque esse movimento não cresce? Essa reflexão é pertinente com relação aos problemas sociais no Brasil.

## **7 | A REALIDADE DA AGRICULTURA URBANA E PERIURBANA NO BRASIL**

O Brasil não vê o crescimento da AU com os olhos voltados para o futuro, nosso país anda na contramão desse projeto, que é simples e com amplas possibilidades de diminuir o êxodo rural. Se as prefeituras promovessem o estímulo para a (AU), realizando dentro de quintais, terrenos ociosos e escolas, a base alimentar dessas pessoas e os remédios para curar pequenas doenças estaria assegurada. “O deputado federal Padre João do Partido dos Trabalhadores de Minas Gerais criou um Projeto de Lei de no. 906 de 2015 tramitando na comissão de justiça da câmara que estabelece três pontos para o fortalecimento a agricultura urbana. Primeiro: O governo federal apoia os municípios com definição de áreas em condições para a realização da agricultura urbana e comunitária e/ou individual. Segundo: viabilizar a aquisição dos produtos da AU para os programas governamentais Ex. Programa de Aquisição de Alimentos PAA e o Programa Nacional de Alimentação Escolar (PNAE) e por terceiro uma definição das linhas de crédito para a AU em sua totalidade, produção e comercialização”

*Segundo a Deputada Luizianne Lins (PT-CE), o desenvolvimento da agricultura no meio urbano, tende a ultrapassar as fronteiras tradicionais da economia, meio ambiente, urbanismo e cultura. A parlamentar defendeu a aprovação da proposta. “A agricultura urbana tornou-se um dos vetores para repensar as próprias cidades como sistemas de ecologia urbana resilientes às mudanças climáticas, econômicas e sociais num contexto de urbanização globalizada”.*

Fonte: <http://www2.camara.leg.br/camارانoticias/noticias/>

Hoje é muito questionável entre o que é produção rural e o que é produção urbana, os conceitos territoriais e as novas ruralidades nos remetem a uma reflexão ou um debate sobre essas afirmações: cidades versus interior, o que se percebe é que os gestores e as instituições financeiras, deveriam acabar com esse posicionamento, toda produção agrícola afinal se concretiza com produtos da subsistência humana. O maior indicador dessa afirmação seria o interesse na produção, disposição técnica e

viabilidade local. A economia de fato solidária alçaria com a circulação de dinheiro, o Financiamento e os Créditos da Agricultura familiar entram na causa como fomentador e mantenedor do projeto da AU. Atualmente as linhas de crédito para a AU ofertada por fundos de empréstimos para pequenos e micro empreendedores, é burocrática e não dá oportunidade para quem precisa desenvolver a AU. Outro fato é que os juros são altos e um plano de carência desajustado, isso faz com que o devedor não tenha chance de pagar as parcelas do Banco, conseqüentemente afirma-se que é uma parte da sociedade que não faz parte da economia. Diante disso cabe refletir: Como produzir? O sucesso do projeto vem de investimentos públicos. Será que esse projeto de AU contribui na organização social desses grupos de periferias? Justifica-se o fato pela falta de ações e empreendimento de políticas públicas.

As experiências mundiais afirmam que a organização social acontece com mais frequência em países com gestão voltada para o futuro, da igualdade, da dimensão mais justa, o maior exemplo desta afirmação é Cuba, onde a agricultura é desenvolvida para todos em diversos espaços, não há desperdício de áreas, tudo se planta, independentemente de ser rural. Um país sem fome, baixo índice de analfabetismo e alto de saúde, No final do ano passado, Havana tinha 97 hortas urbanas que ocupavam 39.500 hectares, isto é, a metade de sua superfície. Além disso, se estima que existam 89 mil pátios e 5.100 terrenos (com menos de 800 m<sup>2</sup>) dedicados ao consumo doméstico aos quais estão relacionados 90 mil habitantes. Esses fatos se refletem em números surpreendentes: em 2013, 58 mil toneladas de produtos foram comercializadas, das quais 6.770 foram entregues em colégios, hospitais e outros serviços. Fonte: <https://www.archdaily.com.br/br/623385/as-10-cidades-latino-americanas-lideres-em-agricultura-urbana-segundo-a-fao>.

O Brasil territorialmente avantajado não consegue nem ventilar essas propostas de AU, sabemos que o solo brasileiro está repleto de grandes projetos do agronegócio, com uma nova linguagem de “O AGRO É POP, O AGRO É TEC, O AGRO É TUDO”. Até quando esse solo irá permanecer em condições para o plantio? Esse modelo de agricultura tradicional é um grande exponencial para a degradação ambiental (solo, água e ar), além de causar doenças dos trabalhadores locais, atinge as comunidades no entorno dessas plantações, (contaminação por agrotóxico) comprometem o futuro do homem do campo.

## **8 | ESTUDO DE CASO NO PARÁ - QUINTAL PRODUTIVO (QP)**

Foi criado pelo engenheiro agrônomo Jairo Fernandes Eiras, funcionário da Emater-Pará, com a soma de suas experiências pelo campo, desenvolveu a técnica agroecológica com a questão social. O QP faz parte do Programa Estadual de Auto Abastecimento, dentro dele existe as seguintes metas: Ação Capacitação, Produção e multiplicação de sementes e mudas. Correção do solo (uso de calcário), aplicação

de adubação orgânica, mecanização e modernização da agricultura. E a utilização de máquinas de escala industrial ou artesanal desenvolvida no campo.

## 9 | OBJETIVOS DO QUINTAL PRODUTIVO. (QP)

As condições que o autor encontrou na viabilidade do seu projeto: Abastecimento com produtos locais, o alimento mais próximo de quem produz, Melhoria da renda familiar, Melhoria no Meio Ambiente (solo, água e ar), Segurança alimentar e Melhoria na Economia Municipal, essa melhoria está relacionada a investimento de prefeituras nos projetos de (AU).

## 10 | DIMENSIONAMENTO DOS QUINTAIS/ESPÉCIES

- Podem ser de 10x10 metros até 100x100 metros.
- Aves 1 unidade por m<sup>2</sup>.
- Abelhas Meliponas 05 caixas por quintal
- 4- Camarões 25 unidades por m<sup>3</sup> de tanque considerando o tanque de 5x5x1,2 metros.

## 11 | DIVERSIFICAÇÃO DE PRODUTOS

1- Florestais Medicinais, Frutíferas de ciclo curto, Florestais Madeira, Frutíferas de ciclo médio, Florestais Frutos, Frutíferas de ciclo longo, Industriais, Paisagísticas, Aves caseiras, Olerícolas, Oleaginosas, Recicladoras Arbóreas, Melíferas, Alimentares Tubérculos, Alimentares Grãos, Olerícolas Folhosas, Peixes e camarões e Produção de Adubo. Tudo isso é possível dentro de pequenas áreas, onde o autor desenvolveu técnicas da engenharia agrônômica para a obtenção desses resultados.

O projeto possui viveiros de mudas em vários municípios do Pará entre eles: Bragança, Peixe-Boi, Bonito, Tracuateua e Capanema esses viveiros já estão produzindo e ao final do ano produzirá em torno de 480 mil mudas de diversas espécies, o autor também desenvolveu o projeto viveiro para diminuir os custos do pequeno produtor e aumentar a renda com as mudas excedentes, esse projeto está intrinsecamente atrelado ao QP, são utilizados nos viveiros produtos alternativos da própria natureza como utilização de pet (reciclagem) tudo com o intuito de baratear a produção das mudas. Outros viveiros estão em fase de instalação como é o caso de Santarém-Novo, Santa Luzia do Pará, Quatipuru, Augusto Correa com um total aproximado de 190 mil mudas, que somado ao produtivo ficará próximo de 700 mil mudas, essa previsão é de duas (02) produções de mudas/ano por viveiro.

Em sua cartilha publicada pela Emater-Pa, Eiras diz: *O desejo e a necessidade dos agricultores de construir uma vida digna no campo passam por um modelo de produção que seja sustentável ecológica, social e economicamente, ou seja, em pequenas áreas tem-se a integração e a inter-relação de diversas culturas e animais, utilizando os princípios agroecológicos, diante disso enumera os seguintes benefícios do projeto:*

- Promoção e valorização dos quintais como espaços de interação das famílias, produção e geração de renda distribuída no ano todo;
- Produção de alimentos em variedade, qualidade e quantidade para suprir parte das necessidades das famílias;
- Utilização das plantas medicinais como forma de diminuir os gastos com medicamentos;
- Melhoria do meio Ambiente e externo das residências;
- Contribuir para fixação das famílias na propriedade;
- Geração de produtos excedentes para a comercialização;

## **12 I EDUCAÇÃO AMBIENTAL COMO AGENTE TRANSFORMADOR**

Sem sofisma a (EA) é uma disciplina interdisciplinar para a transformação da consciência ambiental, pois trabalha o conceito de meio ambiente, de sustentabilidade e de diversidade biológica e cultural além de mostrar a forma de conhecer e compreender de modo integrado o ambiente natural e social e suas inter-relações.

A Lei 9795/1999 que dispõe sobre a educação ambiental e institui a Política Nacional de Educação Ambiental menciona: Art. 1º Entendem-se por educação ambiental os processos por meio dos quais o indivíduo e a coletividade constroem valores sociais, conhecimentos, habilidades, atitudes e competências voltadas para a conservação do meio ambiente, bem de uso comum do povo, essencial à sadia qualidade de vida e sua sustentabilidade. Art. 2º A educação ambiental é um componente essencial e permanente da educação nacional, devendo estar presente, de forma articulada, em todos os níveis e modalidades do processo educativo, em caráter formal e não-formal.

A contribuição da (EA) voltada para as comunidades se concretiza na elaboração de oficinas, Works shops: reciclagem, coleta seletiva, reutilização de vários materiais, cursos de práticas agroecológicas, estimular às crianças e jovens a plantarem legumes, verduras e frutas seja nos quintais de suas casas ou em suas escolas, possibilitar conhecimentos da criação de pequenos animais, trabalhar esses conhecimentos através de outras disciplinas como: Matemática, Biologia, Geografia e outras, tudo isso de tal maneira que sejam estimulados a produzir alimentos e outros produtos com qualidade nutricional. 8

## 13 I CONSIDERAÇÕES FINAIS

Existe um vasto campo de ações dentro da pesquisa referindo-se a AU. Um dos fatores a serem observados no debate é relacionado com o deslocamento frequente de pessoas para os centros urbanos. Segundo Brown L, *Em 1900, cerca de 150 milhões de pessoas moravam em cidades. Em 2000, eram 2,8 bilhões, um aumento de 19 vezes. Desde 2008, mais da metade da população da Terra vive em cidades – os humanos se tornam, pela primeira vez, uma “espécie urbana”*. Em 2050 a população mundial entrará na casa dos nove bilhões de habitantes, esses dados negativos é um dos maiores impactos sociais que é a fome. Importante trazer à tona a sociedade de consumo, que está cada vez maior e consumindo o que não precisam, esses consumistas acham que as cidades são construídas somente para veículos e objetos, ao invés de refletirem que as cidades devem ser feitas para humanos, ou seja, cidades verdes e sustentáveis.

Os recursos naturais estão findando, o solo não é o mesmo do ano de 1500, deverá existir uma saída, aqui vislumbrada pela AU. Atualmente no Brasil existe a facilitação para o agronegócio, não existe a compensação social e ambiental desses projetos, ou seja, deixa-se de fazer muito pelo menor produtor enquanto que se cria muita concessão para os agroprodutores, o agronegócio é uma atividade que cansa o solo e conseqüentemente aumenta a precarização de pessoas em todos os aspectos

As camadas mais afetadas da sociedade, não tem seus direitos assegurados, nossa carta maior é uma ficção. Hoje essa realidade é latente, e o que isso tem a ver com AU? As pessoas que estão desenvolvendo a AU, são pequenos produtores que precisam comer, é uma luta desenfreada, não existe a participação público-privada no processo. O papel do Estado é de financiar, promover, incentivar, desenvolver cada vez mais programas de (AU), até o momento isso é irrisório. Agregar pessoas com espaços públicos, será uma possibilidade de um resultado positivo em curto prazo de tempo. As pessoas que comem bem, ficam resistentes as infecções e outras doenças, vendo por esse prisma é uma forma de diminuir o gasto público, diminuir a famigerada fila de espera nas unidades de pronto atendimento (UPAs) e hospitais, assim como, demonstrar os péssimos mapas da violência urbana. Investir na AU pode melhorar esse convívio social, ambiental e econômico. Enfim, uma grande problemática tratada neste trabalho.

As contribuições que EA podem inferir na AU, são ferramentas para melhorar a merenda escolar de qualidade, adequação dos programas sociais, atenção básica de saúde, segurança alimentar, fomentar a produção de conhecimentos, experiências e sabedorias populares, resgatar alimentos em extinção, ou seja, propõem-se um ataque a esse modelo urbano globalizado, insustentável e falido.

## REFERÊNCIAS

Conselho Nacional De Segurança Alimentar E Nutricional. Relatório Final do Encontro Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional no contexto da Política de Desenvolvimento Urbano. Brasília-DF. 10, 11 e 12 de agosto de 2011.

Comissão de Justiça da Câmara Federal do Brasil. Disponível em < [Http:// www2.camara.leg.br/agropecuaria/492593- desenvolvimento urbano – aprova criação da Política Nacional de Agricultura Urbana](http://www2.camara.leg.br/agropecuaria/492593-desenvolvimento-urbano). HTML. Acesso em 22/09/17

BRASIL, Lei no. 9795/1999 – Institui a Política Nacional de Educação Ambiental, Câmara dos Deputados, Brasília – DF, 27 de abril de 1999. 9

\_\_\_\_\_, Decreto no. 7.794/12 – Institui a Política Nacional de Agroecologia e Produção Orgânica , Presidência da República – Casa Civil, Brasília – DF, 20 de agosto de 2012.

\_\_\_\_\_; Ministério da Agricultura. Documentos 160, Agrobiologia, Agricultura Urbana em Cuba: Análise de alguns Aspectos Técnicos. Planaltina – DF – dezembro (2002)

\_\_\_\_\_, Ministério da Agricultura; Documentos 148, Agricultura de Base Agroecológica em sistemas urbanos: Potencialidades, limitações e Experiências. EMBRAPA - Planaltina – DF – Novembro (2005)

\_\_\_\_\_, Ministério da Agricultura; Documentos 48, Agricultura Urbana. EMBRAPA - Planaltina – DF – junho (2002)

\_\_\_\_\_, Ministério do Meio Ambiente, Ética e Sustentabilidade, Caderno de Debate: Agenda 21 e Sustentabilidade, 1ª. Ed Brasília- DF (1991).

BROWN, Lester. Plano B 4.0, Mobilização para Salvar a Civilização – Ideia Sustentável - 1ª. Edição (2009)

DIAS, Genebaldo Freire, Educação Ambiental – Princípios e Práticas, Ed. Gaia, Sp. 2004

EIRAS, JAIRO e ALCIRENE, Quintal Produtivo, (Manual Técnico 10 – EMATER/PA, Governo do Estado do Pará. Marituba – (2005)

EIXO 5, Fortaleza 2040; Agricultura Urbana - Versão Preliminar; Plano Municipal de Agricultura Urbana; Prefeitura Municipal de Fortaleza.

PINTO, Rute; RAMOS Rui, Avaliação das Hortas Urbanas – O Caso da Cidade de Braga – 14º. Congresso da APRD e 2º. Congresso de Gestão E Conservação da Natureza, desenvolvimento, Administração e Governança Local Tamar – Portugal , Julho (2008)

ROSA, Pedro, Políticas Públicas em Agricultura Urbana e Periurbana no Brasil. Revista Geográfica da América Central - Número especial EGAL, 2011 – Costa Rica, II semestre (2011)

ZANETI, Izabel, Reflexões sobre a Educação Ambiental, Valores e Cidadania Planetária ; Revista COLECIONA, textos para pensar Educação Ambiental,

PINTO; RAMOS, 14º. Congresso d APDR, 20. Congresso de Gestão e Conservação da Natureza – Desenvolvimento, administração e Governança Local Tamar – Avaliação Ambiental de Hortas Urbanas – Ocaso da Cidade de Braga – Portugal, Julho de 2008

SANTANDREU, Alain; LOVO, Ivana Cristina. Panorama da agricultura urbana e periurbana no Brasil e diretrizes políticas para sua promoção: identificação e caracterização de iniciativas de AUP em regiões metropolitanas brasileiras: versão final. Belo Horizonte: Rede de Intercâmbio de Tecnologias Alternativas – REDE; Lima: Promoção do Desenvolvimento Sostenible – IPES, 2007.

## ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE POLPAS DE AÇAÍ VENDIDAS POR AMBULANTES NA CIDADE DE CUIABÁ – MT

### Ana Paula de Oliveira Pinheiro

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso - Campus Cuiabá – Bela Vista.  
Cuiabá - MT

### Eliane Ramos de Jesus

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso - Campus Cuiabá – Bela Vista.  
Cuiabá – MT

### James Moraes de Moura

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso - Campus Cuiabá – Bela Vista.  
Cuiabá- MT

**RESUMO:** O açaí é um fruto típico da região norte do Brasil e popularmente consumido devido ao seu valor nutricional, e isto resultou no crescimento significativo do número de vendedores ambulantes. Devido à perecibilidade da polpa do açaí, proveniente da alta carga microbiana, tem sinalizado uma preocupação com relação à qualidade e segurança dos produtos. Buscou-se avaliar a qualidade microbiológica de cinco amostras de polpa de açaí vendidas por ambulantes na cidade de Cuiabá-MT. Utilizou-se placas *Compact Dry* para a determinação de coliformes totais (*Escherichia coli*, *Klebsiella*

*oxytoca* e *Pseudomonas aeruginosa*), fungos (*Candida albicans* e *Aspergillus niger*) e *Salmonella* spp. Para a quantificação de *Staphylococcus* spp., utilizou-se do método Ágar MacConkey. Os resultados obtidos para coliformes totais demonstraram que 40% das amostras encontravam-se acima dos valores estabelecidos pela legislação. Verificou-se a ausência para *Klebsiella oxytoca* em todas as amostras. Para fungos, somente uma amostra apresentou-se dentro do estabelecido pela legislação e para *Salmonella* spp. determinou-se a ausência em todas as amostras. Portanto, as polpas de açaí apresentaram qualidade microbiológica insatisfatória. Verificou-se a necessidade de aplicação de medidas higiênico-sanitárias e melhorar as condições de armazenamento, visto que o controle de temperatura é um fator determinante para a garantia da qualidade do produto.

**PALAVRAS-CHAVE:** Parâmetros microbiológicos, segurança alimentar, condições higiênico-sanitárias.

**ABSTRACT:** Açaí is a typical fruit from the northern region of Brazil and popularly consumed due to its nutritional value, and this has resulted in a significant increase in the number of street vendors. Due to the perishability of the açaí pulp, due to the high microbial load, it has signaled a concern regarding the quality and safety of the

products. The aim was to evaluate the microbiological quality of five samples of açai pulp sold by street vendors in the city of Cuiabá-MT. *Compact Dry* plates were used for the determination of total coliforms (*Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* and *Pseudomonas aeruginosa*), fungi (*Candida albicans* and *Aspergillus niger*) and *Salmonella* spp. For the quantification of *Staphylococcus* spp., The MacConkey Agar method was used. The results obtained for total coliforms showed that 40% of the samples were above the values established by the legislation. The absence of *Klebsiella oxytoca* was found in all samples. For fungi, only one sample presented within the established by the legislation and for *Salmonella* spp. the absence was determined in all samples. Therefore, the açai pulps presented poor microbiological quality. It was verified the need to apply hygienic-sanitary measures and to improve the storage conditions, since the temperature control is a determining factor for the quality assurance of the product.

**KEYWORDS:** Microbiological parameters, food safety, hygienic-sanitary conditions.

## 1 | INTRODUÇÃO

O açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) é uma palmeira tropical que produz o açai que é um fruto típico da região norte do Brasil, sendo o estado do Pará seu maior produtor. O fruto é bastante procurado para a produção da bebida açai (suco espesso de cor roxo violeta), utilizada na alimentação popular e na produção de picolés e sorvetes. É comumente consumido devido seu alto valor nutricional (rico em proteínas, fibras, lipídeos, vitamina E, e minerais).

A busca por melhores padrões de saúde tem favorecido a comercialização do fruto que é rico em compostos antioxidantes (FARIA et al.,2012). A partir desta nova perspectiva de estilo de vida, o açai passou a chamar a atenção dos consumidores com maior poder aquisitivo devido seus benefícios já conhecidos (NOGUEIRA et al., 2013).

O aumento do seu consumo foi visto como oportunidade de investimento, contribuindo com a renda diante de situações econômicas desfavoráveis, o que resultou no crescimento significativo do número de pontos de venda do produto, principalmente de vendedores ambulantes que utilizam de estruturas físicas simples para a comercialização da polpa do fruto.

Durante o cultivo, o açai é facilmente atingido por pragas e insetos, pois a palmeira de açai cresce em meios tropicais muito úmidos e quentes, cujos ataques prejudicam a qualidade da matéria-prima. Quando *in natura* ou sem o ideal congelamento da polpa, o açai se degrada em poucas horas, mesmo sob refrigeração. Segundo Oliveira et al. (1988), um dos fatores responsáveis pela sua perecibilidade é a grande carga microbiana presente no fruto, o que tem sinalizado uma preocupação com relação à qualidade e segurança dos produtos fornecidos aos consumidores.

Outros fatores que contribuem para a degradação do açai são: a falta de cuidados durante a colheita e o transporte, ocorrendo contaminações devido à manipulação e o



contato com superfícies contendo sujidades (ROGEZ et al., 1997).

Durante o processamento da polpa de açaí, que devido sua alta perecibilidade já citada deve ser realizado em até 12 horas após a colheita, o fruto é extremamente manipulado o que contribui para o aumento da carga microbiana. Portanto, a correta execução da etapa de sanitização dos frutos, a higienização de máquinas e equipamentos e a boa higiene do manipulador afeta diretamente na qualidade do produto, que tem apenas o congelamento (entre -18°C e -25°C) como fator de redução de crescimento de microrganismos (BEZERRA, 2007).

O objetivo deste trabalho é avaliar a qualidade microbiológica da polpa de açaí congelada e comercializada por ambulantes na região central de Cuiabá – MT, comparando os resultados obtidos com as normas vigentes.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

Coletou-se cinco amostras de polpa congelada do fruto em frascos plásticos esterilizados (amostras A, B, C, D e E), acondicionou-se em caixa térmica refrigerada e posteriormente armazenou-se no refrigerador do laboratório de Microbiologia para futura análise microbiológica localizado no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso – IFMT, Campos Bela Vista até o momento da inoculação.

Em laboratório pesou-se em uma balança analítica aproximadamente 10g de cada amostra, transferiu-se para um frasco de Erlenmeyer contendo 90mL de água peptonada (APT), homogeneizou-se e tampou-se com algodão. Realizou-se a diluição seriada até  $10^{-2}$  em uma capela de exaustão, mantendo-se todo material utilizado próximo à chama para evitar contaminações provenientes do ar ambiente. Agitou-se o frasco de Erlenmeyer por dois minutos, homogeneizando a amostra diluída e, com auxílio de uma pipeta automática, transferiu-se 1mL da diluição  $10^{-1}$  para um tubo de ensaio (contendo 9ml de água peptonada), agitou-se o tubo por aproximadamente 45 segundos e transferiu-se 1mL para as placas *Compact Dry* para a determinação de coliformes totais (*Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* e *Pseudomonas aeruginosa*). Em seguida, as placas foram incubadas em estufa microbiológica a 36°C para leitura em 24h.

Para as análises de *Staphylococcus* spp., utilizou-se do método padrão de semeadura em meio de cultura Ágar MacConkey, onde após adicionar-se o meio de cultura nas placas de Petri e as mesmas solidificarem, inoculou-se 0,5mL da amostra (diluição  $10^{-1}$ ) e procedeu-se com o a técnica de espalhamento com alça de Drigalski, e incubou-se as placas de Petri em estufa por 24h.

Para *Salmonella* spp., realizou-se a incubação das amostras (diluição  $10^{-1}$ ) por 24 horas em estufas a 36°C. Após a incubação, inoculou-se 0,1mL de cada amostra e 1 mL de água destilada nas placas *Compact Dry*. Finalizada esta etapa, as placas foram incubadas em estufa microbiológica a 43°C para leitura qualitativa em 24h pós-

inoculação.

Para determinação de fungos, procedeu-se de forma semelhante as técnicas de inoculação para observação de coliformes totais, todavia, tal procedimento se deu em placas *Compact Dry* específicas para crescimento fúngico. A incubação destas placas ocorreu em estufa microbiológica a 30°C com leituras em 72h e 120h após a inoculação. Observou-se quantitativamente a presença das espécies *Candida albicans* e *Aspergillus niger*.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

No momento da coleta buscou-se observar o estado de limpeza/higiene do local de venda, do carrinho de açaí, dos utensílios utilizados e do manipulador. Verificou-se que os cinco pontos de venda comercializam a polpa de açaí do mesmo fabricante e que atendem em média oito horas por dia (exceto no domingo).

Apenas um carrinho (amostra B) utiliza de sistema elétrico de refrigeração, os demais utilizam desde gelo em barra a garrafas plásticas com água congelada, o que possibilitou verificar uma grande diferença de temperatura da polpa de açaí do carrinho B (-14,4°C) para os demais carrinhos A, C, D e E (-3,0°C; -5,3°C; -0,3°C; e -0,2°C), principalmente devido ao horário em que se realizou a coleta, por volta das 13 horas, onde se tem um pico de temperatura na capital cuiabana de aproximadamente 38°C, ou seja, a eficiência de refrigeração da barra de gelo e das garrafas plásticas congeladas já havia reduzido consideravelmente. Outro fator que contribui para a elevação da temperatura do produto é a exposição do carrinho diretamente ao sol, observados nos pontos de coleta A e D.

Notou-se que os pontos não tinham fonte de água potável nas proximidades. Todos os ambulantes utilizavam galões plásticos para armazenar a água para limpeza do carrinho, utensílios e lavar as mãos. Apenas o carrinho B mantinha álcool em gel em local visível e de fácil acesso dos manipuladores.

Procedimentos incorretos durante a manipulação dos alimentos podem provocar as DTA, causadas por agentes biológicos que chegam ao organismo humano por meio de água e alimentos contaminados (MOURA, 2014). No Brasil, a formulação da RDC 49/2013 estabelece a atuação da vigilância sanitária frente aos produtores de pequeno porte e tem como princípio tratamento diferenciado para com esses produtores, de forma a adequar os procedimentos necessários para regularização sanitária.

Verificou-se que os treinamentos recebidos, conforme informado pelos ambulantes, diziam respeito basicamente à forma como o produto de venda deveria ser preparado, e que não houve nenhum foco na orientação quanto às técnicas corretas de manipulação (Boas Práticas de Fabricação – BPF), apenas receberam instruções para manter o local sempre limpo e utilizar luvas plásticas para preparar o açaí.

A garantia da qualidade dos alimentos no aspecto higiênico-sanitário é possível

desde que o manipulador tenha conhecimento referente ao processo produtivo, da compra da matéria-prima até o produto chegar ao consumidor (alimento pronto), considerando-se as etapas de recebimento, armazenamento, preparo e distribuição. Esses procedimentos são conhecidos como BPF que, se efetivamente aplicados, melhoram a qualidade dos alimentos por reduzir a ocorrência de contaminação química, física ou biológica (MOURA, 2014).

Segundo Mallon (2004), geralmente as áreas de venda de alimentos de rua apresentam infraestrutura inadequada, falta de acesso à água potável e a instalações sanitárias, o que faz aumentar os riscos de servirem como veículos de doenças.

Durante a coleta, apenas os manipuladores dos carrinhos A e C utilizavam luvas e touca. Do carrinho C utilizava apenas luvas, e os demais nenhum dos itens. Nenhum dos manipuladores utilizava máscara de proteção.

Observou-se que todas as amostras estavam fora dos padrões de qualidade sanitária exigidos pela legislação brasileira para coliformes totais e fungos (tabela 1). Constatou-se que somente os resultados para *Salmonella* spp. mostraram-se de acordo com a legislação vigente (BRASIL, 2001), onde determina-se a ausência do microrganismo para os alimentos derivados de frutas. No que se refere à *Salmonella* spp., esta é responsável por doenças transmitidas por alimentos (DTA) e por animais portadores, dentre elas a salmonelose (OLIVER et al., 2009). Dessa forma, alimentos para consumo humano devem ter ausência deste microrganismo em uma alíquota de 25g, representando a viabilidade do produto (BRASIL, 2001).

As bactérias *Escherichia coli* (*E. coli*) e *Salmonella* spp. são as principais causadoras de surtos de doenças entéricas que provocam em seus hospedeiros cólicas abdominais, vômito e diarreia que pode ou não apresentar muco e sangue nas fezes. O principal fator de contaminação citada na literatura é a manipulação de alimentos sem as corretas técnicas de higienização (BALBANI; BUTUGAN, 2001).

Das 5 amostras de polpa de açaí analisadas, todas apresentaram ausência para *Klebsiella oxytoca* (*K. oxytoca*) e 3 amostras (60%) demonstraram ausência para bactérias do gênero *Escherichia coli*, dessa forma as amostras encontram-se de acordo com a RDC n.º 12/2001 que especifica limite máximo de  $10^2$  UFC.g<sup>-1</sup> para coliformes totais. A *K. oxytoca* pode causar sérios problemas de infecção no trato urinário do hospedeiro, em casos mais graves afetam os rins, podendo causar falências dos órgãos. Bons hábitos de higiene são fundamentais para evitar a contaminação por esta bactéria (TORTORA, 2012).

Duas amostras (40%) confirmaram a presença de coliformes totais com valores de  $7 \times 10^2$  UFC.g<sup>-1</sup>, estando dentro dos padrões estabelecidos pela legislação vigente que recomenda valor máximo de  $10^2$  UFC.g<sup>-1</sup> (BRASIL, 2001). De acordo com Eto et al. (2010) que obteve ausência nos resultados das contagens de coliformes totais e fecais em todas as marcas de polpas de açaí analisadas. Como também no estudo de Santos et al. (2008), o qual realizou a análise de 98 polpas de frutas congeladas de 8 sabores diferentes, comercializadas em Palmas - TO, e obteve-se resultados

positivos para coliformes totais em 5 amostras. Além de confirmarem presença de *Escherichia coli* e coliformes termotolerantes, para as mesmas amostras. Entretanto, nas análises realizadas por Lima et al. (2014), das condições higiênico-sanitárias dos manipuladores de açaí no bairro coroadado em Manaus - AM, verificou-se que em todas as amostras da polpa do açaí confirmaram a presença de coliformes 45°C.

Amostra	Coliformes totais			<i>Staphylococcus</i> (UFC.g <sup>-1</sup> )	Bolores e Leveduras		<i>Salmonella</i> spp.
	(UFC.g <sup>-1</sup> )				(UFC.g <sup>-1</sup> )		
	<i>E.coli</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>P. aeruginosa</i>		<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>	
A	0	0	6,0x10 <sup>2</sup>	0	1,23x10 <sup>4</sup>	2,8x10 <sup>3</sup>	ausência
B	0	0	1,3x10 <sup>3</sup>	0	1,64x10 <sup>4</sup>	6,9x10 <sup>3</sup>	ausência
C	0	0	1,4x10 <sup>3</sup>	0	6,8x10 <sup>3</sup>	4,5x10 <sup>3</sup>	ausência
D	7,0x10 <sup>2</sup>	0	8,9x10 <sup>3</sup>	1,0x10 <sup>2</sup>	2,34x10 <sup>4</sup>	4,0x10 <sup>3</sup>	ausência
E	7,0x10 <sup>2</sup>	0	6,4x10 <sup>3</sup>	0	3,34x10 <sup>4</sup>	9,3x10 <sup>3</sup>	ausência

**Tabela 1.** Resultados das análises microbiológicas de polpa de açaí comercializada na cidade de Cuiabá, MT.

Comparando os resultados obtidos para as amostras de *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) com o determinado pela Portaria n° 518 do Ministério da Saúde de 25 de março de 2004, que estabelece valor máximo permitido de ausência em 100mL para coliformes totais. Verificou-se presença da bactéria em todas as amostras, não satisfazendo os limites permitidos. Indicando contaminação através da água utilizada no preparo e/ou na lavagem dos utensílios utilizados. A bactéria *P. aeruginosa* também é responsável pela deterioração em frutas e hortaliças no período pós-colheita, e assim como a *E. coli* e *Salmonella* spp. pode causar sérios problemas entéricos. Portanto deve-se controlar a quantidade deste microrganismo nos alimentos. (FERNANDES et al., 2009).

Nas análises, somente uma amostra (20%) apresentou crescimento bacteriano de *Staphylococcus* spp. Na análise microbiológica de polpas de açaí comercializadas na cidade de São Paulo por Santos *et al.* das vintessete placas inoculadas, 10 apresentaram bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. Segundo Tortora (2012), as bactérias *Staphylococcus* spp. estão presentes na pele, nos olhos, nariz e boca dos seres humanos, o que significa que a manipulação é o principal veículo de contaminação. A presença deste microrganismo no alimento e quando ingerido pode causar náuseas, cólicas abdominais, diarreias, sudorese, septicemia e pneumonia no hospedeiro, podendo até ser fatal (LIMA et al., 2007).

Em todas as amostras foi verificada a presença de fungos, variando de 2,8x10<sup>3</sup> UFC.g<sup>-1</sup> a 3,34x10<sup>4</sup> UFC.g<sup>-1</sup>. Os fungos provocam a deterioração do alimento e conseqüentemente, alterações no sabor e qualidade do mesmo. O fungo *A. niger* tem a capacidade de produzir micotoxinas que quando ingeridas resultam em hemorragias

e até mesmo necrose. O fungo *C. albicans* tem a capacidade de produzir biofilme que permite uma melhor aderência ao tecido alvo e pode causar doenças gastrointestinais, causando desde lesões na mucosa bucal à diarreia com presença de muco nas fezes (MAZIERO; BERSOT, 2010). Para os bolores e leveduras, os valores obtidos inicialmente nos frutos recém colhidos, já se encontravam acima do permitido ( $1 \times 10^3$  UFC/mL) pela Legislação vigente (BRASIL, 2000).

De acordo com ROGÉZ (2000) o aumento da contaminação por fungos e bolores se dá por alguns fatores: pH pouco ácido ( $5,23 \pm 0,27$ ;  $n=129$  amostras), riqueza nutricional, principalmente em lipídio e proteína, alta umidade relativa e temperatura na época da safra do açaí que favorecem o crescimento microbiano.

#### 4 | CONCLUSÕES

As polpas de açaí comercializadas em Cuiabá-MT apresentaram qualidade microbiológica insatisfatória. Observou-se a necessidade de medidas sanitárias para reduzir o grau de contaminação, como operações eficientes de limpeza e sanitificação dos equipamentos e utensílios, matéria-prima adequada e boas condições de armazenamento.

A refrigeração é de extrema importância para esta matéria prima tão vulnerável, visto que o controle de temperatura é um fator determinante para a garantia de segurança alimentar do produto e considerando a média de temperatura da capital cuiabana, uma das cidades mais quentes do Brasil, a comercialização da polpa de açaí deveria ser feita apenas em carrinhos com sistemas elétricos de refrigeração, que se apresentam mais eficazes para conservação de temperaturas mais baixas.

A falta de treinamento adequado quanto às técnicas de manipulação de alimentos é um fator determinante para a qualidade final do produto, tornando-o um transmissor de doenças em potencial. O fato de as amostras apresentarem resultados dentro dos limites aceitáveis estabelecidos pela legislação, não garante que as mesmas sejam alimentos seguros para o consumo e deve ser visto como um alerta, de forma a buscar melhores técnicas de manipulação do alimento.

#### REFERÊNCIAS

BALBANI, A. P. S.; BUTUGAN. O. **Contaminação biológica de alimentos**. *Pediatria* (São Paulo); 23(4):320-8. 2001.

BEZERRA, V. S. **Açaí congelado / Valéria Saldanha Bezerra**. – Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2007. 40 p.; il. – (Coleção Agroindústria Familiar). 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura do Abastecimento. **Instrução Normativa nº 12, de 13 de novembro de 1999**. Padrões de Identidade e Qualidade para Polpas de Frutas. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 13 set. 1999, Seção I, p 72. 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura do Abastecimento. **Instrução normativa nº 01, de 07 de janeiro de 2000**. Regulamento técnico geral para fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpa de fruta. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 10 jan. 2000. Seção 1, p.54-58. 2000.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 12, de 02/01/2001. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 10 jan. 2001, Seção I, p. 45-53. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº518 de 25 de março de 2004**, "Standard Methods for the Examination of foods". Editado pela APHA 1994. 2004.

COHEN, K.O.; MATTA, V.M.; FURTADO, A.A.L.; MEDEIROS, N.L.; CHISTÉ, R.C. **Contaminantes microbiológicos em polpas de açaí comercializadas na cidade de Belém-PA**. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*. Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR Campus Ponta Grossa – PR, v. 05, n. 02, p. 528-529. 2011.

ETO, D. K.; KANO, A. M.; BORGES, M. T. M. R.; BRUGNARO, C.; CECCATO-ANTONINI, S. R.; VERRUMA-BERNARDI, M. R. **Qualidade microbiológica e físico-química da polpa e mix de açaí armazenada sob congelamento**. *Rev. Instituto Adolfo Lutz*. São Paulo; 69(3):304-10. 2010.

FARIA, M.; OLIVEIRA, L. B. D.; COSTA, F. E. C. **Determinação da qualidade microbiológica de polpas de açaí congeladas comercializadas na cidade de Pouso Alegre – MG**. *Alim. Nutr., Araraquara*, v. 23, n. 2, p. 243-249, abr./jun. 2012.

FERNANDES, M. C.; RIBEIRO, M. G.; SIQUEIRA, A. K.; SALERNO, T.; Lara, G. H. B.; LISTONI, F. J. P. **Surto de mastite bovina causada por linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes aos antimicrobianos**. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.61, n.3, p.745-748. 2009.

LIMA, K. M.; RÊGO, R. S. M.; MONTENEGRO, F. **Espécies fúngicas isoladas a partir de unhas de manipuladores de alimentos**. *RBAC*, v.39(3): 193-196. 2007.

LIMA, M. F.; EUFRÁSIO, J. M. B.; SILVA, E. B.; SILVA, B. O.; BRAGA, L. V.; CRUZ, T. L.; SILVA, A. C. **Situação higiênico - sanitária dos manipuladores de açaí no bairro no coroadado em Manaus, Amazonas**. *Anais Programa Ciência na Escola*. v.2 (1) 2014: 139.

MALLON, C.; BORTOLOZO, E. A. F. Q. **Alimentos comercializados por ambulantes: Uma questão de segurança alimentar**. *Publ. UEPG Ci. Biol. Saúde*, Ponta Grossa, 10 (3/4): 65-76, set./dez. 2004.

MARTINS,S; **Segurança Alimentar e Inclusão Socioproductiva: debate sobre a qualidade da polpa de açaí Juçara (*Euterpe edulis*) produzida por empreendimentos familiares rurais participantes da Rede Juçara no Rio Grande do Sul**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos. Curso de Engenharia de Alimentos. 2015.

MAZIERO, M. T.; BERSOT, L. S. **Micotoxinas em alimentos produzidos no brasil**. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, Campina Grande, v.12, n.1, p.89-99. 2010.

MOURA, E. G. R. **Composição nutricional e práticas higiênicossanitárias na produção de açaí na tigela: diagnóstico e intervenção**. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Saúde) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO. 2014. 145p.

NOGUEIRA, A. K. M; SANTANA, A. C.; GARCIA, W. S. **A dinâmica do mercado de açaí fruto no Estado do Pará: de 1994 a 2009**. *Rev. Ceres*, Viçosa, v. 60, n.3, p. 324-331, mai/jun, 2013.

OLIVEIRA, M. L. S., SOUSA, C.L., OLIVEIRA, R.A. **Qualidade microbiológica da bebida açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) comercializada na cidade de Belém**. In: Encontro de Profissionais de Química da Amazônia, 6., 1988, Manaus. *Anais...* Belém: CRQ, p. 189-195. 1988.

OLIVER, S.P.; BOOR, K.J.; MURPHY, S.C.; MURINDA, S.E. **Food Safety Hazards Associated With Consumption of Raw Milk. Food borne Pathogens and Disease**, v.6, n.7, p. 793-806. 2009.

POMPEU, D.R.; BARATA, V.C.P.; ROGEZ, H. **Impacto da refrigeração sobre variáveis de qualidade dos frutos do açaizeiro. Rev. Alim. Nut. Araraquara**. v.20, n.1, p. 141-148, jan./mar. 2009.

ROGEZ, H.; PASCAL, S.; BUXANT, R.; LOPES, S.Q.; COLSONCORBISIER, A.M. **Identificação dos principais fungos e leveduras presentes na polpa do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.)**. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 19, 1997, Rio de Janeiro. **Resumos...** Rio de Janeiro: SBM, p. 269. 1997.

ROGEZ, H. R. **Açaí: preparo, composição e melhoramento da conservação**. Belém: EDUFPA, 313p. 2000.

ROGEZ, H.; SOUZA, J.N.S.; NASCIMENTO, M. Q.; BUXANT, R.; PASCAL, S. **Branqueamento dos frutos de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) para a diminuição da carga microbiana do suco. Anais da Assoc. Bras. Quím.**, v. 45, n. 4, p. 177-184. 1996.

SANTOS, B. A.; CAMPOFIORITO, M. C. M.; PINTO, J. L. F.; PENTEADO, S. H. N. W.; FONSECA F. L. A.; GEHRKE, F. S. **Análise microbiológica de polpas de açaí comercializadas na cidade de São Paulo**. Universidade Paulista, São Paulo- SP. **RBAC**. 48(1):53-57. 2016.

SANTOS, C. A. A.; COELHO, A. F. S.; CARREIRO, S. C. **Avaliação microbiológica de polpas de frutas congeladas. Ciênc. Tecnol. Aliment**. Campinas, 28(4): 913-915. 2008.

## ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DE DRAGEADOS DE SOJA [*Glycine max* (L.)] COM COBERTURA CROCANTE, SALGADA E SEM GLÚTEN

### Lúcia Felicidade Dias

Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Docente do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos (PPGTAL). Mestrado Profissional, Londrina – Paraná

### Isabel Craveiro Moreira Andrei

Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Docente do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos (PPGTAL). Mestrado Profissional, Londrina – Paraná

### Thais Garcia Bortotti

Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Discente do Curso Superior de Tecnologia em Alimentos, Graduação, Londrina - Paraná

### Sumaya Hellu El Kadri Nakayama

Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Discente do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos (PPGTAL). Mestrado Profissional, Londrina - Paraná

### Deivid Padilha Schena

Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Discente do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos (PPGTAL). Mestrado Profissional, Londrina - Paraná

Seus produtos e derivados são associados com redução de doenças cardiovasculares, osteoporose, diabetes e menopausa. Devido a essas características, desenvolveu-se um petisco ou lanche rápido benéfico à saúde. O drageado é a técnica mais antiga para fabricação de confeitos, criada a mais de mil anos, no entanto ainda é muito utilizada. O objetivo desse trabalho foi realizar as análises de composição proximal em três formulações de drageado de soja, com 5, 15 e 25 % de farinha de aveia, por meio da determinação de: cinzas totais, lipídeos, proteínas, umidade e carboidratos totais (por diferença). Também foram realizadas análises microbiológicas para identificar ausência ou presença de coliformes termotolerantes e *Salmonella* sp. Comparado a produtos comerciais, não houve diferença significativa na composição proximal. O produto se enquadra na legislação brasileira quando aos padrões microbiológicos, não oferecendo risco à saúde do consumidor.

**PALAVRAS-CHAVE:** Fonte de proteína. Drageados. Soja. Farinha de aveia.

**ABSTRACT:** Protein source, soy is excellent for food. Their products and derivatives are associated with reduced cardiovascular disease, osteoporosis, diabetes and menopause. Due to these characteristics, developed a snack or quick snack beneficial to health. The dragees

**RESUMO:** Fonte de proteína, a soja é excelente para a alimentação humana.



is the oldest technique for the manufacture of confectionery, created more than a thousand years, however it is still widely used. The objective of the work was elaborated based on coverage with food and salt coverage. In the preliminary tests, three formulations, formulation 1, with addition of 5% oat flour, formulation 2 with 15% oat flour and formulation 3 with 25% oat flour were defined. The dragees were on proximal composition: total lipid, protein, ash, moisture and total carbohydrate (by difference). Were also conducted microbiological tests to identify the absence or presence of coliforms and Salmonella sp. Termotolerantes. In the three formulations, there was no significant difference in the proximal composition, indicating lower lipid values when compared to commercial products. The results of the microbiological analyzes proved that the product was developed and framed in the Brazilian legislation.

**KEYWORDS:** Source of protein. Dragees. Soybeans. Oatmeal.

## 1 | INTRODUÇÃO

Fonte de proteína, a soja é excelente para a alimentação humana e animal. O grão contém pouco ou nenhum amido. O consumo dos grãos ou produtos derivados está associado com a redução do risco de inúmeras doenças, como câncer de esôfago, pulmão, próstata, mama e cólon, doenças cardiovasculares, osteoporose, diabetes e até alguns sintomas de menopausa (TOLEDO et al., 2007).

Fatores climáticos, tipo de solo, localização geográfica, variedade e práticas agronômicas podem variar a composição química da soja. Grãos maduros podem conter cerca de 40,7 % de proteína, 22,7 % de óleo, 10,9 % de açúcares totais, 6,7 % de fibras, 5,8 % de cinzas e 30,8 % de carboidratos. Visando a alimentação humana, os cultivares de soja devem apresentar as seguintes características: grãos de tamanho grande, cor da casca branca ou amarela, hilo claro, alto teor de proteína e médio teor de óleo (VIEIRA, 1999).

Devido suas características nutricionais e seus benefícios, a soja pode ser um grão drageado, com intenção de criar um petisco ou lanche rápido, benéfico à saúde. O drageamento é definido como o engrossamento de um centro com aplicações de camadas sucessivas de soluções de açúcares ou outros ingredientes, com ou sem a injeção de ar para secagem. Entre cada aplicação de xarope, ocorre a evaporação da umidade, formando uma fina capa cristalizada sobre os núcleos. Para melhor dragear, os centros que não se deformam facilmente e não apresentam superfície plana são os mais adequados, e a sua forma física deve permitir um melhor movimento dentro da drageadeira (FADINI et al., 2005). Há diversas categorias de drageados e cada uma delas têm exigências de conhecimentos técnicos e práticos. Essas categorias são: drageados duros, drageados macios (*soft*), drageados de chocolate ou *compound*, drageados salgados e drageados combinados (QUEIROZ; FADINI, 2014).

O objetivo do trabalho foi a determinação da composição proximal e análises microbiológicas dos drageados de soja com cobertura crocante, salgada e sem glúten.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa tem caráter experimental e quantitativa. Foram analisadas três amostras de drageados de soja, com diferentes porcentagens de farinha de aveia na cobertura crocante e salgada: 5, 15 e 25 %. As análises realizadas foram: umidade, cinzas, lipídeos, proteínas e carboidratos totais (por diferença), de acordo com Instituto Adolfo Lutz (1985). As análises microbiológicas foram realizadas com base na legislação federal em vigor, conforme descrito na Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001 (Brasil, 2001). O produto analisado foi enquadrado no Grupo 14 (Produtos sólidos prontos para o consumo - Petiscos e similares) e no Sub grupo 14 c (Produtos salgados e doces, extrusados ou não, fritos, assados ou compactados, incluindo torresmos e similares). Sendo assim, o padrão microbiológico consistiu das seguintes análises: Pesquisa de *Salmonella* sp. e determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes a 45 °C.

### 2.1 Composição proximal

#### 2.1.1 Umidade

O método trata da desidratação da amostra e determinação da variação do peso, que foi considerado como umidade e convertido em porcentagem. Pesou-se aproximadamente 5 gramas de cada amostra no cadinho de porcelana, previamente tarado na balança, que ficaram por 3 horas dentro da estufa com circulação de ar a 105 °C. Após a secagem na estufa, o cadinho foi mantido em dessecador até atingir temperatura ambiente, em seguida pesado e calculado a umidade usando a equação 1:

$$\% \text{ umidade} = 100 - \frac{(\text{cápsulas após a estufa} - \text{cápsula vazia}) \times 100}{\text{peso da amostra}} \quad (\text{Equação 1})$$

#### 2.1.2 Cinzas Totais

Tem como objetivo a oxidação total da matéria orgânica, onde se pesou 5 gramas da amostra em cadinho de porcelana previamente calcinado a 550 °C por 1 hora, resfriado em dessecador até temperatura ambiente. A amostra foi incinerada em mufla a 550 °C por 6 horas. Utilizou-se a equação 2 para cálculos:

$$\% \text{ cinzas} = \frac{(\text{cápsulas após a mufla} - \text{cápsula vazia}) \times 100}{\text{peso da amostra}} \quad (\text{Equação 2})$$

#### 2.1.3 Lipídeos

Utilizou-se o método de Soxhlet para sua determinação, onde pesou-se 5 gramas

da amostra homogeneizada e triturada, sendo colocada em cartucho de papel filtro. Após a montagem do equipamento de destilação, colocou-se o volume do solvente éter de petróleo suficiente para um refluxo e certo excesso, sendo destilado a amostra por 6 horas aproximadamente. Para calcular a porcentagem de lipídios foi utilizado a seguinte relação:

Peso da amostra-----100%

Peso do extrato-----X%

Onde X = % lipídios da amostra

### 2.1.4 Proteínas

Preparou-se o catalisador misto, o ácido sulfúrico 0,01 mol/L, o ácido bórico 2 % e o hidróxido de sódio 50 %. Após o preparo, adicionou-se 1 g de catalisador e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado em 0,2 g de amostra no tubo de Kjeldahl, que foi digerido em bloco digestor a temperatura de 400 °C. Após a digestão foi feito a destilação e titulação, onde se adicionou 10 mL de água destilada nos tubos, e em erlenmeyers foram adicionados 10 mL de ácido bórico 2 % com indicador misto. As amostras dentro do tubo foram neutralizadas com hidróxido de sódio 50 %, e coletado cerca de 50 mL do destilado a ser titulado com ácido sulfúrico 0,01 mol/L. Para calcular a porcentagem de proteínas utilizamos a equação 3:

$$\% \text{ proteínas} = \frac{V \times M \times F \times 0,014 \times 100 \times 6,25}{\text{Peso da amostra}} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde:

V= Volume gasto de ácido na titulação

M= concentração em mol/L do ácido

F= Fator de correção do ácido

P= Peso da amostra em gramas

### 2.1.5 Carboidratos Totais

O teor de carboidratos totais foi determinado por diferença de acordo com a equação 4:

$$\% \text{ Carboidratos} = 100 - [\% \text{ umidade} + \% \text{ cinzas} + \% \text{ lipídios} + \% \text{ proteínas}]$$

## 2.2 Análises Microbiológicas

### 2.2.1 Pesquisa de *Salmonella* sp.

A análise de *Salmonella* sp. foi baseada no método descrito por Silva *et al.* (2007). Para o pré-enriquecimento, 25 g de drageado de soja foi adicionado em 225 mL de

água peptonada tamponada, seguido de homogeneização e incubação a 37 °C por 18 horas.

A partir do pré-enriquecimento, transferiu-se 0,1 mL para tubo de ensaio contendo 10 mL de caldo Rappaport-Vassilidis Soja (RVS) e 1 mL para 10 mL de caldo Tetrionato de Kaufmann Novobiocina (MKTT). Os tubos de Caldo RVS e Caldo MKTT foram incubados a 41,5 °C e a 37 °C, respectivamente, por 24 horas. Em seguida, uma alçada de cada tubo foi estriada em placas de Petri contendo Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) e em placas contendo Ágar *Salmonella Shigella* (SSA).

Após incubação a 37 °C por 24 horas, foi realizada a leitura das placas, e caso houvesse crescimento de colônias típicas, com centro negro e halo transparente, as mesmas seriam submetidas às provas bioquímicas de TSI, Urease, Lisina descarboxilase, Voges Proskauer, Indol e Teste β-galactosidade.

Sendo confirmadas na triagem bioquímica, as colônias selecionadas seguiriam para confirmação antigénica. A sorotipificação seria realizada utilizando antissoro polissomático “O”, “H” ou “Vi”.

### 2.2.2 Determinação do NMP de Coliformes a 45 °C

Para esta análise seguiu-se a metodologia descrita por Silva et al. (2007), empregando-se a técnica dos tubos múltiplos (três séries de três tubos).

Inicialmente pesou-se 25 g de amostra em erlenmeyer contendo 225 mL de água peptonada estéril 0,1 %, seguido de diluições decimais seriadas até 10<sup>-3</sup>. Para o teste presuntivo, uma alíquota de 1,0 mL de cada diluição foi transferida para três tubos contendo Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) e tubos de Durhan invertidos. Após incubação a 35 °C/24 horas, foi considerado positivo os tubos que apresentaram crescimento (turbidez) com formação de gás no interior dos tubos de Durhan.

Para o teste confirmativo, foi transferido uma alíquota de 1,0 mL de cada tubo positivo para um tubo contendo Caldo Bile Verde Brilhante (VB) e para outro tubo contendo Caldo EC. Os tubos de Caldo VB e Caldo EC foram incubados a 35 °C e 44,5 °C, respectivamente, por 24 horas. Os tubos que apresentaram turbidez com formação de gás foram considerados positivos. A determinação do NMP/g de produto foi realizada com o auxílio da tabela de Hoskings.

## 2.3 Tratamento dos dados

Todos os resultados das análises realizadas foram avaliados pelo software Statistica 10.0, utilizando a análise de variância (ANOVA) e o teste de comparação de médias Tukey, com o nível de significância de 5%.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Análises de Composição Proximal

A Tabela 1 apresenta os resultados das análises de composição proximal das amostras de drageado de soja com cobertura crocante salgada e sem glúten.

Determinação	Resultados		
	Formulação 1	Formulação 2	Formulação 3
Umidade (% m/m)	6,33 ± 0,8 <sup>a</sup>	7,34 ± 0,2 <sup>b</sup>	7,56 ± 0,1 <sup>b</sup>
Cinzas totais (% m/m)	4,91 ± 0,1 <sup>a</sup>	4,82 ± 0,2 <sup>a</sup>	4,98 ± 0,5 <sup>a</sup>
Lipídeos (% m/m)	13,91 ± 0,5 <sup>a</sup>	10,29 ± 0,7 <sup>a</sup>	9,16 ± 0,7 <sup>a</sup>
Proteínas (% m/m)	20,39 ± 1,1 <sup>a</sup>	19,80 ± 1,3 <sup>a</sup>	19,83 ± 1,1 <sup>a</sup>
Carboidratos totais (% m/m)	41,36 <sup>a</sup>	44,15 <sup>a</sup>	43,97 <sup>a</sup>

Tabela 1 – Resultados da composição proximal das amostras de drageados de soja.

Médias em base seca ± desvio padrão.

Letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey (P<0,05)

Fonte: Elaborado pelos autores.

Segundo a Tabela 1, o valor menor encontrado para o teor de umidade foi o da formulação com 5 % de aveia, entretanto entre os valores referentes as amostras com 15 % e 25 %, não houve diferenças significativas entre as formulações. Se comparada a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO (2011), o valor encontrado para a farinha de soja é de 5,8 %, que é muito próximo do obtido nas análises de umidade do drageado de soja com cobertura crocante salgada e sem glúten. Segundo estudos realizados por Silva et al. (2006) o grão de soja possui um teor de umidade 5,60 % e seu resíduo possui 8,40 %, valores muito próximos dos encontrados nas amostras analisadas.

Também foi possível concluir que foram obtidos valores de cinzas muito próximos para as três amostras analisadas, não havendo assim diferenciação significativa entre elas. Segundos estudos realizados por Silva et al. (2006) o grão de soja possui uma quantidade de cinzas no valor de 2,88 %, enquanto seu resíduo possui 5,20 %, valores esses que são muito próximos dos encontrados nas três diferentes formulações. Segundo Bressani & Elias (1974), o conteúdo de cinzas que compõem as chamadas leguminosas gira em torno de 2,5 % a 4,2 % o que também concretiza os valores achados nas 3 diferentes amostras do drageado de soja com cobertura crocante salgada e sem glúten.

Os valores percentuais encontrados na Tabela 1 para quantidade de lipídios demonstram que apesar da formulação de 5 % ter obtido valor maior que as demais analisadas, ainda assim a diferença não é significativa. E quando comparada as

diferenças de valores encontrados na amostra de 15 % e 25 % concluímos que é ainda menor. Segundo Silva et al. 2006, a quantidade de lipídios encontradas no grão de soja é de 24,55 % valor bem superior que aqueles obtidos nas 3 diferentes amostras analisadas. Já se comparado ao resíduo da soja que possui 1,67 %, os valores encontrados nas amostras de 5 %, 15 % e 25 % são bem superiores, isso devido os resíduos de soja proverem da extração de óleo dos grãos de soja. Segundo os dados obtidos através do estudo de Seibel et al. 2013, podem ser encontrados valores de lipídios em grãos de soja que variam de 22,45 % a 21,86 %.

Para a verificação da quantidade de proteína existente nas amostras pode se observar que os resultados obtidos na Tabela 1 foram muito próximos, variando de 19,83 % a 20,39 %. Valores que demonstram que o produto possui valor protéico muito próximo de alguns similares. Como é o caso do amendoim torrado que possui uma quantidade de 19,90 % de proteína em sua composição, enquanto se comparado com valor protéico do amendoim japonês que é de 43,60 % (Batista, 2014). Os valores resultantes das 3 amostras foram significativamente menores, porém ainda assim o produto pode ser considerado um derivado de soja que possui alto valor protéico. Se comparados aos valores de 37,67 % encontrados no grão de soja por Ciabotti et al. (2007) as amostras do drageado de soja com cobertura crocante salgada e sem glúten obtiveram valores consideravelmente inferiores. Já em estudos realizados por Silva et al. (2006) o grão integral de soja possui em média 40,4 % enquanto o seu resíduo tem um valor superior de 46,7 %. Onde sua provável causa pode ser a maneira que o produto é confeccionado, podendo acarretar perda de proteína no processo de sua produção.

Já para resultados referentes aos teores de carboidratos foram obtidos valores muito próximos, onde a amostra de 15 % foi a que teve como resultado o maior valor, e a de 5 % o menor, porém nenhum dos 3 valores se diferem significativamente entre si. Quando comparados com os valores encontrados por Batista (2014), de 30,75 % para amendoins torrados e de 48,65 % se comparado ao amendoim japonês, os valores possuem grande semelhança com os dos encontrados nas 3 amostras analisadas. Segundos estudos feitos por Silva et al. (2006) o grão da soja é constituído de 17,26 % de carboidratos, valor bem inferior ao encontrado no drageado de soja com cobertura crocante salgada e sem glúten.

### **3.2 Análises Microbiológicas**

A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos das análises microbiológicas das amostras de drageados.

Análise	Resultados		
	Formulação 1	Formulação 2	Formulação 3
<i>Salmonella</i> sp.	Ausência em 25 g	Ausência em 25 g	Ausência em 25 g
Coliformes a 45°C NMP*/g	< 10	< 10	< 10

Tabela 2 – Resultados das análises microbiológicas realizadas nas amostras dos drageados de soja.

\* NMP: Número mais provável.

Fonte: Elaborado pelos autores

Os drageados não apresentaram resultado positivo para a pesquisa de *Salmonella* sp., demonstrando estarem aptos para consumo. Ao analisar amostras da mesma categoria do produto desenvolvido, como o de biscoito de castanha de caju tipo integral, obtiveram-se os mesmos resultados, encontrados por Zuniga *et al.* (2011). Conforme a RDC nº 12, o valor máximo permitido para Coliformes termotolerantes é de  $\leq 50$  NMP/g, comparando com a legislação vigente, o produto está dentro da conformidade.

#### 4 | CONCLUSÕES

Em relação as 3 diferentes amostras de drageados de soja com 5 %, 15 % e 25 % de farinha de aveia na cobertura crocante e salgada, não houve diferenças significativas em relação ao teor de proteínas, lipídios e carboidratos.

O drageado de soja com cobertura crocante e sem glúten, apresentou em sua formulação de 5 % menor quantidade de umidade em relação as amostras 2 e 3 porém sem diferenças significativas. Em seu teor de cinzas foram obtidos resultados muito próximos em suas três formulações.

A ausência de *Salmonella* sp. e a baixa contagem de UFC/g para coliformes termotolerantes nas três formulações, indicam que o produto está dentro dos padrões microbiológicos exigidos pela legislação. Sendo assim as amostras se encontram aptas para o consumo humano e comercialização sem oferecer riscos à saúde do consumidor.

#### AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Londrina, pela estrutura física, fomento a Ciência. À Prof. Ms. Flávia Farinazzi Machado, pelo suporte no desenvolvimento do produto com auxílio na realização dos testes. À FATEC, em especial ao Prof. Msc. Leandro Repetti, pelo suporte e concessão da planta piloto para realização dos testes. À Empresa Dori Alimentos S/A, em especial à Silvana

Barbosa, pelo apoio e fornecimento de ingredientes. À Empresa Matrix Ingredientes Ltda, em especial à Giulia pelo fornecimento de amostras e material técnico.

## REFERÊNCIAS

Batista, I.G.S. **Avaliação físico-química e nutricional de amendoins industrializados durante o armazenamento**. 2014. 31 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Departamento de Nutrição, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2014.

Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 02 de Janeiro de 2001. **Regulamento Técnico Sobre padrões microbiológicos para alimentos**. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 10 jan. 2001.

Bressani R.; Elias. **Leguminosas: Novos alimentos ricos em proteínas**, NewYork, Academic Press, v.1, p. 231-297, 1974.

Ciabotti, Sueli.; et al. **Características sensoriais e físicas de extratos e tofus de soja comum processada termicamente e livre de lipoxigenase**. Ciênc. Tecnol. Aliment., v. 27, n.3, p. 643-648, 2007.

Fadini, A. L. et al. **Características sensoriais e de textura de chicles drageados Diet produzidos com diferentes tipos de Polióis**. Braz. J. Food Technol., v.8, n.2, p. 113-119, abr./jun. 2005.

Instituto Adolfo Lutz (São Paulo). Açúcares e produtos correlatos. In\_\_\_. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 1ª ed. Digital. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, p. 330-343, 2008.

Queiroz, Marise B; Fadini, Ana Lúcia. **Curso Teórico-Prático: Tecnologia de Fabricação de Drageados Salgados**. Campinas: 2014.

Seibel, Neusa F.; et al. **Brazilian Soybean Varieties for Human Use**. In: EL-SHEMY, H. A. (Ed.). Soybean bio-active compounds. Croatia: InTech, 2013. 546 p.

Silva, Maria S.; et al. **Composição Química e Valor Protéico do Resíduo de Soja em Relação ao Grão de Soja**. Ciência Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 26, n.3, p. 571-576, jul/set. 2006

Silva, N.; Junqueira, V.C.A.; Silveira, N.F.A.; Taniwaki, M.H.; Santos, R.F.S.; Gomes, R.A.R.; Okasaki, M.M. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3 ed. São Paulo: Varela, 2007.

Tabela brasileira de composição de alimentos / NEPA – UNICAMP.- 4. ed. rev. e ampl. - Campinas: NEPA- UNICAMP, 161 p., 2011.

Toledo, T. C. F. et al. **Composição, digestibilidade protéica e desaminação em cultivares brasileiras de soja submetidas à radiação gama**. Ciênc. Tecnol. Alimen., Campinas, v. 27, n. 4, p. 812-815, out./dez. 2007.

Vieira, C. R.; Cabral, L. C.; Depaula, A.C. O. **Composição centesimal e conteúdo de aminoácidos, ácidos graxos e minerais de seis cultivares de soja destinadas à alimentação humana**. Pesq. Agropec. Bras., Brasília, v.34, n. 7, p. 1277- 1283, jul. 1999.

Zuniga et al, 2011. **Avaliação da vida de prateleira de biscoito de castanha de caju tipo integral**. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v.13, n.3, p.251-256, 2011.



## AS LEISHMANIOSES NOS MUNICÍPIOS QUE COMPÕEM A SUPERINTÊNCIA REGIONAL DE SAÚDE DE DIAMANTINA – MG

### **Ana Flávia Barroso**

Enfermeira graduada no curso de Enfermagem da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina/MG.

### **Maria da Penha Rodrigues Firmes**

Professora do Departamento de Enfermagem da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina/MG.

### **Daisy de Rezende Figueiredo Fernandes**

Professora do Departamento de Enfermagem da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina/MG.

### **Carolina Di Pietro Carvalho**

Enfermeira graduada no curso de Enfermagem da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina/MG. Especialista em Políticas e Gestão da Saúde. Lotada no setor Epidemiologia – Superintendência Regional de Saúde – Diamantina - MG

**RESUMO: Introdução:** As Leishmanioses são um problema de saúde pública. São endemias em franca expansão geográfica. Inicialmente era predominante em ambientes rurais e periurbanos, agora encontram-se também em centros urbanos. O ambiente característico e propício à ocorrência da leishmaniose é aquele de baixo nível socioeconômico, pobreza, prevalente em grande medida no meio rural e na periferia das grandes cidades. A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA),

assim como a Leishmaniose visceral (LV), não são contagiosas. A LTA acomete pele e mucosas. Já a LV é uma doença crônica sistêmica caracterizada por febre de longa duração, perda de peso, astenia, adinamia e anemia, dentre outras manifestações, podendo evoluir para o óbito em 90% dos casos, quando não tratada. **Objetivos:** Traçar o perfil clínico/epidemiológico dos casos de Leishmanioses em municípios que fazem parte da jurisdição da Superintendência Regional de Saúde de Diamantina / MG. **Justificativa:** O Sistema de Informação de Agravos de Notificação (como base de dados) serve como um guia inicial, sendo imprescindível a realização de pesquisa de campo e acesso a outras bases de dados. Tratando-se de doenças negligenciáveis, faz-se necessário uma visão ampliada da saúde, para traçar o quadro da situação de cada região - o que poderá contribuir para maior visibilidade e possibilidades de políticas públicas efetivas. **Metodologia:** Trata-se de um estudo descritivo, com abordagem quantitativa e qualitativa. Realizado a partir de um estudo retrospectivo dos dados biológicos, sociodemográficos, epidemiológicos (indicadores epidemiológicos) - contidos em bancos de dados e registros em formulários do período de 2010 à 2016. Utilizou-se da análise de discurso para os depoimentos dos indivíduos que submeteram ao tratamento. **Resultados e Discussão:** Após a seleção dos

depoimentos, emergiram nove categorias com foco na perspectiva da assistência e tratamento prestados, bem como avaliação da organização dos serviços de saúde e necessidade de implementação das ações de vigilância e assistência em leishmanioses.

**Conclusão:** As condições de vida e trabalho dos indivíduos estudados influenciaram diretamente nos padrões da saúde e da doença. Faz-se necessário à implantação de programas de educação em saúde (a nível local, regional e municipal), capacitação dos profissionais de áreas afins para o registro correto das informações, realização de investigação, diagnóstico oportuno, tratamento adequado e criação de parcerias interinstitucionais que visem a implementação das ações de interesse sanitário.

**PALAVRAS-CHAVE:** Leishmaniose; Leishmaniose Cutânea; Leishmaniose Visceral.

**ABSTRACT: Introduction:** Leishmaniasis is a public health problem. Endemics are in geographic expansion. Initially it was predominant in rural and peri-urban environments, now they are also found in urban centers. The characteristic and propitious environment for the occurrence of leishmaniasis is that of low socioeconomic level, poverty, prevalent to a large extent in rural areas and on the outskirts of large cities. American Cutaneous Leishmaniasis, as well as visceral leishmaniasis, are not contagious. LTA affects skin and mucous membranes. Already LV is a chronic systemic disease characterized by long-term fever, weight loss, asthenia, adynamia and anemia, among other manifestations, and may evolve to death in 90% of cases when untreated. **Objectives:** To outline the clinical / epidemiological profile of Leishmaniasis cases in municipalities that belong to the jurisdiction of the Regional Health Superintendence of Diamantina / MG. **Rationale:** The Notification of Injury Information System (as database) serves as an initial guide, being essential to perform field research and access to other databases. In the case of negligible diseases, a broader view of health is needed to chart the situation of each region - which may contribute to greater visibility and possibilities of effective public policies. **Methodology:** This is a descriptive study, with a quantitative and qualitative approach. Based on a retrospective study of the biological, sociodemographic, epidemiological data (epidemiological indicators) - contained in databases and records in forms from the period 2010 to 2016. Discourse analysis was used for the testimonies of individuals who submitted to treatment. **Results and Discussion:** After the selection of the testimonies, nine categories emerged focusing on the perspective of care and treatment provided, as well as evaluation of the organization of health services and the need to implement surveillance and assistance actions in leishmaniasis. **Conclusion:** The living and working conditions of the individuals studied directly influenced health and disease patterns. It is necessary to implement health education programs (at local, regional and municipal levels), training professionals in related areas to correctly record information, carry out research, provide timely diagnosis, appropriate treatment, and create interinstitutional partnerships that implementation of actions of health interest.

**KEYWORDS:** Leishmaniasis; Cutaneous Leishmaniasis; Visceral Leishmaniasis.

## 1 | INTRODUÇÃO

As leishmanioses são consideradas primariamente como uma zoonose podendo acometer o homem quando este entra em contato com o ciclo de transmissão do parasito transformando-se em uma antroponose. Atualmente, encontra-se entre as seis endemias consideradas prioritárias no mundo (BRASIL, 2011 apud TDR/WHO).

Dessa forma, as Leishmanioses representam um complexo de doenças com diversidade epidemiológica e importante espectro clínico. A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) ou Úlcera de Bauru não é contagiosa e acomete pele e mucosas. Já a Leishmaniose Visceral (LV) ou Calazar, é uma doença crônica sistêmica não contagiosa caracterizada por febre de longa duração, perda de peso, astenia, adinamia e anemia, dentre outras manifestações - quando não tratada pode evoluir para óbito em mais de 90% dos casos.

Ambas são transmitidas pela picada do inseto flebótomo infectado pelo protozoário da *Leishmania* (gênero de protozoários da família Trypanosomatidae, que inclui os parasitas causadores das leishmanioses). Existem diferentes espécies do gênero *Leishmania*, que se encontram em diversos biomas acometendo diferentes animais e vetores de acordo com a região que se encontram. São espécies como por exemplo, a *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* e *Leishmania (Leishmania) infantum donovani* (americana) na Leishmaniose Visceral; e *Leishmania (Viannia) braziliensis* que é responsável pela forma cutânea mais destrutiva. Eles não são distinguíveis morfológicamente, mas diferem-se em algumas características (estruturas antigênicas, características bioquímicas, propriedades de crescimento, na especificidade parasita-hospedeiro, etc), sendo diferenciados através de testes bioquímicos e moleculares.

Sabe-se que no Brasil, o primeiro registro de caso da doença ocorreu em 1913, após análise de material de necropsia de paciente do estado do Mato Grosso. Desde então, a transmissão foi descrita em vários municípios de quase todas as regiões do país e apresentou mudanças importantes no padrão de transmissão nas últimas décadas. Aquela que inicialmente era predominante em ambientes rurais e periurbanos agora, também acontece em centros urbanos.

Segundo BRASIL (2006), as medidas utilizadas de controle da leishmaniose visceral são centradas e dirigidas verticalmente para o controle do reservatório canino (inquérito sorológico canino e eutanásia em cães sororreagentes), bem como para a aplicação de inseticidas, diagnóstico e tratamento adequado dos casos registrados - não demonstraram efetividade na redução de incidência da doença se realizadas de forma isolada. Faz-se necessário que o emprego de tais medidas seja realizado de forma integrada através da proposta de vigilância e adoção de medidas, baseada em uma melhor definição das áreas de transmissão ou de risco, onde o enfoque é incorporar os estados e municípios silenciosos (sem ocorrência de casos humanos ou caninos da doença) nas ações de vigilância da mesma, visando assim evitar ou minimizar os problemas referentes a este agravo em áreas sem transmissão. Já nas

áreas com transmissão , após estratificação epidemiológica, as medidas de controle serão distintas e adequadas para cada área a ser trabalhada.

As transformações no ambiente, provocadas pelo intenso processo migratório, por pressões econômicas ou sociais, a pauperização conseqüente de distorções na distribuição de renda, o processo de urbanização crescente, o esvaziamento rural e as secas periódicas acarretam a expansão das áreas endêmicas e o aparecimento de novos focos. Este fenômeno, leva a uma redução do espaço ecológico da doença, facilitando a ocorrência de epidemias (BRASIL, 2006).

O ambiente característico e propício à ocorrência da LV é aquele de baixo nível socioeconômico, pobreza, promiscuidade, prevalente em grande medida no meio rural e na periferia das grandes cidades. Entretanto, estas características vem se modificando, principalmente, nos estados das regiões Sudeste e Centro-Oeste, onde a leishmaniose se encontra urbanizada (BRASIL, 2006).

Devido especialmente a estas características pode ser considerada como uma endemia em franca expansão geográfica, de difícil controle, e portanto, um grande problema de saúde pública.

A Jurisdição da Superintendência Regional de Diamantina (SRDD) é responsável por 33 municípios mineiros. São eles: Alvorada de Minas, Araçuaí, Aricanduva, Berilo, Capelinha, Carbonita, Chapada do Norte, Coluna, Congonhas do Norte, Coronel Murta, Couto de Magalhães de Minas, Datas, Diamantina, Felício dos Santos, Francisco Badaró, Gouveia, Itamarandiba, Jenipapo de Minas, José Gonçalves de Minas, Leme do Prado, Materlândia, Minas Novas, Presidente Kubitschek, Rio Vermelho, Sabinópolis, Santo Antônio do Itambé, São Gonçalo do Rio Preto, Senador Modestino Gonçalves, Serra Azul de Minas, Serro, Turmalina, Veredinha, Virgem da Lapa.

## 2 | JUSTIFICATIVA

Foram analisados os dados sobre a LV e LTA no banco de dados de domínio público SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação). Dos 33 municípios sob jurisdição da SRSD foram constatados 344 casos notificados de LV e 615 casos notificados de LTA – no período de 2010 à 2016. No Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) ressalta-se a dificuldade relativa à qualidade dos dados - há o quantitativo dos casos, por sexo, idade, município, mas muitos campos são deixados em branco ou preenchidos como ignorado. Faltam informações como: indivíduo acometido, local de residência (urbana ou rural), ocorrência de complicações, condições sociais e ambientais, entre outros, há uma despersonalização do paciente, o que impossibilita o estudo dos determinantes sociais de saúde.

Notou-se a existência de municípios “silenciosos” para as Leishmanioses, ou seja, sem registro de casos há anos, apesar de serem fronteirços com outros que registram casos. Entende-se que para aprofundar na temática das Leishmanioses,

o SINAN (como base de dados) serve como um guia inicial, sendo imprescindível a realização de pesquisa de campo e acesso a outras bases de dados, pois, por se tratar de doenças negligenciáveis, faz-se necessário uma visão ampliada da saúde, para traçar o quadro da situação de cada região - o que contribuirá para maior visibilidade e possibilidades de políticas públicas efetivas.

### **3 | OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Traçar o perfil clínico-epidemiológico dos casos de Leishmanioses notificados nos anos de 2010 a 2016, referentes aos municípios da jurisdição da Superintendência Regional de Saúde de Diamantina – MG, que fazem parte do estudo.

#### **3.2 Objetivos específicos:**

- Descrever as características epidemiológicas predominantes da Leishmaniose LV e LTA nos municípios integrantes da SRS/Diamantina/MG .
- Evidenciar patologias diagnosticadas e associadas às leishmanioses na população pesquisada.
- Identificar e apresentar os depoimentos dos indivíduos que submeteram ao tratamento das leishmanioses.

### **4 | MATERIAIS E MÉTODOS**

Trata-se de um estudo descritivo, com abordagem quantitativa e qualitativa epidemiológica, realizado a partir de um estudo retrospectivo dos dados biológicos, sociodemográficos, epidemiológicos contidos em bancos de dados e registros em formulários do período de 2010 à 2016. Foram utilizados como base bibliográfica e coleta de dados: materiais impressos, manuais do Ministério da Saúde, documentos, protocolos, registros em formulários, notas técnicas, ficha A da ESF, que foram fornecidos pelo setor de Epidemiologia das Secretarias Municipais de Saúde, Estratégias da Saúde da Família e Superintendência Regional de Saúde de Diamantina – SRSD.

A fonte de dados públicos utilizado foi o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) do Ministério da Saúde referentes aos casos notificados de Leishmaniose visceral e Leishmaniose Tegumentar Americana dos municípios sob jurisdição da Superintendência Regional de Saúde de Diamantina/MG.

Segundo Minayo (2014), a pesquisa qualitativa torna-se importante para: (...) avaliação das políticas públicas e sociais, tanto do ponto de vista de sua formulação, aplicação técnica, como dos usuários a que se destina.

A análise dos dados quantitativos foi realizada por meio da estatística descritiva,

apresentando-os em forma de tabelas, quadros e gráficos, utilizando o Microsoft Excel, e/ou software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 24 e os qualitativos por meio de análise do discurso.

O cenário foram os municípios de Diamantina, Serro e Senador Modestino Gonçalves que fazem parte da SRSD, e aceitaram fazer parte do estudo.

Na primeira etapa realizou-se pesquisa através da revisão da literatura sobre a LV e LTA e seus pontos epidemiológicos. Foram consultados as bases de dados eletrônicas da MEDLINE, BIREME, SciELO e Manuais do Ministério da Saúde no período de agosto a dezembro de 2017.

Na segunda etapa foram preenchidos os questionários pelo pesquisador utilizando como fonte de pesquisa as informações fornecidas pelo setor de epidemiologia das prefeituras participantes e ESFs, o que caracterizou uma pesquisa de campo retrospectiva.

A população do estudo corresponde ao levantamento de dados parciais dos indivíduos notificados com Leishmanioses (no período de 2010 a 2016), nos municípios da SRSD. As investigações foram realizadas em cada Secretaria Municipal de Saúde e nas ESF's onde os indivíduos foram notificados.

A amostra qualitativa foi composta apenas por indivíduos que responderam ao convite para participar deste estudo, residentes no município de Serro que faz parte da jurisdição da SRSD. Os dados/ informações obtidos por meio da participação são confidenciais e sigilosos, não possibilitando a identificação do paciente. Para isso foi utilizado pseudônimos (nomes de plantas medicinais do cerrado) na coleta de dado. Houve o preenchimento do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

O critério de inclusão do estudo foram os pacientes com notificação confirmada por exame clínico ou laboratorial de LTA (leishmaniose tegumentar americana) ou LV (leishmaniose visceral) contidos nos bancos de dados das Secretarias Municipais de Saúde de Serro no período de 2010 a 2016 - que aceitaram participar, concordando e assinando o termo de consentimento livre e esclarecido; no caso de menores, os pais ou responsáveis legais cientes, assinaram o termo. Para participar do estudo o paciente deveria residir no município participante que é circunscrito na Superintendência Regional de Saúde de Diamantina - MG.

Os critérios de exclusão foram os indivíduos com suspeita de LTA e LV não confirmados por exame clínico ou laboratorial, pessoas com deficiência mental, pacientes que mesmo notificados não aceitaram participar da pesquisa, pacientes cujas notificações aconteceram fora do período estabelecido (2010 a 2016), menores sem autorização do responsável legal, e municípios onde a pesquisa não foi realizada por falta de recursos financeiros das pesquisadoras ou por omissão das secretarias em participar da pesquisa.

Os instrumentos de coleta de dados foram questionários semi estruturados com perguntas semiabertas e fechadas, baseado na ficha de investigação do SINAN. No processo de pesquisa houve a necessidade da elaboração de um questionário fechado

para captar aspectos considerados relevantes para esclarecer a compreensão do objeto, bem como estabelecer relações e generalizações, ressaltando a importância do uso de várias técnicas, desde que não haja oposição entre elas, também o princípio básico para elaboração de um questionário, que segundo Minayo (2014) é o mesmo que adotamos em relação a construção do objeto.

Neste sentido, Minayo (2014, p. 108 apud Honnigmann, 1954), oferece a seguinte classificação: “entrevista semi-estruturada que combina perguntas fechadas (ou estruturadas) e abertas, onde o entrevistado tem a possibilidade de discorrer o tema proposto, sem respostas ou condições prefixadas pelo pesquisador.” Através deste buscou-se levantar as seguintes variáveis: número de casos de LTA e LV, sexo, idade (variando as faixas etárias) escolaridade, dados socioeconômicos, habitação, aplicação do teste de intradermorreação de Montenegro, tipo da leishmaniose (cutâneo ou cutâneo-mucosa, visceral), tipo de domicílio (mata, canavial, bananal, lixo orgânico), presença dos flebotomíneos peridomiciliar ou domiciliar, presenças de hospedeiros, presença de cães com doença diagnosticada, tratamento com glucantime e efeitos colaterais (mal estar, cefaléia, arritmias cardíacas, aumento de enzimas hepáticas), tratamentos alternativos e efeitos colaterais (mal estar, cefaléia, arritmias cardíacas, aumento de enzimas hepáticas), tempo de tratamento e número de ampolas.

As entrevistas semi-estruturadas ou não-estruturadas com 8 questões norteadoras entre as quais incluiu-se a história de vida e foram baseadas ainda em Minayo (2014) quando diz que ambas podem ser feitas verbalmente ou por escrito, mas tradicionalmente incluem a presença ou interação direta entre o pesquisador e os autores sociais e são complementadas por uma prática de observação participante e que “a informação não estruturada persegue vários objetivos: (a) a descrição do caso individual; (b) a compreensão das especificidades culturais mais profundas dos grupos; (c) a comparabilidade de diversos casos”.

Como técnica de coleta de dados foram utilizados: o roteiro de entrevista com perguntas abertas e o roteiro de observação. O primeiro abordou questões do cotidiano em saúde o roteiro de entrevista é um instrumento para orientar uma “conversa com finalidade” que é a entrevista, ele deve ser o facilitador de abertura, de ampliação e de aprofundamento da discussão” (MINAYO, 2014).

Para complementar a busca das informações sobre a temática foi confeccionado um roteiro de observação livre para os registros dos diversos momentos e relações informais do pesquisador e dos participantes durante o trabalho de campo.

De acordo com Minayo apud Gold (2014, p. 142), essa técnica tem um papel complementar de estratégia de apreensão da realidade ou seja, uma atitude de observador científico consiste em colocar-se sob o ponto de vista do grupo pesquisado, com respeito, empatia e inserção o mais íntimo possível.

Outro instrumento utilizado foi o “diário de campo”, como forma de efetuar o registro de ocorrências durante a coleta dos dados que é um instrumento onde toda observação deve ser registrada. Segundo Minayo (2014), “desse caderno constam

todas as informações que não sejam os registros das entrevistas formais. Ou seja, observações sobre conversas informais, comportamentos, cerimoniais, festas, instituições, gestos, expressões que digam respeito ao tema da pesquisa. Falas, hábitos, usos, costumes celebrações (...).”

Para Minayo (2014, p. 212, apud Orlandi, 1987, p. 11-13), a análise de discurso, eleita para nortear o registro dessa pesquisa é definida como “uma proposta crítica que busca problematizar as formas de reflexão estabelecidas”.

Através do indicador epidemiológico (taxa de cura) buscamos os índices de efetividade do tratamento, e juntamente com as demais variáveis (sexo, idade, renda, taxa de incidência, taxa de prevalência, cura clínica ou óbito durante o tratamento), e com os depoimentos de indivíduos que submeteram ao tratamento, traçou-se um panorama parcial da assistência e tratamento prestados, bem como permitiu discussões sobre a organização dos serviços de saúde e a necessidade de implementação das ações de vigilância e assistência em leishmanioses. Intenta-se que medidas de controle sejam incorporadas e priorizadas para a doença nessas regiões, trazendo melhorias no manejo, tratamento e prevenção.

O estudo segue aos preceitos éticos para pesquisas envolvendo seres humanos na resolução 466/12 CNS, através da análise do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, sob o parecer nº 2.292.403, de 22 de setembro de 2017.

## 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo o IBGE (2010), o município de Diamantina possui uma população de 45.880 habitantes, em uma área territorial de 3.891,659 km<sup>2</sup>. O município do Serro possui uma população de 20.835 habitantes, em uma área territorial de 1.217,813 km<sup>2</sup>. Já a população de Senador Modestino Gonçalves é de 4.574 habitantes e a área territorial é de 952,055 km<sup>2</sup>. O bioma dos três municípios é composto por Cerrado e Mata Atlântica.

O Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) no município de Diamantina corresponde a 0,716 - o que caracteriza o município com desenvolvimento humano alto. Serro e Senador Modestino Gonçalves correspondem ao índice (respectivamente) de 0,656 e 0,620 - o que os caracterizam como municípios com desenvolvimento humano médio.

Com base nos dados do SINAN, foram 82 casos de Leishmaniose Tegumentar Americana (tabela 1), e 46 casos de Leishmaniose Visceral (tabela 2) notificados no septênio de 2010-2016 nos municípios de Diamantina, Senador Modestino Gonçalves e Serro.



Distribuição dos casos		Diamantina	Senador Modestino Gonçalves	Serro
Proporção (%) de casos por faixa etária (anos) 00 - 10 10 - 20 20 - 60 60 e mais		8,82	5	-
		14,71	30	-
		64,61	45	57,14
		11,76	20	42,86
Média de casos 2010-2016		5,66	3,33	4,66
Prevalência 2010-2016 /10000 habitantes		7,41	43,72	13,43
Evolução do tratamento Cura Abandono tratamento Óbito por LTA Óbito por outras causas Transferência Mudança Ignorado/branco				
		26	12	24
		-	1	1
		-	-	-
			-	-
		1	-	-
		6	7	3
	1	-	-	
<b>Total de casos</b>		<b>34</b>	<b>20</b>	<b>28</b>

Tabela 1 – Distribuição dos casos da Leishmaniose Tegumentar Americana- LTA por faixa etária, média, prevalência e evolução do tratamento nos municípios mineiros de Diamantina, Senador Modestino Gonçalves e Serro, 2010-2016.

Fonte: SINAN Net, 2017

A maioria dos casos notificados de leishmaniose tegumentar americana nos municípios de Diamantina, Senador Modestino Gonçalves e Serro durante o septênio ocorreram na faixa etária adulta, população em idade produtiva. No Serro houve significativa quantidade de casos notificados de idosos e em Senador Modestino Gonçalves de adolescentes. O município de Diamantina ficou em primeiro lugar na média dos casos notificados no período de 7 anos, seguido de Serro e Senador Modestino Gonçalves, apesar dos dados dos municípios apresentarem próximos. A maior prevalência de casos foi em Senador Modestino Gonçalves. O município que conseguiu atingir o maior índice de cura da leishmaniose tegumentar americana foi o Serro 85,71%, com 3,57% de abandono do tratamento e 10,71% de casos ignorados

ou em branco. Já o município de Diamantina atingiu 76,47% de cura e 17,65% dos casos ignorados ou em branco. Enquanto que o município de Senador Modestino Gonçalves chegou a cura de 60% dos pacientes de Leishmaniose tegumentar americana, houve uma taxa de abandono de 5% e 35% de casos ignorados ou em branco. Ressalta-se que os dados provenientes do SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) podem haver inconsistências devido a duplicidade de registro, informações digitadas incompletas, investigações não realizadas (ignoradas ou em branco), entre outras situações, que foram identificadas durante o estudo.

Distribuição dos casos		Diamantina	Senador Modestino Gonçalves	Serro
Proporção (%) de casos por faixa etária (anos)				
00 - 10		25,81	-	20
10 - 20		3,23	-	30
20 - 60		51,61	60	40
60 e mais		19,35	40	10
Média de casos 2010-2016		4,42	0,71	1,42
Prevalência 2010-2016 / 10 000 habitantes		6,75	10,93	4,79
Evolução do tratamento				
Cura		8	1	9
Abandono tratamento		-	1	-
Óbito por LV		3	-	-
Óbito por outras causas		-	1	-
Transferência		1	1	-
Ignorado/branco		19	1	1
Total de Casos		31	5	10

Tabela 2 – A Situação da Leishmaniose Visceral nos municípios de Diamantina, Senador Modestino Gonçalves, Serro – Minas Gerais – Período 2010/2016.

Fonte: SINAN Net, 2017

Nos três municípios, a faixa etária dos adultos constituíram o grupo mais representativo dos casos. Os idosos acometidos foram bem representativos no município do Senador Modestino Gonçalves e destaca-se no Serro o acometimento da faixa etária dos adolescentes.

Para o septênio o município de Diamantina apresentou média de casos seis vezes maior em relação a Senador Modestino Gonçalves e três vezes maior em relação ao Serro. A ausência de 61,2% dos casos (casos ignorados ou em branco) comprometeram os dados relativos à evolução da doença no município de Diamantina. Vale destacar que, no município de Diamantina houve três óbitos notificados em decorrência da Leishmaniose Visceral, possuindo uma taxa de letalidade de 9,68% e que nos demais municípios não houve notificação de óbitos por Leishmaniose Visceral. O fato de não haver notificação de óbitos não significa que não há letalidade da doença no município, pois muitas vezes ocorre o óbito sem que o diagnóstico seja estabelecido (devido as dificuldades no diagnóstico, e a semelhança com outras patologias).

O município do Serro obteve a maior taxa de cura onde 90% dos pacientes tiveram cura clínica e somente um caso (equivalente a 10% dos casos) consta como ignorado ou branco no sistema. Já Senador Modestino Gonçalves obteve 20% de cura clínica, uma transferência (20%), e um caso (20%) ignorado ou em branco.

Na leishmaniose visceral todos casos suspeitos são de notificação compulsória no SINAN, posteriormente há uma investigação e os casos são confirmados ou descartados. Durante a pesquisa de campo no município do Serro, realizada no Setor Municipal de Epidemiologia, dos dez casos notificados no septênio, constatou-se somente três confirmados, e com cura clínica. Mais uma vez sugere-se que somente as informações disponíveis no domínio público do SINAN não são capazes de delimitar e nem sempre correspondem a verdadeira situação epidemiológica dos municípios.

As entrevistas foram realizadas no município de Serro/MG. Responderam ao convite de participação no estudo 10 pessoas notificadas com Leishmaniose tegumentar americana no período de 2010 a 2016. Dos entrevistados, seis indivíduos são residentes na zona urbana, o equivalente a 60% dos mesmos e quatro na zona rural, sendo assim 40% dos entrevistados. Foram entrevistados seis homens (60%) e quatro mulheres (40%). A idade variou entre 28 e 77 anos. Todos informaram ser da religião católica. Quanto à cor/raça se autodeclararam: seis (60%) como parda/mulata/morena/cabocla; três (30%) como preta e um (10%) como branca. No que diz respeito à escolaridade: sete (70%) indivíduos com Ensino Fundamental Incompleto; um (10%) com Ensino Fundamental Completo e dois (20%) com Ensino Médio Completo. Em relação à situação ocupacional: quatro (40%) são aposentados como agricultores; três (30%) trabalham na agricultura; um (10%) é do Lar (sem remuneração); um (10%) trabalha como caixa de restaurante e um (10%) é Agente Comunitário de Saúde. Nota-se que 70% dos entrevistados possuem relações laborais com a agricultura. Em relação à renda familiar pode-se dizer que uma família, o que corresponde a 10% da amostra, vive com menos de 1 salário mínimo e nove (90%) famílias vivem com a

renda de 1 a 2 salários mínimos. Todas as casas dos participantes da entrevista são de alvenaria.

Nas entrevistas, evidenciou: bananal próximo a 90% dos domicílios pesquisados; 80% possuem mata próxima; em 80% há presença de lixo orgânico e 40% possuem canal próximo. Relatam que já foram encontrados flebótomeos em ambiente peridomiciliar ou domiciliar (mosquito palha, birigui) 50% dos entrevistados e 90% relatam presença de hospedeiros próximos ao domicílio (como gambás, lobos, entre outros).

A respeito das perspectivas dos pacientes do município do Serro/MG, sobre a leishmaniose tegumentar americana e seu tratamento, após a análise qualitativa, emergiram dos depoimentos nove categorias: causas externas, reações fisiológicas, dor e sofrimento, tratamento alternativo, cuidados com a lesão, desafios do diagnóstico, medicamentos e suas reações, reinfecção, doenças associadas, que traduzem a experiência vivencial dos entrevistados diante da patologia.

Os relatos demonstraram o não conhecimento dos pacientes a respeito do mecanismo de contágio da leishmaniose tegumentar, relacionam os sintomas da doença a causas externas e não à picada do flebótomo infectado. Descrevem as diversas reações fisiológicas na pele devido a infecção pelo protozoário da leishmania, como feridas, bolhas, entre outros. A lesão causada pela leishmaniose tegumentar americana aparece causando impactos importantes para os entrevistados, como: dor, sofrimento, incapacidade, perda da autoestima, isolamento social, gastos financeiros, afastamento do trabalho e alterações psicossociais.

A úlcera típica de leishmaniose cutânea (LC) e geralmente indolor e costuma localizar-se em áreas expostas da pele; (...) A infecção bacteriana, quando associada, pode causar dor local e produzir exsudato seropurulento que, ao dessecar-se em crostas, recobre total ou parcialmente o fundo da úlcera. Adicionalmente, a infecção secundária e o uso de produtos tópicos podem causar eczema na pele ao redor da úlcera, modificando seu aspecto. (BRASIL, 2017, p. 42)

É angustiante a demora na cicatrização, a dor, a necessidade de cuidados, e as mudanças no cotidiano do indivíduo, o que os leva a busca de tratamentos alternativos: espirituais (benzedeiras, raizeiros, curadores, entre outros) e o uso de fitoterápicos da cultura local.

A grande problemática está em oferecer saúde integral combinada com a manutenção das crenças e tradições destes grupos. Cabe aqui ressaltar que, muitos povos quilombolas, ainda se utilizam de práticas alternativas e do uso de plantas consideradas por eles como medicinais (FREITAS *et al*, 2011 *apud* OLIVEIRA, 2004; KAPLAN, 2003).

As atitudes de enfrentamento da doença variam de pessoa para pessoa, Cada indivíduo é detentor de conhecimentos e de percepções determinadas pelo contexto cultural que está inserido. No que refere-se aos cuidados com a saúde não é só o

saber profissional que está envolvido. Há outros saberes como da própria pessoa com leishmaniose, de seus familiares, vizinhos e amigos, o que exige um conhecimento popular por parte dos profissionais da saúde.

A modernidade exige do profissional de saúde saber investigar a forma como a comunidade constrói suas representações de mundo, as quais interferem diretamente nas práticas relacionadas à saúde que, por sua vez, ou reafirmam as representações ou as transformam. A forma com que as pessoas produzem práticas relacionadas à saúde está diretamente ligada a seu cotidiano e às relações que constroem entre si e com o ambiente que as cerca. O conhecimento e o respeito às noções de saúde que cada comunidade possui são necessários, uma vez que muitas vezes estas não concordam com os paradigmas da medicina ocidental, mas regem a vida das comunidades e possuem sua própria eficácia. Ao agir com esta consciência, a nação verá de fato o controle social do SUS e, conseqüentemente, um melhor resultado em suas abordagens do aspecto inclusivo. (FREITAS, *et al*, 2011; *apud* CARDOSO, 2010; NARVAI, 2006; KAPLAN, 2003; RODRIGUES & CARLINI, 2004; FALCÃO, 2012).

Por isso, torna-se um desafio aos profissionais de saúde cuidar das pessoas devido a complexidade e influência socioeconômica. É necessária a construção de um vínculo do profissional com o indivíduo e sua família, favorecendo a troca de conhecimentos e aproximando os saberes. A valorização do contexto social e emocional, o ato de ouvir suas queixas, medos, e inseguranças – constituem mecanismos fundamentais do cuidado. É importante ao enfermeiro conhecer a realidade do indivíduo que cuida - conhecer seus valores e costumes, suas crenças e seus conhecimentos - a partir disso ele poderá realizar o planejamento de cuidados de forma singular, com mais efetividade.

Sobre os cuidados com a lesão fica evidenciado que, os pacientes possuem dificuldades em seguir as orientações de saúde dos profissionais que os assistem. A troca dos curativos não é algo fácil para a pessoa acometida e nem a seus familiares. Muitas vezes as condições financeiras dificultam à adesão ao tratamento e há resistência na incorporação no cotidiano de hábitos de vida saudáveis, tais como: alimentação equilibrada e saudável, horário das medicações, cuidados de higiene, repouso e lazer, dentre outros, devido aos hábitos culturais.

Evidenciou dificuldades de diagnóstico, pelo fato de outras doenças possuírem sinais e sintomas parecidos. Dois dos entrevistados relataram que receberam o diagnóstico de leishmaniose, fizeram o tratamento, e no entanto só conseguiram a cura da lesão após receberem o diagnóstico e tratamento para úlcera venosa. Durante a determinação de diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana é necessário a realização de exames clínicos e laboratoriais aprofundados que possibilitem a um médico confirmar qual é a condição que está afetando seu paciente e, a partir daí, definir o tratamento mais adequado para ele. Mediante certo conjunto de sintomas, o médico pode referir a um diagnóstico diferente do habitual ou usual, isto é, a determinação de uma doença diversa daquela que normalmente é encontrada mediante certo conjunto de sintomas.

A confirmação laboratorial da LTA é realizada por métodos parasitológicos, sendo este fundamental, tendo em vista o número de doenças que fazem diagnóstico diferencial com a LTA. O diagnóstico de certeza de um processo infeccioso é feito pelo encontro do parasito, ou de seus produtos, nos tecidos ou fluidos biológicos dos hospedeiros. Portanto, recomenda-se a confirmação do diagnóstico por método parasitológico antes do início do tratamento, especialmente naqueles casos com evolução clínica fora do habitual e/ou má resposta a tratamento anterior (BRASIL, 2017, p. 66)

Dos indivíduos entrevistados, dois relataram efeitos adversos; sendo que um deles teve sua medicação modificada devido o quadro de toxicidade apresentado. Contudo é imprescindível seguir as recomendações e os cuidados com os grupos específicos, aos quais os antimoniais são contraindicados por representarem riscos.

Houve um relato de reinfecção, onde o mesmo individuo foi notificado três vezes, em períodos espaçados durante o período estudado (2010 a 2016). O que sugere uma falha terapêutica ou nova infecção. Pelo tempo constatado de uma infecção para outra ela não se enquadrava como recidiva pelo Ministério da Saúde. Para ser considerado como recidiva deve haver um espaço de tempo de menos de um ano, entre a cura clínica e o aparecimento de novos sintomas.

No que diz respeito a doenças associadas, foram entrevistados pacientes com diabetes, hipertensão, problemas circulatórios e cardíacos. Sendo que, um dos entrevistados é portador de Doença de Chagas. Por conseguinte é de extrema importância o conhecimento do profissional de saúde acerca das doenças existentes, pois pode ajudar a elucidar no fechamento de um diagnóstico correto - descartando ou não os diagnósticos diferenciais, além de contribuir para o tratamento, através do uso da medicação indicada a cada especificidade apresentada e para evitar interações medicamentosas.

Segundo BRASIL (2017), em determinadas situações, o esquema terapêutico indicado deve levar em consideração o estado clínico do paciente e comorbidades existentes, com o intuito de reduzir ao máximo a toxicidade dos medicamentos utilizados no tratamento, sendo que, os pacientes que não se enquadram em situações especiais deverão ser encaminhados para tratamento no centro de referência.

## 6 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os casos de leishmaniose vêm expandindo em todo território nacional, não havendo investimentos necessários no que tange a pesquisa científica e ações que promovam a erradicação da patologia – o que alerta para o perigo do desencadeamento de epidemias em larga escala.

O conceito de saúde retrata a conjuntura social, econômica, política e cultural. Sendo assim, não possui o mesmo sentido para todas as pessoas. Tal conceito sofre influência da época, do lugar, da classe social e está intimamente ligado aos

valores individuais como concepções científicas, religiosas e filosóficas. Nota-se que as condições de vida e trabalho dos indivíduos estudados influenciaram diretamente nos padrões da saúde e da doença; ou seja, os quadros de agravos referentes às leishmanioses atingiram em maior quantidade e frequência as populações socialmente marginalizadas, populações essas predominantemente negras, pobres, com baixa escolaridade, com dificuldade de acesso aos serviços de saúde e sem saneamento ambiental.

É imprescindível a implantação de programas de educação em saúde (a nível local, regional e municipal), a capacitação dos profissionais de áreas afins para o registro correto das informações, realização de investigação, diagnóstico oportuno, tratamento adequado e criação de parcerias interinstitucionais que visem a implementação das ações de interesse sanitário.

## REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica.** – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Leishmaniose visceral : recomendações clínicas para redução da letalidade / Ministério da Saúde.** Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília : Ministério da Saúde, 2011. 78 p. : il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos)

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar** [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretária de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2017. 189 p. : il.

BRASIL. **SINAN. Ministério da Saúde/ SVS– Sistema de Informação de Agravos de Notificação.** 2015. Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203&id=29878153>. Acesso: 05 de Outubro de 2016.

FREITAS, Daniel Antunes; CABALLERO, Antonio Diaz; MARQUES, Amaro Sérgio; HERNÁNDEZ, Clara Inés Vergara; ANTUNES, Stéffany Lara Nunes Oliveira. **Saúde e comunidades quilombolas: uma revisão da literatura.** Rev. CEFAC. 2011 Set-Out; 13(5):937-943.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **IBGE Cidades.** 2010. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/painel/populacao.php?lang=&codmun=316710&search=minas-geraisserrolinfogr%E1ficos:-evolu%E7%E3o-populacional-e-pir%E2mide-et%E1ria>. Acesso em: 11 de Janeiro de 2018.

MINAYO, Maria Cecília de Souza. **O desafio do conhecimento: Pesquisa Qualitativa em Saúde.** 14. ed. – São Paulo: Hucitec; Rio de Janeiro: Abrasco, 2014.

## AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS OBTIDOS DAS FRUTAS *Theobroma grandiflorum* E *Mauritia flexuosa*

### **George Barros Chaves**

Universidade CEUMA, Curso de Nutrição, São Luís – Maranhão.

### **Gabrielle Damasceno Evangelista Costa**

Universidade CEUMA, Curso de Nutrição, São Luís – Maranhão.

### **Maria Clara Caldas Costa**

Universidade CEUMA, Curso de Nutrição, São Luís – Maranhão.

### **Yasmim Costa Mendes**

Universidade CEUMA, Curso de Nutrição, São Luís – Maranhão.

### **Gabrielle Pereira Mesquita**

Universidade CEUMA, Curso de Nutrição, São Luís – Maranhão.

### **Lívia Muritiba Pereira de Lima Coimbra**

Universidade CEUMA, Curso de Nutrição, São Luís – Maranhão.

### **Luís Cláudio Nascimento da Silva**

Universidade CEUMA, Curso de Biomedicina e Programa de Pós Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia (REDE BIONORTE), São Luís – Maranhão.

### **Adrielle Zagnignan**

Universidade CEUMA, Curso de Nutrição e Programa de Pós Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia (REDE BIONORTE), São Luís – Maranhão.

**RESUMO:** O cenário das epidemias causadas pelas doenças transmitidas por alimentos e

aumento de doenças crônicas faz necessárias investigações a respeito de novas substâncias com propriedades antimicrobianas e antioxidantes. O objetivo do estudo foi avaliar as atividades antimicrobiana, antioxidante, citotóxica e mutagênica de extratos obtidos das frutas *Theobroma grandiflorum* (cupuaçu) e *Mauritia flexuosa* (buriti). Foi realizado um estudo experimental, no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia e Imunologia na Universidade Ceuma. As frutas foram coletadas em Fevereiro de 2017, passando pelo processo de extração da polpa e preparo das frações Hexânica, Clorofórmica, Acetato de Etila e Metanólica para realização dos ensaios de concentração inibitória mínima com as cepas *Salmonellas* ATCC 14028 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, além dos ensaios DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo; Sigma-Aldrich), hemólise e mutagenicidade. Nos ensaios de capacidade inibitória mínima os extratos não apresentaram ações antimicrobianas, no ensaio DPPH, as frações acetato de etila e metanólica do cupuaçu mostraram atividade antioxidante de 60%, enquanto que o buriti nas mesmas frações apresentou 45% e 50% respectivamente, sem grandes consequências lesivas às hemácias. As frações testadas para os diferentes extratos a 100 mg/mL não apresentaram ação mutagênica. Nos ensaios de capacidade inibitória mínima os extratos



não apresentaram ações antimicrobianas, o extrato de cupuaçu apresentou melhor atividade antioxidante em relação ao extrato do buriti, no entanto a realização de mais testes são necessários para garantir melhor aplicabilidade das frutas do cerrado maranhense como recurso bioativo.

**PALAVRAS-CHAVE:** Frutas. Perfil antimicrobiano. Antioxidante.

**ABSTRACT:** The scenario of epidemics caused by food-borne diseases and the increase of chronic diseases makes necessary investigations into new substances with antimicrobial and antioxidant properties. To evaluate the antimicrobial, antioxidant, cytotoxic and mutagenic activities of extracts obtained from fruits *Theobroma grandiflorum* (cupuaçu) and *Mauritia flexuosa* (buriti). An experimental study was carried out at the Microbiology and Immunology Research Laboratory at the Ceuma University. The fruits were collected in February 2017, undergoing pulp extraction and preparation of the Hexanic, Chloroform, Ethyl Acetate and Methanolic fractions to perform the minimum inhibitory concentration assays with *Salmonella* strains ATCC 14028 and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, in addition of the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; Sigma-Aldrich) assays, hemolysis and mutagenicity. In the minimum inhibitory capacity assays the extracts did not present antimicrobial actions, in the DPPH assay, ethyl acetate and methanolic cupuaçu fractions showed antioxidant activity of 60%, while the buriti in the same fractions showed 45% and 50%, respectively, without great consequences detrimental to red blood cells. The fractions tested for the different extracts at 100 mg / mL showed no mutagenic action. In the tests of minimum inhibitory capacity the extracts did not present antimicrobial actions, the cupuaçu extract presented better antioxidant activity in relation to the buriti extract, however, more tests are necessary to guarantee better applicability of the fruits of the Maranhão savannah as a resource bio-active.

**KEYWORDS:** Fruits. Antimicrobial profile. antioxidant.

## 1 | INTRODUÇÃO

As doenças transmitidas por alimentos (DTAs) resultam do consumo de alimentos ou bebidas que estão contaminadas com matéria química, metais pesados, parasitas, fungos, vírus e bactérias (TEWARI, ABDULLAH, 2015). Segundo o Sistema de Informação de Agravos de Notificação, SINAN, o Brasil apresenta um quadro epidemiológico de DTAs de 9.719 casos de surtos, 192.803 casos de doentes e um número de 1.948.144 expostos entre os anos de 2000 a 2014 (BRASIL, 2014).

Apesar desse quadro epidemiológico, diferentes fatores e tendências contribuíram para melhora na qualidade dos serviços de saúde, como por exemplo, o desenvolvimento de tratamentos com antibióticos e o reforço da necessidade de treinar os manipuladores de alimentos sobre suas responsabilidades pela segurança alimentar (ROCHA, 2011).

Porém oferecer tratamento com antibióticos para prevenir infecções parece

tornar o intestino mais vulnerável a danos, um perigo desencadeado pela destruição da presença protetora de bactérias intestinais (MODI, COLLINS, RELMAN, 2014). Com base nessas informações se tem observado a procura por novas fontes de princípios ativos antimicrobianos, como por exemplo, as plantas medicinais por apresentarem potencial econômico e terapêutico vantajosos com possíveis menores efeitos colaterais, se comparados aos fármacos já existentes. (DE BRITO et al., 2010).

Estudos sobre as atividades antimicrobianas de extratos e óleos essenciais de plantas nativas têm sido relatados em muitos países, que possuem uma flora diversificada e uma rica tradição na utilização de plantas medicinais para uso como antibacteriano ou antifúngico (CARNEIRO, 2014).

Dentre os principais gêneros e espécies bacterianas relacionadas com infecções alimentares, estão o gênero *Salmonella* (MENIN et al., 2008). As salmoneloses caracterizam-se por sintomas que incluem diarreias, febre, dores abdominais e vômitos, que ocorrem em média de doze a trinta e seis horas após o consumo do alimento infectado (ALVES et al., 2009). Os alimentos mais suscetíveis à contaminação por *Salmonellas* são carnes bovinas, aves, suínos, ovos, leite e vegetais crus (SHINOHARA et al, 2008).

Outra espécie bastante relacionada com infecções alimentares é a *Staphylococcus aureus*, cuja importância na epidemiologia das doenças veiculadas por alimentos, decorre de sua alta prevalência e do risco de produção de toxinas causadoras de gastroenterites alimentares nos alimentos contaminados (DE SOUSA, 2016).

Contudo, a grande problemática na saúde pública é o aumento de doenças crônicas, como câncer, lesões hepáticas e doenças cardiovasculares. A oxidação induzida por espécies reativas de oxigênio pode resultar em desintegração da membrana celular, danos nas proteínas da membrana e mutação de DNA, que podem ainda iniciar e propagar o aumento dessas patologias (UDDIN, 2014).

Pesquisa em medicina preventiva mostrou a importância da nutrição funcional na redução do fator de risco dessas doenças crônicas. O sistema de defesa inato do corpo humano pode ser insuficiente para os danos causados pelo estresse oxidativo contínuo. Portanto, recentemente, houve um aumento de interesse em produtos naturais como antioxidantes, pois inibem as reações de radicais livres e protegem o corpo humano de várias doenças (MIDDHA, USHA, PANDE, 2013).

Com base no cenário das epidemias, causadas pelas doenças transmitidas por alimentos e aumento de doenças crônicas, se faz necessárias investigações a respeito de novas substâncias com propriedades antimicrobianas e antioxidantes, como óleos essenciais produzidos pelas plantas e frutas como uma consequência do metabolismo secundário, esses óleos parecem possuir potenciais viáveis de exploração (GRUMACH, 2014).

Porém estas investigações devem ser feitas de maneira responsável visto que a ideia de que “o ‘natural’ não faz mal” ainda se faz presente na população leiga, tais

crenças aliada ao não conhecimento real biológico das plantas e seus derivados, pode torná-las um perigo para a população que fazem seu uso como fonte de cuidados básicos à saúde, por esta razão, é de interesse avaliar o potencial mutagênico dos extratos de plantas e frutas, visto que tais mutações podem desencadear doenças graves (ESPANHA, 2014), assim como a atividade citotóxica (DE OLIVEIRA et al., 2015).

Pensar em propostas que atenuem esses dados tem sido relevante para todas as áreas das comunidades sociais, ao passo que garantem uma maior segurança alimentar, este, determinante de saúde pública (ALVES, JAIME, 2014).

Nesse sentido a pretensão desse artigo é investigar novas fontes de substâncias, com potenciais ações antimicrobiano e antioxidante, que possam ser de fácil acesso nas regiões do Maranhão, através de extratos de frutas endêmicas do estado, como a *Mauritia flexuosa* (buriti) e a *Theobroma grandiflorum* (cupuaçu), além de verificar a atividade mutagênica e citotóxica.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um estudo experimental no Laboratório de Imunologia e Microbiologia das Infecções Respiratórias na Universidade CEUMA entre o período de abril a setembro de 2017.

As frutas avaliadas foram o *Theobroma grandiflorum* (cupuaçu) e *Mauritia flexuosa* (buriti). Estas foram coletadas, em Fevereiro de 2017 e levadas ao laboratório para a extração de suas polpas e devidos preparo para os testes realizados.

As frutas colhidas foram armazenadas a -20°C até atingirem a quantidade suficiente para extração da polpa. Posteriormente houve a lavagem em água corrente e sanitização com solução de hipoclorito de sódio a 50 mg/L por 15 minutos. Após sanitização, as sementes foram removidas manualmente, e a polpa separada e homogeneizada em multiprocessador doméstico e congelada a -20°C.

As polpas já extraídas e sanitizadas foram coadas em água destilada (100 mL) através do filtro de papel Whatman nº 1. A solução foi levada a capela de exaustão e misturada em um funil de decantação com as frações químicas hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol. Com a decantação das frações, as mesmas foram despejadas em potes de coletas com seus respectivos pesos anotados, logo em seguida foram deixadas à capela de exaustão por 24 h para a secagem da solução.

Após a secagem das soluções houve uma nova pesagem dos potes para que posteriormente houvesse a mistura com *phosphate buffered saline* (PBS) deixando os extratos do buriti e cupuaçu numa concentração de 100 mg/mL.

A atividade antimicrobiana dos extratos foi avaliada através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) pelo método de micro-diluição como descrito em (DE OLIVEIRA et al., 2012). Os testes

foram realizados com as espécies *Salmonellas ssp* ATCC14028 e *Staphylococcus aureus* ATCC6538.

Para o ensaio DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo; Sigma-Aldrich) a atividade sequestradora de radicais livres dos extratos/frações foi medida usando o radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo; Sigma-Aldrich). Uma alíquota de 250 µL de solução de DPPH (1 mm) foi misturada com 40 µL de diferentes concentrações da amostra (1 – 160 µg/ml). Trinta minutos mais tarde, a absorvância foi medida no espectrofotômetro a 517 nm. O trolox foi utilizado como o composto de referência. A atividade sequestradora de radicais livres foi calculada usando a seguinte fórmula: [DPPH] (%) = (Ac - As) / Ac × 100. Onde: Ac = controle de absorção; As = Absorvância da Amostra.

Para o ensaio hemolítico o sangue heparinizado foi obtido por punção de voluntários saudáveis (doadores não-fumantes que não tomaram nenhum medicamento pelo menos 15 dias antes da amostragem, com idade entre 18 e 35 anos.

Os eritrócitos humanos foram imediatamente obtidos por centrifugação a 1500 rpm durante 10 min e após remoção do plasma, os eritrócitos foram lavados três vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,4). Após a lavagem, preparou-se uma suspensão de 1% de glóbulos vermelhos em PBS.

A atividade hemolítica das diferentes frações de extratos da polpa das frutas de Buriti e Cupuaçu nas concentrações 500µg, 250µg, 125µg, 62,5µg e 31,25µg foram testadas em condições *in vitro* com eritrócitos. Os tubos foram incubados com 500 µL da solução de glóbulos vermelhos e 500 µL de todas as frações de extrato. O controle negativo foi realizado com PBS e 0,05% de Triton X-100 foi usado como controle positivo.

Após incubação durante 60 minutos à temperatura ambiente, as células foram centrifugadas e o sobrenadante foi utilizado para medir a absorvância (leitura 540 nm) da hemoglobina liberada (DE OLIVEIRA et al., 2012). O valor médio foi calculado a partir de ensaios triplicados de três experiências independentes.

A atividade hemolítica relativa foi expressa em relação à de Triton X-100 e calculada pela seguinte fórmula (HASSAN et al, 2010): Atividade hemolítica relativa (%) = [(As - Ab). 100] / (Ac - Ab) Onde: Ab = absorvância de controle (vazio sem extrato), As = absorvância na presença do extrato, e Ac = absorvância na presença de Triton X-100.

Para o ensaio de recombinação mutagênica foi realizado usando a cepa *Escherichia coli* GM7330 com base na metodologia proposta por Zdraveski et al. (2000), com algumas modificações. Esta cepa possui o operon lac parcialmente deletado (lacMS286φ80dIIIacBK1), sendo portanto lac<sup>-</sup> (não metaboliza lactose). φ80dIIIacBK1 com uma pequena deleção na porção proximal do gene lacZ, enquanto o lacMS286 contém uma deleção distal. As deleções não se sobrepõem, e os revertentes Lac<sup>+</sup> (funcionais) somente ocorrem após um evento de recombinação.

Uma suspensão diluída (10<sup>-3</sup>) foi preparada a partir de culturas de *E. coli* GM7330 crescido em meio LB e 1 mL dessa suspensão foi incorporado em 25 mL de placas de

Ágar MacConkey (Difco, suplementadas com 1% de lactose). As placas foram secas, e os poços foram perfurados com um objeto cilíndrico estéril. Em seguida, adicionou-se aos poços 30  $\mu$ L dos extratos de Buriti e Cupuaçu (100 mg/mL). Como controle positivo foi utilizado Ciprofloxacina (1 mg/mL). As placas foram então incubadas a 37 ° C e após 48 h fotografadas.

As análises estatísticas, foram realizados por Regressão Linear Simples, foram adotadas o nível de significância de  $p < 0,05$  e nível de confiança de 95%. Todos os dados foram tabulados no programa EXCEL® 2010 e analisados no programa estatístico GraphPad Prism 6 software.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

As frações de buriti (*Mauritia flexuosa*) e cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) não mostraram ações inibitórias de crescimento das cepas de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 e *Staphylococcus aureus* ATCC6538, enquanto os controles positivos, com ciprofloxacina (10  $\mu$ g/ml), mostraram as ações esperadas de inibição.

O teste de DPPH com a *Mauritia flexuosa*, as concentrações em que houve maior ação antioxidante foram FAEB nas concentrações de 20, 40 e 80  $\mu$ g/mL com 35%, 40% e 45% respectivamente e na FMB, nas concentrações de 20, 40, 80  $\mu$ g/mL com taxas de atividade antioxidante 35%, 35% e 50% respectivamente, as demais frações e concentrações mantiveram-se a 20%. As frações FHB, FAEB e FMB foram dose dependente para ação antioxidante ( $p < 0,05$ ). O ácido gálico, também testado nas mesmas concentrações dos extratos, apresentou em sua maior concentração taxa de 75% e nas demais em torno de 65%.

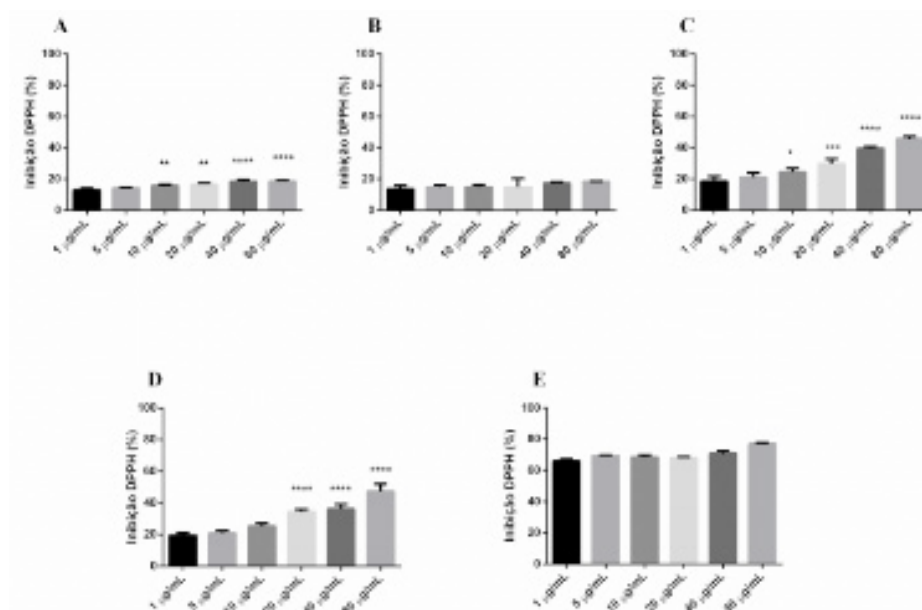


Figura 1: Atividade antioxidante do extrato e frações da polpa da fruta de *Mauritia flexuosa*, através da redução do radical DPPH. (A) Fração Hexânica, (B) Fração Clorofórmica, (C) Fração Acetato de Etila, (D) Fração Metanólica, (E) Ácido Gálico – Controle positivo. \*  $p < 0,1$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Teste ANOVA de comparação múltipla.

Neste ensaio o resultado pode ser expresso em IC50, que é a concentração necessária do antioxidante para reduzir em 50% o radical DPPH, sendo que quanto menor o IC50, maior a atividade antioxidante do material, a FCB mostrou-se com índice estatístico de 643,65 seguida da FHB com 561,44. Já a FAEB e a FMB apresentaram índices melhores que as frações anteriores com, 83,99 e 82,33, respectivamente.

Extrato da polpa de Buriti	IC50 ( $\mu\text{g/mL}$ )
Hexano	561,44
Clorofórmio	643,65
Acetato de Etila	83,99
Metanol	82,33

Tabela 1: Atividade antioxidante do extrato e frações da polpa da polpa da fruta de *Mauritia flexuosa* – Buriti.

A atividade de varredura do radical DPPH foi expressa como concentração onde ocorre 50% de inibição (IC 50  $\mu\text{g/mL}$ ).

Já com a *Theobroma grandiflorum* a FAEC apresentou em suas duas maiores concentração 80 e 40  $\mu\text{g/mL}$ , atividade antioxidante de 60% e na concentração 20  $\mu\text{g/mL}$ , 55%. A FMC nas concentrações de 80, 40 e 20  $\mu\text{g/mL}$  apresentou 60%, 45% e 40% respectivamente, as demais frações e concentrações mostraram-se em torno de 20%. As frações FHC, FAEC, FCC e FMC foram dose dependente para ação antioxidante ( $p < 0,05$ ). O ácido gálico apresentou atividade antioxidante de 70% em todas as concentrações.

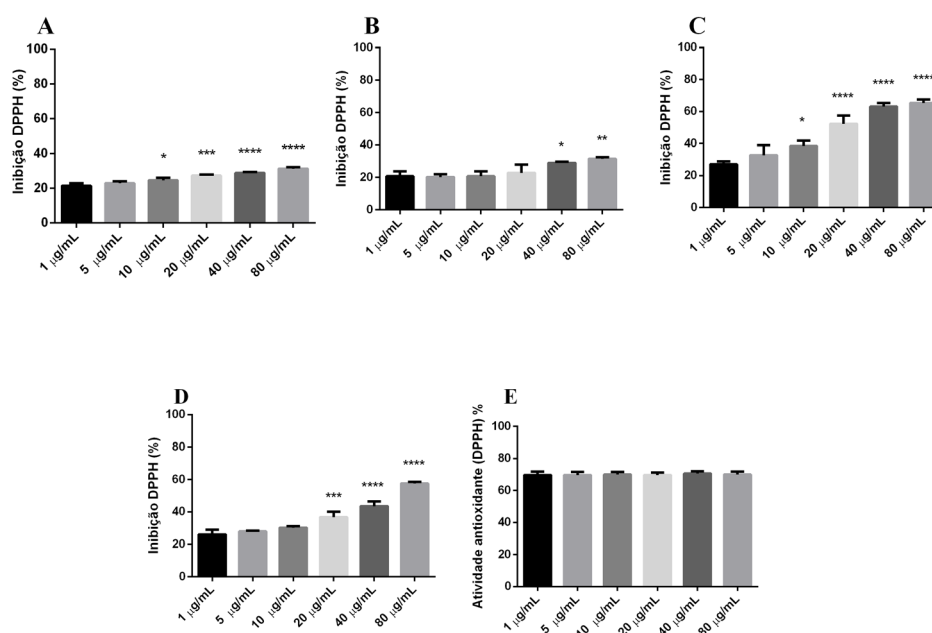


Figura 2: Atividade antioxidante do extrato e frações da polpa da fruta de *Theobroma grandiflorum*, através da redução do radical DPPH. (A) Fração Hexânica, (B) Fração Clorofórmica, (C) Fração Acetato de Etila, (D) Fração Metanólica, (E) Ácido Gálico – Controle positivo. \*  $p < 0,1$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Teste ANOVA de comparação múltipla.

No teste analítico deste ensaio a FAEC foi a que apresentou melhor índice significativo com 33,37 seguida da FMC com 58,71. Já as frações hexânicas e clorofórmicas do cupuaçu apresentaram valores estatísticos insignificantes de 230,99 e 191,87, respectivamente, de acordo com IC50.

Extrato da polpa de Cupuaçu	IC50 (ug/mL)
Hexano	230,99
Clorofórmio	191,87
Acetato de Etila	33,37
Metanol	58,71

Tabela 2: Atividade antioxidante do extrato e frações da polpa da polpa da fruta de *Theobroma grandiflorum* – Cupuaçu.

A atividade de varredura do radical DPPH foi expressa como concentração onde ocorre 50% de inibição (IC 50  $\mu\text{g/mL}$ ).

No teste de hemólise as frações FHB, FCB, FAEB e FMB apresentaram perfil hemolítico em suas maiores concentrações (500  $\mu\text{g/mL}$ ) taxas menores de 40%, 40%, 20% e 40% respectivamente. Na concentração de 250  $\mu\text{g/mL}$  a FHB apresentou 40%, a FCB (35%), FAEB (15%) e FMB (40%). Na concentração de 125  $\mu\text{g/mL}$  a FHB apresentou taxa de hemólise de 20% e as demais se mantiveram em torno de 10%, semelhante às outras concentrações de 62,5  $\mu\text{g/mL}$ , 31,25  $\mu\text{g/mL}$  e o controle negativo.

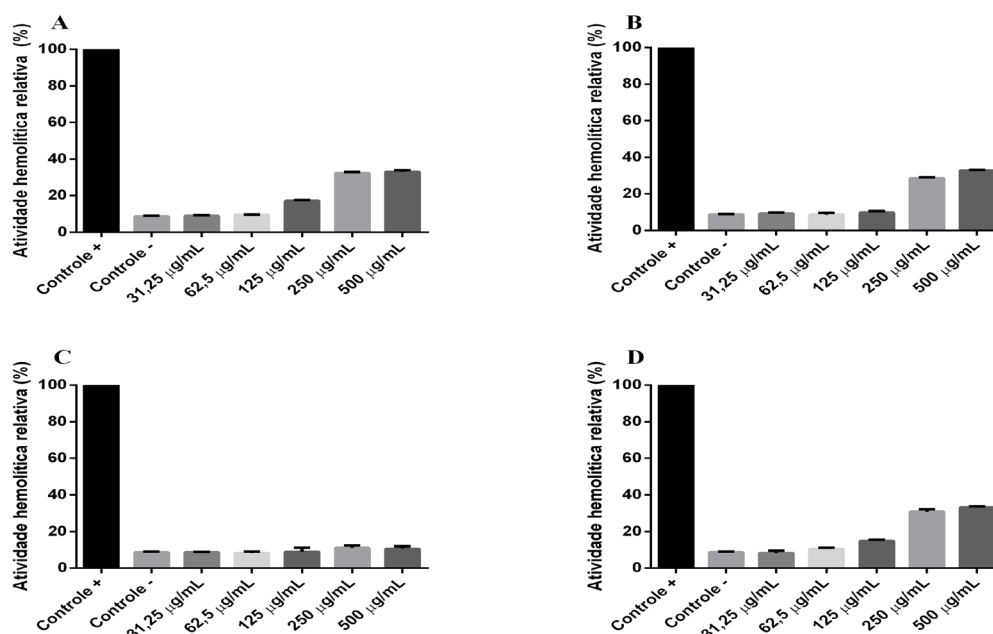


Figura 3: Atividade hemolítica do extrato e frações da polpa da fruta de *Mauritia flexuosa*, através do rompimento das células hemácias. (A) Fração Hexânica, (B) Fração Clorofórmica, (C) Fração Acetato de Etila, (D) Fração Metanólica.

Com os extratos do *Theobroma grandiflorum* nas FHC, FCC, FAEC, e FMC, as taxas de hemólise se apresentaram a 10% em todas as concentrações (31,25, 62,5, 125, 250, 500)  $\mu\text{g/mL}$  semelhantes ao controle negativo.

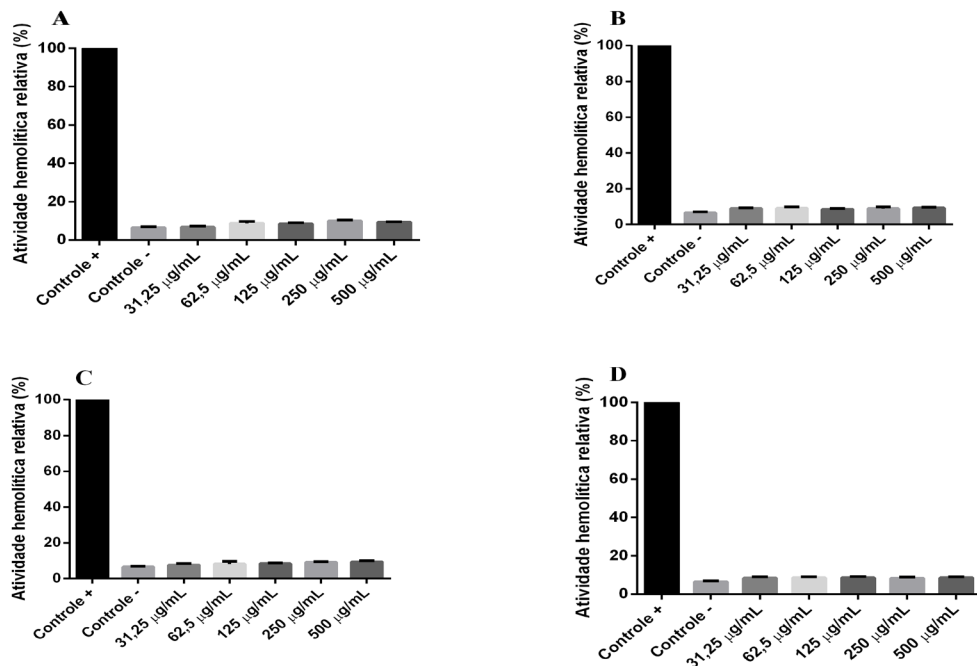


Figura 4: Atividade hemolítica do extrato e frações da polpa da fruta de *Theobroma grandiflorum*, através do rompimento das células hemácias. (A) Fração Hexânica, (B) Fração Clorofórmica, (C) Fração Acetato de Etila, (D) Fração Metanólica.

Ambos os extratos (2), *Mauritia flexuosa* (buriti), (FHB, FCB, FAEB, FMB) e *Theobroma grandiflorum* (cupuaçu), (FHC, FCC, FAEC, FMC) a 100 mg/mL não causaram mutações genéticas frente a cepas de *Escherichia coli* GM7330 incapaz de metabolizar lactose, enquanto o controle positivo (1), utilizado a Ciprofloxacina (1mg/mL) em um volume de 30µL por poço, parece ter causado alterações nos genes deletados lacZ e lacMS286. O controle negativo com o PBS seguiu sem alterações (3)

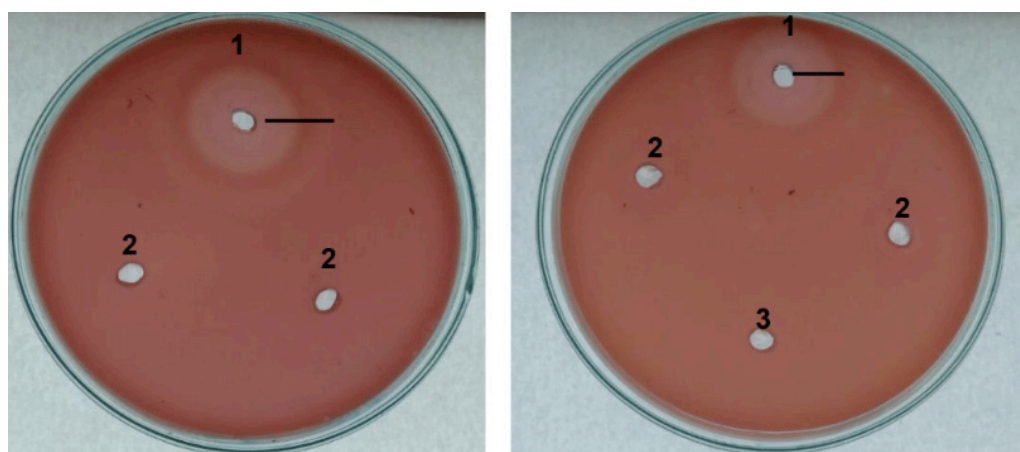


Figura 5: Atividade mutagênica dos extratos e frações das polpas das frutas *Mauritia flexuosa* e *Theobroma grandiflorum*. (1) Controle positivo – Ciprofloxacina, (2) Frações testadas, (3) controle negativo – PBS.

Nos ensaios realizados de capacidade inibitória mínima, os extratos não apresentaram ações antimicrobiana, o que se assemelha com estudos de De Oliveira et al (2016), que utilizou extratos da palmeira do buriti (*Mauritia flexuosa*). Porém nos



ensaios DPPH houve respostas antioxidantes significativas, além de ausência de lesão às hemácias e alterações genéticas, de acordo com ensaios de citotoxicidade e recombinação induzida.

O teste DPPH realizado para a verificação de emparelhamento de radicais livres, verificação da capacidade antioxidante, é considerado o método mais utilizado na comunidade científica por ser rápido, prático e com boa estabilidade. Porém devido aos diversos tipos de radicais e aos diferentes sítios de ação, dificilmente haverá um único método capaz de representar de forma segura e precisa a verdadeira atividade antioxidante de uma substância (SUCUPIRA, 2015).

Dentre todas as frações testadas, a fração acetato de etila do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) apresentou a melhor ação antioxidante, alcançando um percentual de 60% de eficiência em captar radical livre, bem próxima ao controle positivo ácido gálico (70%) que já apresenta perfil antioxidante bem fundamentado (PERAZZOLI et al, 2015). Esta ação antioxidante pode estar relacionada com os compostos fenólicos da fruta destacados pelo solvente acetato de etila (LORDÉLO et al., 2010).

Muitas plantas e derivados como frutos contêm quantidades substanciais de antioxidantes, incluindo Vitamina C e E, carotenóides, flavonóides, taninos e, portanto, podem ser utilizados para eliminar o excesso de radicais livres do corpo humano (UDDIN, 2014).

Essas informações foram reafirmadas por Basu, Maier (2016) ao dizer que os tecidos das plantas contêm diferentes antioxidantes, como flavonóides, taninos e precursores de lignina, que atuam como compostos de eliminação de agentes oxidantes. O mesmo ainda afirma que as bagas, frutas carnudas pequenas consumidas frescas ou processadas, são ricas em compostos fenólicos, como ácidos fenólicos, biocombustíveis e proantocianidinas (taninos condensados), ellagitanins e galotaninos (taninos hidrolizáveis) e flavonóides (flavonóis, flavanóis, antocianinas).

Embora os resultados não tenham se mostrado satisfatórios para a ação inibitória de *Salmonellas ssp* ATCC14028 e *Staphylococcus aureus* ATCC6538, a eficiência antioxidante se mostrou significativa, além disso os extratos também não hemolisaram as hemácias no ensaio citotóxico. A hemólise refere-se a um aumento da lise / destruição dos glóbulos vermelhos, resultando numa diminuição de eritrócitos em circulação, podendo levar à diminuição de oxigenação dos tecidos e aumento da produção de eritropoietinas pelo fígado (GARCIA, 2014).

O teste de DPPH Foi realizado com concentrações até seis vezes menores que as concentrações usadas no teste de hemólise. Portanto as dosagens que mostraram ação antioxidante eficiente parecem apresentar um perfil seguro em relação a não hemólise das hemácias.

Porém em termos de segurança há outros fatores que devem ser avaliados, visto que alguns compostos presentes nos alimentos ou substâncias naturais utilizadas pela população com potencial terapêutico podem induzir mutações do DNA, favorecendo o desenvolvimento de cânceres enquanto outras podem atenuar ou anular estes efeitos

(OLIVEIRA et al., 2014).

Dietas ricas em frutas e hortaliças parecem estar ligadas a baixas taxas de incidência de câncer, pois frutas e vegetais contêm componentes fenólicos, flavonóides, isoflavonas, terpenos, glicosinolatos, minerais e outros compostos que teriam função antioxidante e anticarcinogênica (CARNEIRO et al., 2018). Assim os efeitos dos extratos testados não apresentaram indução de mutagenicidade, garantindo a utilização de forma segura e eficaz destas frutas tanto na culinária como na estética.

#### 4 | CONCLUSÃO

O desenvolvimento deste estudo permitiu uma maior compreensão a respeito das propriedades funcionais dos frutos, *Mauritia flexuosa* (buriti) e da *Theobroma grandiflorum* (cupuaçu), populares na região maranhense, tais alimentos fazem parte do hábito alimentar local e parecem apresentar capacidades funcionais importantes.

Os extratos preparados com *Mauritia flexuosa* e a *Theobroma grandiflorum* não apresentaram ações antimicrobianas, porém obtiveram respostas antioxidantes significativas sem grandes consequências lesivas às hemácias, visto que as concentrações utilizadas no teste hemolítico foram até seis vezes maiores que nas concentrações para o teste DPPH.

No teste DPPH, o cupuaçu mostrou propriedades redutoras de radicais livres significativas, chegando a um percentual de 60% de ação antioxidante, bem próximo dos 70% do ácido gálico que foi o controle positivo, e mesmo o buriti tendo mostrado resultados inferiores, a sua capacidade antioxidante ficou em 50%.

Baseado nos resultados encontrados se faz necessário novos estudos com os extratos presentes neste, e com extratos derivados de polpas de frutos diferentes, típicas do Cerrado Maranhense, para a verificação do potencial antioxidante e anti-inflamatório *in vitro*; além de avaliar a ação dos melhores extratos sobre a microbiota intestinal; determinar o efeito dos extratos sobre a endotoxemia induzida por lipopolissacarídeos bacterianos (LPS). Assim, espera-se contribuir para o desenvolvimento desta região, pela valorização de suas frutas como fonte de bio-recursos.

#### REFERÊNCIAS

ALVES, Carlene de Fátima Moraes. Bactérias enteropatogênicas envolvidas em doenças transmitidas por alimento e diarreias agudas em Minas Gerais no período de 2006 a 2008. **Monografia (Especialização)-Universidade Federal de Minas Gerais, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Aplicada as Ciências da Saúde do Instituto de Ciências Biológicas, Belo Horizonte**, 2009.

ALVES, Kelly Poliany de Souza; JAIME, Patricia Constante. A Política Nacional de Alimentação e Nutrição e seu diálogo com a Política Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 19, p. 4331-4340, 2014.

BASU, Paramita; MAIER, Camelia. In vitro antioxidant activities and polyphenol contents of seven commercially available fruits. **Pharmacognosy research**, v. 8, n. 4, p. 258, 2016.

BRASIL, Ministério da saúde. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos-ve/dta. ministério da saúde - MS Secretaria de Vigilância em Saúde – SVS Departamento de Vigilância Epidemiológica - DEVIT Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis – CGDT. São Paulo, 07 de agosto de 2014.

CARNEIRO, C. C. et al. Mutagenicity and antimutagenicity of *Salacia crassifolia* (mart. Ex. Schult.) G. Don. evaluated by Ames test. **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, n. 2, p. 345-350, 2018.

CARNEIRO, Fernanda Melo et al. Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil. **Rev Sapiê: Soc Sab Prát Educ**, v. 3, n. 2, p. 44-75, 2014.

DE BRITO COSTA, Edja Maria Melo et al. Estudo in vitro da ação antimicrobiana de extratos de plantas contra *Enterococcus faecalis*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 3, p. 175-180, 2010.

DE OLIVEIRA MARREIRO, Raquel et al. Cytotoxicity evaluation of a mouthwash containing extract of *Libidibia ferrea*. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v. 14, n. Supl, p. 34-42, 2015.

DE OLIVEIRA, Adriana Idalina Torcato et al. Chemical composition and antimicrobial potential of palm leaf extracts from Babacu (*Attalea speciosa*), Buriti (*Mauritia flexuosa*), and Macauba (*Acrocomia aculeata*). **The Scientific World Journal**, v. 2016, 2016.

DE OLIVEIRA, Ygor Lucena Cabral et al. Antimicrobial activity and phytochemical screening of *Buchenavia tetraphylla* (Aubl.) RA Howard (Combretaceae: Combretoidae). **The Scientific World Journal**, v. 2012, 2012.

DE SOUSA, Daniele Martins et al. INFECÇÃO POR STAPHYLOCOCCUS AUREUS RESISTENTE EM UNIDADES DE TERAPIA INTENSIVA: REVISÃO INTEGRATIVA. **Journal of Nursing UFPE/ Revista de Enfermagem UFPE**, v. 10, n. 4, 2016.

ESPANHA, Livia Gregghi. Avaliação da mutagenicidade, antimutagenicidade e estrogenicidade de *Byrsonima* spp. 2014.

GARCIA, Margarida Augusta da Silva Palla. **Estado da arte dos métodos, in vivo e in vitro, de determinação da atividade hemolítica**. 2014. Tese de Doutorado.

GRUMACH, Anete Sevciovic; KIRSCHFINK, Michael. Are complement deficiencies really rare? Overview on prevalence, clinical importance and modern diagnostic approach. **Molecular immunology**, v. 61, n. 2, p. 110-117, 2014.

HASSAN, S. M. et al. Haemolytic and antimicrobial activities of saponin-rich extracts from guar meal. **Food Chemistry**, v. 119, n. 2, p. 600-605, 2010.

LORDÊLO CARDOSO SILVA, Marília et al. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, 2010.

MENIN, Álvaro et al. Agentes bacterianos enteropatogênicos em suínos de diferentes faixas etárias e perfil de resistência a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. **Ciência Rural**, v. 38, n. 6, 2008.

MIDDHA, Sushil Kumar; USHA, Talambedu; PANDE, Veena. HPLC evaluation of phenolic profile, nutritive content, and antioxidant capacity of extracts obtained from *Punica granatum* fruit peel. **Advances in pharmacological sciences**, v. 2013, 2013.

MODI, Sheetal R.; COLLINS, James J.; RELMAN, David A. Antibiotics and the gut microbiota. **The Journal of clinical investigation**, v. 124, n. 10, p. 4212-4218, 2014.

OLIVEIRA, Rodrigo Juliano et al. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE, MUTAGENICIDADE E ANTIMUTAGENICIDADE DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Gochnatia polymorpha*. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 9, n. 3, p. 101-106, 2014.

PERAZZOLI, Marlene Raimunda Andreolla et al. EFEITO PROTETOR DO ÁCIDO GÁLICO E DODECIL GALATO CONTRA O DANO HEPÁTICO INDUZIDO PELO TETRACLORETO DE CARBONO EM RATOS ALBINOS. In: **Anais eletrônicos do International Symposium on Science and Biotechnology**. p. 63-64, 2015.

ROCHA, Diego Pessoa et al. Coordenação de metais a antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana. **Quim. Nova**, v. 34, p. 111-118, 2011.

SHINOHARA, Neide Kazue Sakugawa et al. Salmonella spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, p. 1675-1683, 2008.

SUCUPIRA, Natália Rocha et al. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **Journal of Health Sciences**, v. 14, n. 4, 2015.

TEWARI, Anita; ABDULLAH, Swaid. Bacillus cereus food poisoning: international and Indian perspective. **Journal of food science and technology**, v. 52, n. 5, p. 2500-2511, 2015.

UDDIN, Riaz et al. HPLC-analysis of polyphenolic compounds in Gardenia jasminoides and determination of antioxidant activity by using free radical scavenging assays. **Advanced pharmaceutical bulletin**, v. 4, n. 3, p. 273, 2014.

ZDRAVESKI, Zoran Z. et al. Multiple pathways of recombination define cellular responses to cisplatin. **Chemistry & biology**, v. 7, n. 1, p. 39-50, 2000.

## AVALIAÇÃO DE DISTÚRBIOS PULMONARES E MUDANÇA NAS ATIDADES DIÁRIAS EM TRABALHADORES CANAVIEIROS EM RUBIATABA-GO

### **Menandes Alves de Souza Neto**

Laboratório de Bioquímica e Engenharia Genética  
Universidade Federal de Goiás, Instituto de  
Ciências Biológicas, Goiás, Brasil. Docente  
Faculdade Evangélica de Ceres, Ceres, Goiás,  
Brasil.

### **Jéssyca Rejane Ribeiro Vieira**

Discente Faculdade Evangélica de Ceres, Ceres,  
Goiás, Brasil.

### **Juliana Aparecida Correia Bento**

Laboratório de Aproveitamento de subprodutos  
agroindustriais. Universidade Federal de Goiás,  
Escola de Agronomia, Goiás, Brasil.

### **Suellen Marçal Nogueira**

Docente Faculdade Evangélica de Ceres, Ceres,  
Goiás, Brasil.

### **Luiz Artur Mendes Bataus**

Laboratório de Bioquímica e Engenharia Genética  
Universidade Federal de Goiás, Instituto de  
Ciências Biológicas, Goiás, Brasil.

### **Luciano Ribeiro Silva**

Docente Faculdade Evangélica de Ceres, Ceres,  
Goiás, Brasil.

**RESUMO: INTRODUÇÃO:** A população de trabalhadores canavieiros em Rubiataba-Go é apenas uma parte dos milhões de trabalhadores canavieiros que atuam em todo o país. Tal prática expõe muitos indivíduos a graves problemas respiratórios, nos quais resultam em redução da qualidade de vida e

exclusão social. **OBJETIVOS:** Este trabalho objetivou avaliar os padrões antropométricos, analisar o grau de dispneia e fadiga, avaliar as atividades diárias e relacioná-las com possíveis problemas respiratórios e promover uma análise das possíveis medidas de segurança que possam ser adotadas para minimizar os problemas respiratórios dos trabalhadores canavieiros. **METODOLOGIA:** Foi realizado um estudo transversal com 120 trabalhadores canavieiros em atividade no município de Rubiataba-Go no ano de 2015 a 2016. A coleta de dados foi executada através de entrevista do questionário PFSDQ-M (*Pulmonary Functional Status and Dyspnea Questionnaire – Modified*) que contem informações sobre graus de dispnéia, fadiga e mudanças nas atividades diárias. As medidas antropométricas foram realizadas pela utilização de fita métrica para obtenção de altura e circunferência e balança digital para obtenção do peso. **RESULTADOS E DISCUSSÕES:** Verificou-se que o grau de dispnéia dos trabalhadores elevou-se nos requisitos dispneia moderada, grave e muito grave. E o grau de fadiga dos canavieiros elevou-se nos requisitos cansaço moderado, grave e muito grave do ano de 2015 para o ano de 2016. A análise apresentou que 40% dos entrevistados relataram ter sofrido mudança extrema ao andar em plano inclinado e 34,2% mudança moderada ao tomar banho,

após submeterem-se ao trabalho canavieiro. Portanto, é relevante considerar que as mudanças nas atividades diárias dos trabalhadores canavieiros podem estar correlacionadas ao elevado índice de indivíduos em estado de “magreza” nutricional, além das péssimas condições de trabalho e ao fato de inalarem materiais particulados e poluentes gasosos que interferem em sua saúde respiratória. **CONCLUSÃO:** Constatou-se que as exposições dos trabalhadores canavieiros ao material particulado e a poluentes gasosos provindos da queima da palha da cana-de-açúcar evidenciam aos mesmos falta de ar e fadiga que acarretam mudanças nas atividades diárias como tomar banho, subir escadas e caminhar.

**PALAVRAS-CHAVE:** Queima da cana-de-açúcar. Saúde do trabalhador. PFSDQ-M.

**ABSTRACT: INTRODUCTION:** The population of sugarcane workers in Rubiataba-Go is just one of the millions of sugarcane workers who work across the country. This practice exposes many individuals with severe respiratory problems, in which result in reduced quality of life and social exclusion. **OBJECTIVES:** This study aimed to evaluate the anthropometric standards, analyze the degree of dyspnea and fatigue, assess daily activities and relate them to possible respiratory problems and promote an analysis of possible security measures that can be taken to minimize the breathing problems of workers sugarcane. **METHODS:** A cross-sectional study was conducted with 120 sugarcane workers active in Rubiataba-Go municipality in the year 2015 to 2016. The data collection was performed through interviews of PFSDQ-M (Pulmonary Functional Status and Dyspnea Questionnaire - Modified) which contains information on degree of dyspnea, fatigue and changes in daily activities. Anthropometric measurements were performed by the use of tape to obtain height and circumference and digital scales to obtain weight. **RESULTS AND DISCUSSION:** It has been found that the degree of dyspnea workers rose in moderate dyspnea requirements, severe and very severe. And the degree of fatigue of sugarcane raised on the requirements moderate fatigue, severe and very severe in the year 2015 to the year 2016. The analysis showed that 40% of respondents reported having experienced extreme change when walking on an incline and 34, 2% moderate change the bathing, after submitting to the sugarcane job. Therefore, it is important to consider that changes in daily activities of sugarcane workers can be correlated to the high rate of individuals in a state of “thinness” nutrition, in addition to poor working conditions and the fact that inhaling particulate matter and gaseous pollutants that interfere with their respiratory health. **CONCLUSION:** It was found that exposures of sugarcane workers to particulate matter and stemmed gaseous pollutants from burning straw sugarcane show the same breathlessness and fatigue that cause changes in daily activities such as bathing, climbing stairs and walk.

**KEYWORDS:** Burning of sugarcane. Worker’s health. PFSDQ-M.

Endereço para correspondência:

Avenida Brasil, S/N, Quadra 13, Morada Verde; Ceres-Go.

CEP: 76300-000

## INTRODUÇÃO

O cultivo da cana-de-açúcar (*Saccharum* sp) no Brasil, durante o período da colonização portuguesa, foi a primeira atividade produtiva e econômica do país, desde então, os impactos sociais, ambientais e econômicos, cresceram gradativamente em várias dimensões territoriais brasileiras (MACIEL *et al.*, 2011).

O desenvolvimento de indústrias açucareiras, a crescente utilização de veículos *flex-fuel*, o aumento do preço do petróleo e as questões ambientais relativas às emissões de poluentes, são os principais fatores que favorecem a produção gradativa da cana (MARQUES *et al.*, 2012).

Até o momento, o etanol obtido do caldo da cana-de-açúcar é o único combustível com capacidade de atender à crescente demanda mundial por energia renovável, apresentando baixo custo e baixo poder poluente. Deve-se considerar que as emissões gasosas com a queima do etanol, comparadas às emissões da queima da gasolina, são 60% menores. Sendo ainda que o CO<sub>2</sub> emitido pelo etanol é reabsorvido pela própria cana (SANTOS *et al.*, 2012).

A queima da cana libera alguns poluentes, entre eles, dióxido de nitrogênio (NO<sub>2</sub>), dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>), ozônio (O<sub>3</sub>), monóxido de carbono (CO), dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e, em sua etapa final, material particulado (PM-*particulate material*). O PM é uma partícula orgânica, resultante de combustão incompleta. O material particulado fino representa de 60% a 70% de todo PM, por ter diâmetros de 0,1 µm a menores que 2,5 µm (SILVA *et al.*, 2013; LOPES; DERISSO; SANTARPIO, 2007).

A emissão excessiva de compostos como CO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub> e SO<sub>2</sub>, provoca mudanças climáticas e alterações na qualidade ambiental, assim como produção de chuvas ácidas, que contribuem para a destruição da camada de ozônio (DIAS *et al.*, 2010).

Partículas de menor tamanho (PM<sub>2,5</sub>) são fatores de risco para doenças respiratórias, considerando que são mais danosos à saúde humana (SILVA *et al.*, 2010). As partículas inaláveis (< 10 µm) se depositam no sistema respiratório humano em vários níveis. As partículas entre 2,5 e 10 µm depositam-se essencialmente no componente superior do aparelho respiratório e nos brônquios principais. As partículas finas (< 2,5 µm) podem atingir porções mais profundas do sistema respiratório, até atingirem os alvéolos pulmonares (ANDRADE FILHO *et al.*, 2013).

As doenças respiratórias que possuem posição de destaque no Brasil são rinite (alérgica), bronquite aguda e sinusite (rinossinusite crônica). O aumento dessas patologias ocorre possivelmente por irritação brônquica de causas infecciosas e não infecciosas, como poluentes atmosféricos, fumaça de cigarro e outros alérgenos (SOUSA *et al.*, 2012).

A queima da cana é utilizada para facilitar o corte manual. Durante este processo os trabalhadores canavieiros estão sujeitos a situações de risco para a saúde respiratória, em especial a altos níveis de poluentes gasosos e ao material particulado fino (ROCHA; MARZIALE; HONG, 2010). Os riscos destas exposições podem ser evitados pelo uso adequado dos Equipamentos de Proteção Individual, assim como a utilização de respiradores (SEGATO, S. V, 2013).

Além de evidenciar problemas respiratórios, a prática da colheita manual é relacionada a doenças osteomusculares, cardiovasculares, casos de desidratação, febre, transtornos psicológicos, fadiga e outras disfunções com potencial de levar à morte no caso de falência do sistema termorregulador do corpo (NOGUEIRA, 2013; BITENCOURT; RUAS; MAIA, 2012).

Em 2006, foi aprovada, no Estado de Goiás, a Lei. n. 15.834, que dispõe sobre a redução gradativa do uso do fogo como método despalhador e facilitador do corte entre os anos de 2008 a 2027 (GOIÁS, 2009). Todavia, a eliminação das queimadas da cana e a implantação de máquinas colhedoras implicarão na alteração do perfil empregador dos trabalhadores das lavouras canavieiras. Visto que estes têm baixos índices de instrução, onde necessitariam de alfabetização, qualificação e treinamento para exercer funções como os de condutores de colheitadeiras (NOGUEIRA, 2013).

Este trabalho tem como objetivo avaliar os padrões antropométricos, analisar o grau de dispnéia e fadiga, avaliar as atividades diárias e relacioná-las com possíveis problemas respiratórios e promover uma análise das possíveis medidas de segurança que possam ser adotadas para minimizar os problemas respiratórios dos trabalhadores.

O Sistema de Informações sobre Mortalidade, desenvolvido pelo Ministério da Saúde, evidencia aumento nas notificações de óbitos no Brasil, passando de 946.686 em 2000 para 1.170.498 em 2011. Sendo que o maior número de óbitos foi por doenças do aparelho circulatório (335.213), seguido pelas neoplasias (184.384), as causas externas (145.842) e as doenças do Aparelho Respiratório (126.693) (DATASUS, 2013). Portanto, avaliar a saúde do trabalhador canavieiro implica em analisar sua qualidade de vida enquanto profissional e procurar meios que possam minimizar os problemas respiratórios decorrentes do trabalho, gerando a importância desta pesquisa para com as consequências das doenças respiratórias em trabalhadores canavieiros em Rubiataba-Go.

## **METODOLOGIA**

Foi realizado um estudo transversal com 120 trabalhadores canavieiros em atividade no município de Rubiataba-Go no ano de 2015 a 2016. A coleta de dados foi executada através de entrevista do questionário PFSDQ-M que contém informações sobre graus de dispnéia, fadiga e mudanças nas atividades diárias (MARTINS, J. *et al.*, 2014).

As medidas antropométricas foram realizadas pela utilização de fita métrica para



obtenção de altura e circunferência e balança digital de vidro temperado - TECSILVER para obtenção do peso, com capacidade até 150 kg. O Índice de Massa Corporal foi calculado considerando a seguinte fórmula estatística:  $IMC = PESO/ALTURA^2$  (BATISTA, 2015). Foram considerados os seguintes resultados:

Condição	IMC em Mulheres	IMC em Homens
Abaixo do peso	< 19,1	< 20,7
Peso normal	19,1 - 25,8	20,7 - 26,4
Marginalmente acima do peso	25,8 - 27,3	26,4 - 27,8
Acima do peso ideal	27,3 - 32,3	27,8 - 31,1
Obeso	> 32,3	> 31,1

A coleta dos dados foi realizada pelos pesquisadores. Os sujeitos da pesquisa foram abordados em pontos de ônibus da usina, no centro da cidade. No final da coleta de dados os pesquisados receberam uma cópia do Termo de Consentimento livre e esclarecido e um laudo contendo seu Índice de Massa Corporal.

Este trabalho foi submetido e aprovado pela Plataforma Brasil sob número de Certificado de Apresentação para Apreciação Ética 47014615.5.0000.0034.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os entrevistados, 117 eram do gênero masculino e 3 do feminino. As causas dessa desigualdade são: força física incompatível ao trabalho, salários associados à quantidade de cana cortada, a dupla jornada (obrigação com o trabalho na cana, com o serviço doméstico e com o cuidado e educação dos filhos) e aumento da meta do corte da cana. Estes fatores significam um esforço muito maior para as mulheres que, mesmo com todas as dificuldades, enfrentam o trabalho bruto (MENDONÇA, 2006).

Durante a aplicação do questionário buscou-se conhecer, por meio de uma breve entrevista, como os cortadores avaliavam sua saúde e, em seguida, quais as queixas que apresentavam sobre seu estado de saúde. A maioria dos cortadores julgou a própria saúde regular, conforme Tabela 1. Uma pequena porcentagem relatou condições de saúde muito boa ou muito ruim.

ESTADO DE SAÚDE	N	%
Muito bom	12	10,0
Bom	18	15,0
Regular	54	45,0
Ruim	24	20,0
Muito Ruim	12	10,0

Tabela 1: Número (N) e porcentagem (%) de cortadores segundo estado de saúde relatado. Rubiataba-Go, 2016.

Quanto às queixas de saúde indicadas, várias estão relacionadas ao processo produtivo em que estão envolvidos: tosse, fadiga muscular, dores nas costas, ardor nos olhos e falta de ar. Os próprios entrevistados relataram os fatores que prejudicavam sua saúde: a inalação de fuligem, o trabalho pesado e a alimentação inadequada para um trabalho que exige altíssima quantidade de energia. Os trabalhadores que afirmaram sentir frequentemente tosse, irritação nos olhos e falta de ar, alegaram que esses sintomas têm maior intensidade na época das queimadas.

Quanto ao estado nutricional, à amostra apresentou 45,0% de indivíduos abaixo do peso, 39,2% com peso normal, marginalmente acima do peso 10,8%, 5% acima do peso ideal e 0% Obeso, como demonstra a Figura 2.

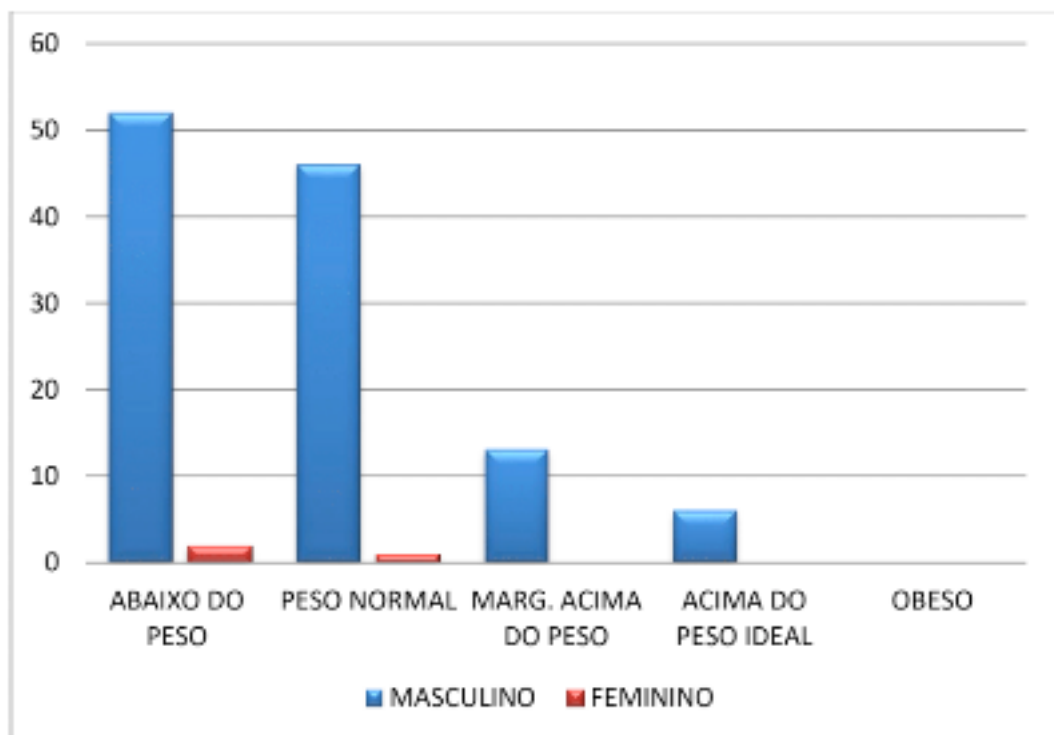


FIGURA 2: Distribuição do estado nutricional de trabalhadores canavieiros de acordo com o índice de massa corporal (IMC) segundo sexo. Rubiataba-Go, Brasil, 2015-2016.

Para Gonçalves et al. (2012) indivíduos incluídos na categoria abaixo do peso, também chamada de “magreza”, podem ter problemas com transtornos digestivos, debilidade, fadiga e ansiedade o que é um indicio de grande probabilidade em adquirir doenças.

Carvalho Júnior (2013) afirma em seu estudo que as exposições à poluição atmosférica acarretam uma redução da função pulmonar, prejudicam o transporte mucociliar, além de aumentar os sintomas respiratórios e a incidência de doenças respiratórias como asma e bronquite crônica levando a uma maior procura e demanda

por serviços de saúde pública.

Verificou-se, pelos dados constantes do Gráfico da Figura 3, que o grau de dispnéia dos trabalhadores elevou-se nos requisitos dispnéia moderada, grave e muito grave no ano de 2015 para o ano de 2016. Constatou-se também, que o grau de fadiga dos canavieiros, expresso no Gráfico da Figura 4, elevou-se nos requisitos cansaço moderado, grave e muito grave.

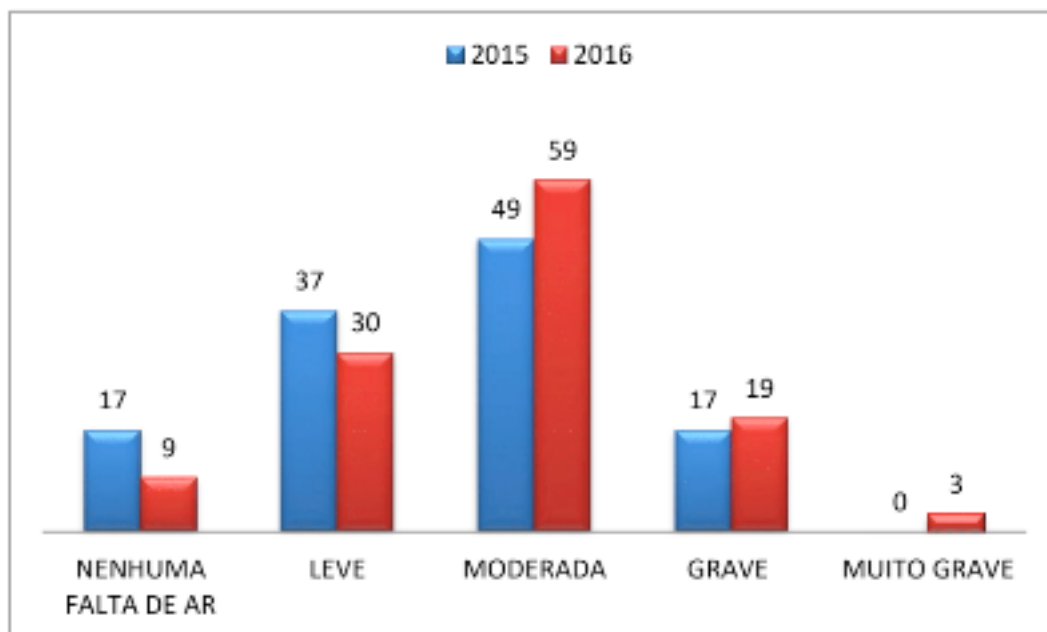


FIGURA 3: Avaliação do grau de dispnéia em trabalhadores canavieiros. Rubiataba-Go, Brasil, 2015-2016.

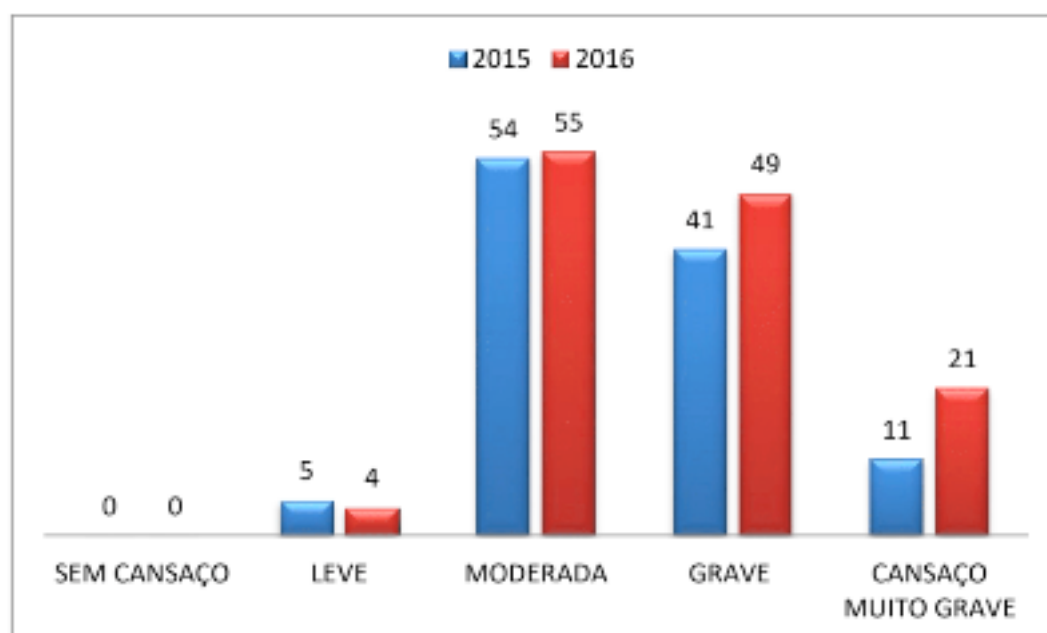


FIGURA 4: Avaliação do grau de fadiga em trabalhadores canavieiros. Rubiataba-Go, Brasil, 2015-2016.

Percebe-se por meio da Tabela 2 que há uma elevada porcentagem de relatos de mudanças nas atividades diárias dos cortadores. A análise apresentou que 40%

dos entrevistados relataram ter sofrido mudança extrema ao andar em plano inclinado após submeter-se ao trabalho canavieiro. Outra mudança notável é que 34,2% da amostra apresentaram mudança moderada ao tomar banho.

	TÃO ATIVO COMO SEMPRE		PEQUENA MUDANÇA		MUDANÇA MODERADA		MUDANÇA EXTREMA	
	N	%	N	%	N	%	N	%
<b>TOMAR BANHO</b>	21	17,5	45	37,5	41	34,2	13	10,8
<b>VESTIR CAMISETA</b>	63	52,5	37	30,8	13	10,8	7	5,9
<b>ANDAR EM PLANO INCLINADO</b>	6	5,0	16	13,3	50	41,7	48	40,0
<b>SUBIR 3 DEGRAUS</b>	76	63,3	32	26,7	7	5,8	5	4,2
<b>ANDAR 3 METROS</b>	48	40,0	56	46,7	9	7,5	7	5,8

TABELA 2: Número (N) e porcentagem (%) de cortadores segundo mudanças nas atividades diárias. Rubiataba-Go, 2016.

Neste caso, é relevante considerar que as mudanças nas atividades diárias dos trabalhadores canavieiros podem estar correlacionadas ao elevado índice de indivíduos em estado de “magreza” nutricional, além das péssimas condições de trabalho e ao fato de inalarem PM e poluentes gasosos que interferem em sua saúde respiratória (GONÇALVES *et al.*, 2012; CARVALHO JÚNIOR, 2013).

Em um estudo realizado por Ceccato et al. (2014) foi observada a alta frequência de afastamentos de trabalhadores canavieiros devido a doenças do aparelho respiratório. Ceccato afirma que este problema pode estar associado às condições climáticas adversas, além da exposição direta dos trabalhadores aos poluentes atmosféricos, gerados pela queima da palha da cana-de-açúcar realizada nos canaviais, que provocam aparecimento de sinais e sintomas respiratórios durante a safra canavieira. Além disso, considerou que a exposição do trabalhador canavieiro a pesticidas e agrotóxicos no campo de trabalho corroboram a alta incidência de absenteísmo nos setores canavieiros.

A Norma Regulamentadora NR-6 (Portaria nº 3.214, 08/06/1978; com última atualização pela Portaria SIT nº 125, de 12/11/2009) dispõe sobre a obrigatoriedade do uso de equipamentos de proteção individual (EPI) e que seu uso deve ser adequado ao risco a que o trabalhador está exposto e à atividade exercida, considerando-se a eficiência necessária para o controle da exposição ao risco e o conforto oferecido (VEIGA *et al.*, 2007).

Em entrevista, o fiscal responsável pelos trabalhadores canavieiros afirmou que a usina fornece para seus empregados os seguintes EPI's: luva para proteção contra agentes mecânicos, luva para corte da cana (mão do facão), óculos de proteção com tela, caneleira com talas de fibra, botina com bico de ferro e boné tipo árabe. Constatou-se que não existem preocupações a cerca de EPI's destinados a proteção

das vias respiratórias como máscaras e respiradores.

O Ministério da Saúde alega que a via respiratória é influenciada pelo modo de respirar do trabalhador, se pelo nariz ou pela boca e pelo tipo de atividade que exerce, uma vez que o trabalho mais pesado requer maior ventilação pulmonar. Em repouso, uma pessoa respira em média de 5 a 6 litros por minuto e ao realizar um trabalho muito pesado passará a respirar de 30 a 50 litros por minuto. No caso do material particulado fino e dos poluentes gasosos, o mecanismo de filtros existente no nariz é importante, porém não exclui a necessidade do uso de máscaras e respiradores nas áreas canavieiras (BRASIL, 2001).

No sistema de colheita crua, onde não há queimadas, os ponteiros, as folhas secas e as folhas verdes são cortadas e lançadas sobre a superfície do solo, formando uma cobertura morta espessa. A palha que cobre o solo após a colheita da cana crua sofre degradação ao longo do ciclo das plantas. A presença da palha prejudica o crescimento de plantas invasoras, o que permite a redução significativa do uso de herbicidas que, na cultura com queima, é prática obrigatória. Em consequência, ela favorece a infiltração da água no solo, diminuindo o escoamento superficial e a erosão, especialmente em áreas de maior inclinação, e protege o solo da excessiva evaporação de água e da radiação solar, com ganhos diretos para as agroindústrias e indiretos para toda a sociedade (RONQUIM, 2010).

Além disso, Saiani e Pedrosa (2016) afirmam que a substituição da queima prévia pela mecanização da colheita da cana-de-açúcar, cessa e/ou reduz a emissão de poluentes, melhorando a qualidade do ar em um local e no seu entorno. Conseqüentemente a incidência de doenças respiratórias, ocasionadas em trabalhadores canavieiros e de pessoas residentes nas áreas canavieiras, minimiza.

Por outro lado a crescente preocupação com o meio ambiente e com as condições de trabalho nas lavouras, o debate acerca da mecanização na colheita da cana-de-açúcar preestabelecem um desafio adicional para o setor sucro energético: a substituição da máquina pelo homem e conseqüentemente desemprego estrutural (FIGUEIREDO; SILVA; QUEIROZ, 2015).

O desafio está em superar essa situação em diferentes escalas. As políticas ambientais não podem ser causa de injustiças sociais, de exclusão social e de desequilíbrios populacionais, como foram muitas políticas econômicas e o próprio processo histórico em que se dá a economia capitalista. Logo é necessário investimentos das empresas e do governo para que outros tipos de trabalho possam ser realizados pelos trabalhadores canavieiros. Só assim as políticas ambientais cumpriram seu papel que é proteger o meio ambiente, não desequilibrando a economia e diversificando o trabalho. (RIBEIRO; FICARELLI, 2010).

## CONCLUSÃO

Desse modo, com base nos resultados obtidos, constatou-se que, as exposições

dos trabalhadores canavieiros ao material particulado e a poluentes gasosos provindos da queima da palha da cana-de-açúcar evidenciam aos mesmos falta de ar e fadiga que acarretam mudanças nas atividades diárias como tomar banho e andar em plano inclinado. Faz-se necessário ressaltar a importância da lei n. 15.834 de 2006, que visa à redução gradativa das queimadas até 2027, para minimizar tais problemas.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos funcionários da Usina que participaram desta pesquisa.

## REFERÊNCIAS

ANDRADE FILHO, V. S. D. *et al.* **Aerossóis de queimadas e doenças respiratórias em crianças**, Manaus, Brasil. Revista de Saúde Pública, v. 47, p. 239-247, 2013.

BATISTA, R. S. **Cálculo de Índice de Massa Corporal: calcule.net**. Disponível em: <<http://www.calcule.net/imc.calculo.indice.de.massa.corporal.a.php>>. Acesso em: 10 de Julho de 2015.

BITENCOURT, D. P.; RUAS, Á. C.; MAIA, P. A.. **Análise da contribuição das variáveis meteorológicas no estresse térmico associado à morte de cortadores de cana-de-açúcar**. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 28, n. 1, p. 65-74, Jan. 2012.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Doenças relacionadas ao trabalho: manual de procedimentos para os serviços de saúde**. Brasília: Editora MS, n. 114, p. 580, 2001.

CARVALHO JUNIOR, L. C. S. **Efeitos da exposição à queima de biomassa na função pulmonar e transportabilidade mucociliar e investigação de doenças ocupacionais dos trabalhadores rurais do setor canavieiro**. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. São Paulo, 85 f. 2013.

CECCATO, A. D. F. *et al.* **Absenteísmo por doença ocupacional de trabalhadores rurais no setor canavieiro**. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 30, n. 10, p. 2169-2176, oct. 2014.

DATASUS, Portal da Saúde. **Sistema de Informações sobre Mortalidade**. Brasília, 2013. Disponível em: <<http://svs.aids.gov.br/cgiae/sim/2011>>. Acesso em: 08 de jul. 2015.

DIAS, B. B. *et al.* **Ação do enxofre em chuva ácida simulada sobre parâmetros morfofisiológicos de *Phaseolus vulgaris* L. (Fabaceae)**. Acta Scientiarum. Agronomy, v. 32, p. 433-439, 2010.

FIGUEIREDO, J. S.; SILVA, S. C.; QUEIROZ, M. F. M. **Mecanização na colheita da cana-de-açúcar: o caso da ecoenergias do Brasil**. Leituras de Economia Política, Campinas, v. 22, p. 31-44, dez. 2015.

GOIÁS, Lei Estadual n.º 15.834, de 23 de novembro de 2006. **Estabelece a redução gradativa da queima da palha de cana-de-açúcar em áreas mecanizáveis**. Diário da Justiça Eletrônica, 21 mai. 2009. Seção 1.

GONÇALVES P. B. *et al.* **Análise da qualidade de vida através do IMC dos servidores e alunos do IFMA/centro histórico**. Sistema Eletrônico de Administração de Conferências. Palmas-To, v. 3, p. 1185-1191, ago. 2012.

- LOPES, L. V.; DERISSO, E. M.; SANTARPIO, E. A. **A queima da palha da cana-de-açúcar e sua relação com problemas respiratórios**. Revista Brasileira de Ciências da saúde. São Carlos-SP, n. 14, p. 43-48, out-dez. 2007.
- MACIEL, M. R. A. *et al.* **Caracterização socioeconômica do trabalhador temporário da indústria canavieira em Lagoa da Prata, Minas Gerais, Brasil**. Sociedade & Natureza, v. 23, p. 335-343, 2011.
- MARQUES, D. M. F. *et al.* **Produção e preço da cana-de-açúcar em Goiás. Conjuntura Econômica Goiana**. Goiânia, n.23, p.32-43, dez. 2012.
- MARTINS, J. *et al.* **Programa de Atualização em Fisioterapia Cardiovascular e Respiratória: Ciclo 1**. Porto Alegre: Artmed Panamericana, v. 2, p. 27-31, 2014.
- MENDONÇA M. L. **A OMC e os efeitos destrutivos da indústria da cana no Brasil**. 2006. Disponível em: <<http://www.acaoterra.org/display.php?article=397>>. Acesso em: 29 de setembro de 2016.
- NOGUEIRA, S. M. **Perfil socioeconômico e de saúde osteomuscular de cortadores de cana que desenvolveram distúrbios osteomusculares relacionados ao trabalho (DORT) Rubiataba-GO**. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde) – Faculdade de Fisioterapia, Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 90 f.2013.
- RIBEIRO, H.; FICARELLI, T. R. de A. **Queimadas nos canaviais e perspectivas dos cortadores de cana-de-açúcar em Macatuba, São Paulo**. Saúde e Sociedade, São Paulo, v. 19, n. 1, p. 48-63, mar. 2010.
- ROCHA, F. L.; MARZIALE, M. H.; HONG, O. S. **Work and health conditions of sugar cane workers in Brazil**. Rev. Esc. Enferm. USP, v. 44, n. 4, p. 978-83, dez. 2010.
- RONQUIM, C. C. **Queimada na colheita da cana-de-açúcar: impactos ambientais, sociais e econômicos**. Embrapa Monitoramento por Satélite. Campinas, São Paulo, v. 77, dez. 2010.
- SAIANI, C. C. S.; PEROSA, B. B. **Saúde Respiratória e Mecanização da Colheita da Cana-de-açúcar nos Municípios Paulistas: a importância do Protocolo Agroambiental**. Revista de Economia e Sociologia Rural. Brasília, v.54, n.1, jan-mar. 2016.
- SANTOS, F. A. *et al.* **Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol**. Química Nova, v. 35, p. 1004-1010, 2012.
- SEGATO, S. V. **A NR31 e o uso do EPI na cafeicultura do município de Ribeirão Corrente-SP: Impressões do produtor e do trabalhador rural**. Nucleus, Ituverava, v.9, n. 2, oct. 2013.
- SILVA, A. M. C. D. *et al.* **Material particulado originário de queimadas e doenças respiratórias**. Revista de Saúde Pública, v. 47, p. 345-352, 2013.
- SOUSA, C. A. D. *et al.* **Doenças respiratórias e fatores associados: estudo de base populacional em São Paulo, 2008-2009**. Revista de Saúde Pública, v. 46, p. 16-25, 2012.
- VEIGA, M. M. *et al.* **A contaminação por agrotóxicos e os Equipamentos de Proteção Individual (EPIs)**. Revista brasileira de saúde Ocupacional, vol.32, n.116, p. 57-68, 2007.

## AVALIAÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA DE COMPÓSITOS OBTIDOS A PARTIR DE PEEK/CaCO<sub>3</sub>

### **Mayelli Dantas de Sá**

Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Programa de Pós - graduação em Ciência e Engenharia de Materiais  
Campina Grande – Paraíba

### **José William de Lima Souza**

Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Programa de Pós - graduação em Ciência e Engenharia de Materiais  
Campina Grande – Paraíba

### **Michele Dayane Rodrigues Leite**

Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Programa de Pós -graduação em Ciência e Engenharia de Materiais  
Campina Grande – Paraíba

### **José Filipe Bacalhau Rodrigues**

Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Programa de Pós -graduação em Ciência e Engenharia de Materiais  
Campina Grande – Paraíba

### **Hermano de Vasconcelos Pina**

Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Programa de Pós -graduação em Ciência e Engenharia de Materiais  
Campina Grande – Paraíba

### **Marcus Vinicius Lia Fook**

Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Departamento de Ciência e Engenharia de Materiais  
Campina Grande – Paraíba

**RESUMO:** O poli (éter-éter-cetona) (PEEK) é considerado um polímero de engenharia de alto desempenho que pode ser aplicado em diversas áreas. Após a sua comprovação de biocompatibilidade tornou-se bastante aplicado na área ortopédica. A partir de então, o PEEK passou a ser considerado um dos principais substitutos dos materiais metálicos, entretanto, apresenta caráter bioinerte que impossibilita a interação entre o tecido ósseo e o implante. Por isso, muita atenção tem sido dada no desenvolvimento de biomateriais compósitos com a incorporação de partículas cerâmicas bioativas, pois proporciona condições adequadas para a ligação direta deste polímero ao tecido, obtendo-se assim um biomaterial apropriado para substituição e regeneração óssea. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver compósitos de PEEK e CaCO<sub>3</sub> (carbonato de cálcio) obtidos a partir da casca de ovos de galinhas para comparar com os compósitos obtidos com o CaCO<sub>3</sub> comercial em diferentes proporções. O CaCO<sub>3</sub> utilizado na obtenção dos compósitos foi desenvolvido no Laboratório CERTBIO e apresentou resultados satisfatórios em comparação ao CaCO<sub>3</sub> comercial. Nos ensaios biológicos foi possível observar que todos os compósitos apresentaram características não citotóxicas e por isso se mostraram favoráveis à adesão e desenvolvimento celular. Portanto,



os compósitos que foram desenvolvidos nessa pesquisa podem ser uma possível indicação para aplicação como biomaterial.

**PALAVRAS-CHAVE:** PEEK; Carbonato de cálcio; Compósitos; Biomateriais.

**ABSTRACT:** The poly (ether-ether-ketone) (PEEK) is considered a high performance engineering polymer that may be employed in many fields. After its proof of biocompatibility it has been very often employed in the orthopedic field. Since then, PEEK has been considered one of the main replacements for metallic materials, however, it presents a bioinert character that impedes the interaction between the bone tissue and the implant. For this reason, much attention has been paid to the development of composite biomaterials with the incorporation of bioactive ceramic particles, because that gives adequate conditions for the direct bonding between this polymer and the tissue, yielding a biomaterial adequate to bone substitution and regeneration. Thus, the objective of this work was to develop PEEK and  $\text{CaCO}_3$  (calcium carbonate) composites obtained from eggshells to compare them to composites obtained with commercial  $\text{CaCO}_3$  at different proportions. The  $\text{CaCO}_3$  used in the obtention of the composites was developed in the CERTBIO Laboratory and presented satisfactory results when compared to the commercial  $\text{CaCO}_3$ . In the biological tests, it was possible to observe that all the composites presented non cytotoxic characteristics and, for this reason, have shown to be optimal for cell adhesion and development. Therefore, the composites developed in this research may be a possible indication for application as biomaterials.

**KEYWORDS:** PEEK; Calcium carbonate; Composites; Biomaterials.

## 1 | INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da ciência e tecnologia dos materiais têm contribuído para a descoberta de novos materiais que poderão atender as novas demandas da sociedade. Atualmente, o poli (éter-éter-cetona) (PEEK) vem sendo considerado um dos polímeros de engenharia mais importantes e com um grande campo de aplicações como na área automotiva, aeroespacial e biomédica, isto é possível pelas suas propriedades, tais como: elevada resistência química, mecânica e estabilidade térmica, além de ser biocompatível (MOSTAFA; ISMARRUBI; SULTAN, 2016).

Desde 1987, o PEEK tem sido cada vez mais utilizado como biomaterial (MONICH *et al.*, 2016). Se tornou atrativo para a área ortopédica pelas suas diversas características, entre estas destacam-se módulo de elasticidade semelhante ao osso, efeito radiolúcido, estabilidade química, não toxicidade, além de possuir estabilidade térmica (FAN; TSUI; TANG, 2016).

O PEEK apresenta característica de ser bioinerte, sendo que pesquisas atuais visam transformar essa característica tornando-o bioativo para que ocorra maior interação entre o tecido ósseo e o implante (NAJEEB *et al.*, 2016). Uma das estratégias mais estudadas abrange o desenvolvimento de compósitos e nanocompósitos

poliméricos de PEEK, visto que apresenta facilidade de formar compósitos, tais como, PEEK e nanohidroxiapatita (PEEK/nHA), pela técnica de extrusão para um estudo preliminar da influência da adição de nHA nas propriedades reológicas, térmicas e mecânicas do PEEK (QUEIROZ, 2006), e PEEK com fluorhidroxiapatita (PEEK/FHA) para melhorar a bioatividade utilizando a técnica de moldagem por compressão (WANG *et al.*, 2014). Uma outra forma de se obter PEEK como material bioativo é conseguida adicionando-se partículas de biocerâmica como o  $\text{CaCO}_3$  a matriz polimérica (REGO, 2012).

Na literatura são encontrados outros trabalhos como modificação da superfície do PEEK afim de desenvolver o seu desempenho biológico (RIVIÈRE *et al.*, 2016), e modificação química (WANG *et al.*, 2014).

Particularmente o  $\text{CaCO}_3$  é uma matéria-prima cerâmica que pode ser utilizada como biocerâmica que apresenta características osteoindutoras, além de rápida biodegradação, quando em contato com fluídos corpóreos. Uma das vantagens de se utilizar o carbonato de cálcio, é o seu baixo custo, fácil aplicação e disponibilidade da matéria prima, além de ser um dos mais utilizados como carga mineral (KURTZ e DEVINE, 2007). Apresenta características importantes como biocompatibilidade, bioatividade, ausência de toxicidade local ou sistêmica, absentismo de corpo estranho ou inflamações, habilidades para se ligar ao tecido hospedeiro e taxas de degradação variáveis (LEEUEWENBURGH; ANA; JANSEN, 2010). Poucos estudos são encontrados sobre a influência do  $\text{CaCO}_3$  ao PEEK para aplicação como biomaterial. Diante disto, este trabalho teve como objetivo obter e caracterizar compostos de PEEK/ $\text{CaCO}_3$  em diferentes concentrações como forma de avaliar a influência química e biológica ao adicionar  $\text{CaCO}_3$  ao PEEK pelas técnicas de FTIR, DRX, citotoxicidade e adesão celular.

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

Para o desenvolvimento dos compósitos utilizou-se o poli (éter-éter-cetona) (PEEK) em pó adquirido da Victrex – Vicote 702, Carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) em pó produzido a partir da casca de ovos de galinhas, fornecido pelo Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste – CERTBIO e o carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) comercial adquirido pela Vetec. A Acetona P.A adquirida da NEON foi utilizada como solvente para misturar os materiais.

Para se obter os compósitos, utilizou-se uma concentração de 25%PEEK/75% $\text{CaCO}_3$  (em peso) para as amostras A e C e 20%PEEK/80% $\text{CaCO}_3$  (em peso) para as amostras B e D. Na preparação das amostras A e B utilizou-se o  $\text{CaCO}_3$  – Vetec e nas amostras C e D o  $\text{CaCO}_3$  – CERTBIO. A razão da escolha dessas composições para o carbonato de cálcio deve-se ao tecido ósseo que é descrita com 30% de colágeno e 70% de fase mineral (LEEUEWENBURGH; ANA; JANSEN, 2010).

Um esquema representativo da obtenção dos compósitos é representado na Figura 1.

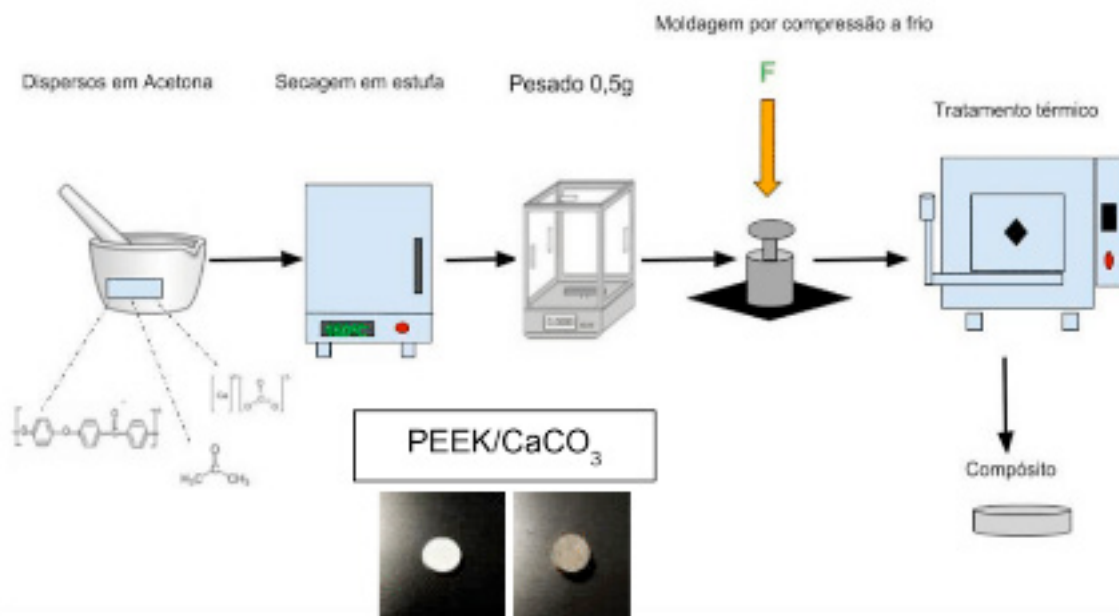


Figura 1. Esquema representativo da obtenção dos compósitos PEEK/CaCO<sub>3</sub>.

Fonte: Própria (2017).

Inicialmente, os pós do CaCO<sub>3</sub> foram peneirados para obter uma granulometria <325 mesh em torno de 0,044 mm. Os pós de PEEK e CaCO<sub>3</sub> foram dispersos em acetona até se obter uma mistura homogênea (GOYAL, TIWARI E NEGI, 2008). Após este procedimento, a mistura foi seca em estufa a 150 °C por 4 h. Em seguida, 0,5 g da amostra foi colocada em um molde metálico cilíndrico com 12 mm de diâmetro, e levado à prensa hidráulica uniaxial, sem aquecimento, sob uma carga de 1 tonelada. Posteriormente, os compósitos passaram por um tratamento térmico a 390 °C durante 45 minutos. O arrefecimento dos compósitos ocorreu à temperatura ambiente e em seguida foram desmoldados. O processo ocorreu nas mesmas condições para todos os compósitos.

Os compósitos foram analisados quanto a influência química e biológica ao adicionar CaCO<sub>3</sub> (comercial e CERTBIO) ao PEEK pelas técnicas de FTIR, citotoxicidade e adesão celular.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na Figura 2 está apresentado os espectros na região do infravermelho para as amostras de PEEK, carbonato de cálcio Vetec e CERTBIO e dos compósitos A, B, C e D.

Pelos espectros de FTIR foi possível observar grupos característicos do PEEK, com presença de grupos aromáticos C-H nas vibrações 766, 834 e 925 cm<sup>-1</sup> referente à deformação angular. Nos comprimentos 1011, 1155, 1183 e a 1215 cm<sup>-1</sup> são

relacionadas ao estiramento assimétrico do grupo éter C-O, corroborando com os resultados de (KURTZ, 2012).

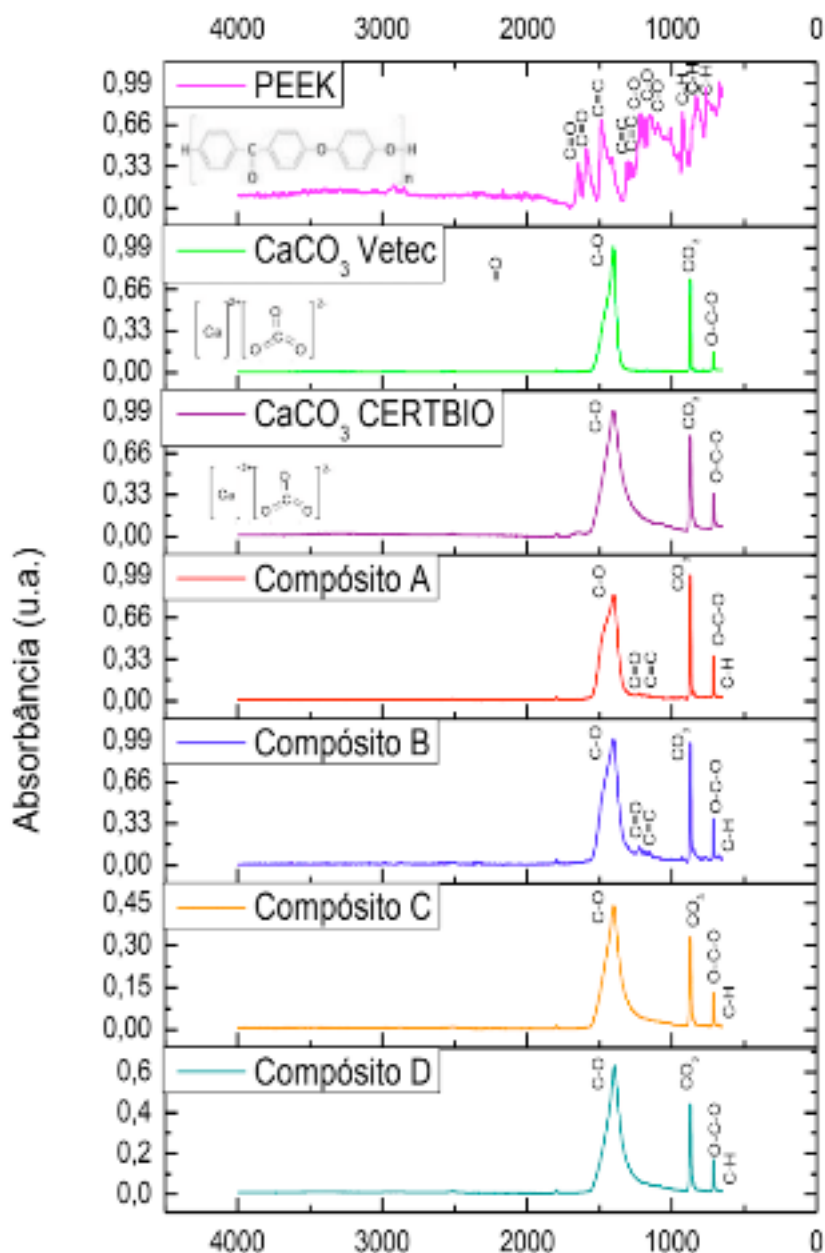


Figura 2. Espectro na região do infravermelho do PEEK, CaCO<sub>3</sub> - Vetec, CaCO<sub>3</sub> - CERTBIO, Compósitos A, B, C e D.

As bandas observadas no espectro do carbonato de cálcio do CERTBIO e da Vetec não apresentaram variação de absorção de bandas significativas. Nas bandas 711 e 712 cm<sup>-1</sup> ocorreu uma deformação angular no plano O-C-O. Em 870 e 871 cm<sup>-1</sup> ocorreu uma deformação angular fora do plano CO<sub>3</sub>. As ligações C-O estão presentes em 1408 e 1406 cm<sup>-1</sup> apresentaram um estiramento anti-simétrico (BESSLER e RODRIGUES, 2008).

Na banda 1406 cm<sup>-1</sup> do CaCO<sub>3</sub> - CERTBIO ocorreu um alargamento do pico que pode ser proveniente da presença de matéria orgânica, além de uma maior absorção referente ao grupo C-O.

A partir dos resultados de FTIR, os compósitos A, B, C, e D apresentaram bandas

semelhantes como O-C-O ( $711\text{ cm}^{-1}$ ),  $\text{CO}_3$  ( $868\text{ cm}^{-1}$ ), C-O ( $1218\text{ cm}^{-1}$ ) típicas do carbonato de cálcio, bem evidentes, uma vez que foi usado em altas concentrações. As bandas C=C ( $1488\text{ cm}^{-1}$ ) e  $1306\text{ cm}^{-1}$  associadas ao grupo C-O são bandas características do PEEK, não ocorrendo o surgimento de ondas diferentes das bandas observadas nos materiais analisados individualmente, sendo identificado apenas o deslocamento de bandas já existentes nos espectros do PEEK e aqueles comuns no carbonato de cálcio.

Analisando a Figura 2, foi possível perceber que, com o aumento da concentração de carbonato, há uma diminuição significativa na intensidade das

bandas de absorção características do  $\text{CaCO}_3$ , além de um aumento visível nas bandas  $871\text{ cm}^{-1}$  atribuído ao grupo  $\text{CO}_3$ . Apesar das bandas de absorção referente ao PEEK não estarem em evidências, observa-se essa diminuição nas bandas de absorção com a adição do PEEK. O resultado de FTIR caracteriza interação física entre o PEEK e o carbonato de cálcio, pois não surgiram novas vibrações, bem como não houve deslocamento de bandas.

Os difratogramas do PEEK,  $\text{CaCO}_3$  – Vetec e CERTBIO e dos compósitos A, B, C e D a fim de compreender a influência do  $\text{CaCO}_3$  estão ilustrados nas Figuras 3 e 4.

O difratograma do PEEK, na Figura 3, apresenta três picos de alta intensidade pertencente aos planos de difração (1 1 3), (2 0 0) e (2 1 3), sendo em torno de  $21^\circ$ ,  $22,6^\circ$  e outro por volta de  $28,7^\circ$ . Os resultados obtidos foram semelhantes a trabalhos anteriores (ALMASI *et al.*, 2014). Logo, o difratograma do PEEK apresentou picos característicos de um polímero semicristalino.

O  $\text{CaCO}_3$  – Vetec utilizado na pesquisa apresentou picos característicos do carbonato de cálcio na forma de calcita, corroborando com resultados de outros pesquisadores (FREIRE E HOLANDA, 2007), pois os cristais de calcita exibem morfologia romboédrica, típica para esta forma cristalina, orientadas predominantemente na direção cristalográfica (1 0 4), como mostra o pico intenso em  $29,4^\circ$ .

O  $\text{CaCO}_3$  fornecido pelo CERTBIO, é também na forma de calcita, com morfologia romboédrica, com uma intensidade maior em  $11217$  no ângulo  $29,5^\circ$  logo os resultados dos dois  $\text{CaCO}_3$  foram semelhantes. Os dois carbonatos apresentaram um perfil de material cristalino.

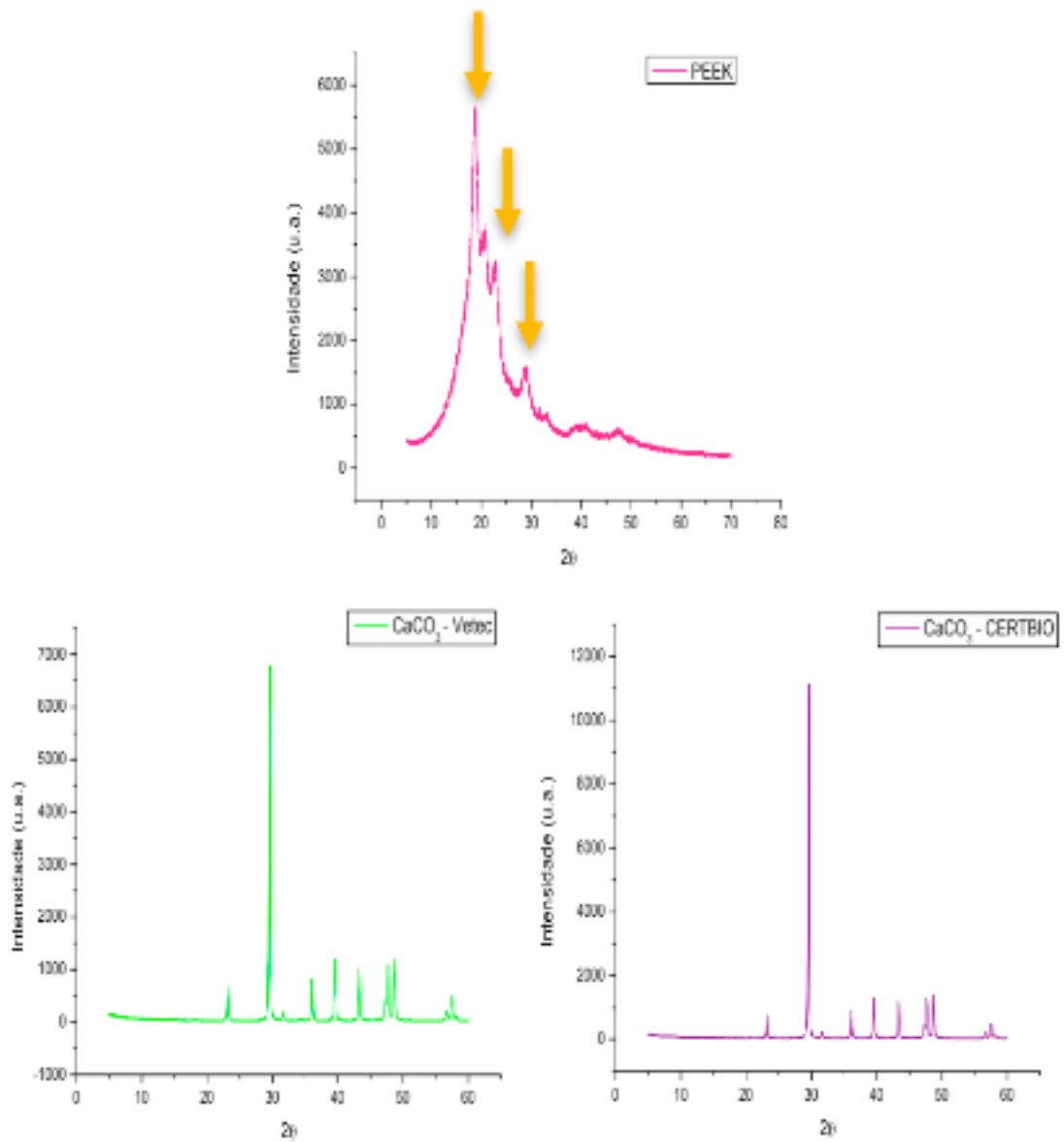


Figura 3. Difratogramas do PEEK, CaCO<sub>3</sub> – Vetec e CaCO<sub>3</sub> – CERTBIO.

Portanto, os resultados obtidos no DRX mostraram que os dois tipos de carbonatos de cálcio que foram incorporados ao PEEK nos compósitos A, B, C e D, como está ilustrado na Figura 4, apresentaram uma diminuição nas intensidade dos picos característicos do carbonato em 29,4° e 29,5° nos quais apresentaram uma fase cristalina de menor intensidade.

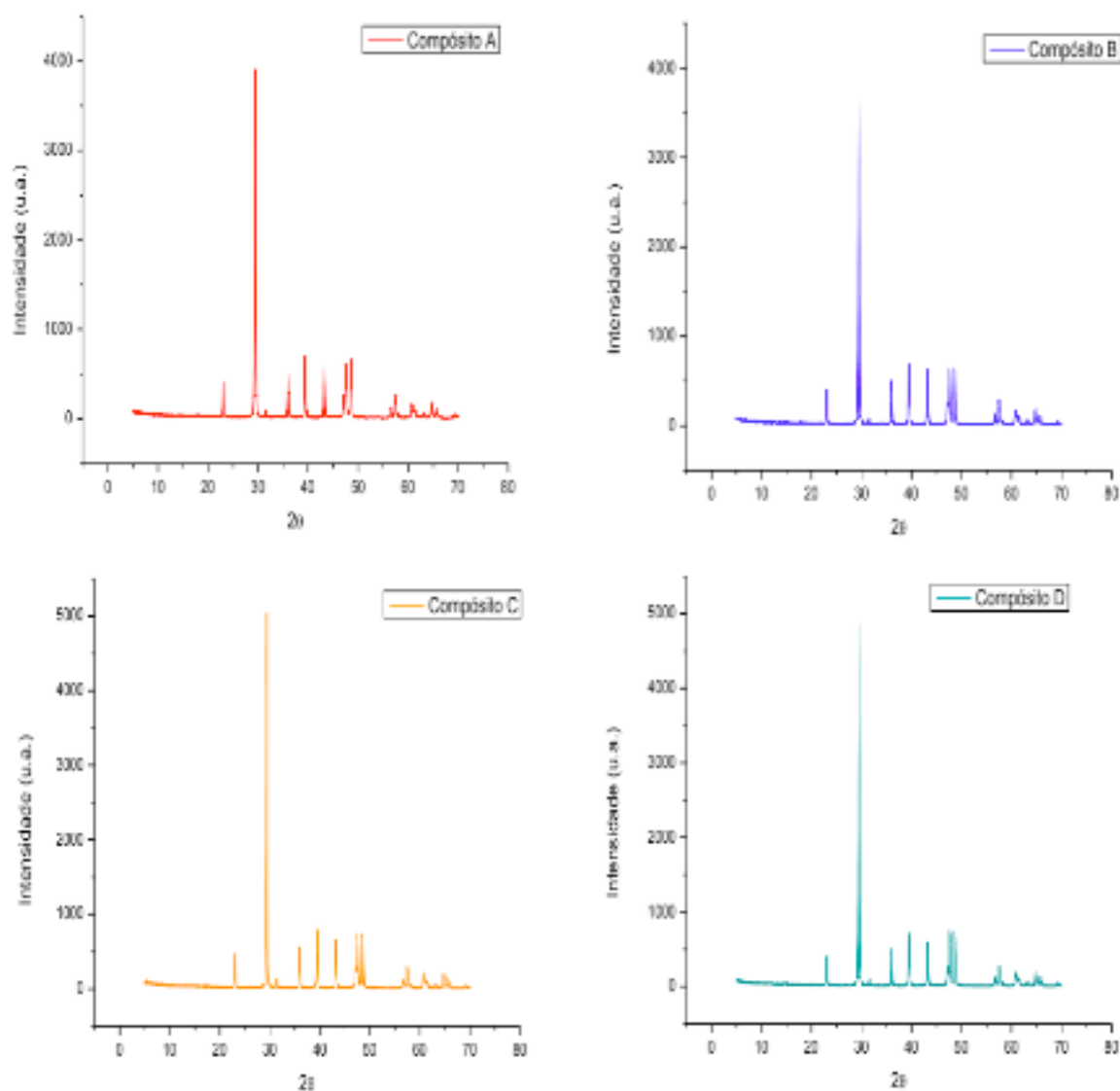


Figura 4. Difratograma do PEEK, CaCO<sub>3</sub> - Vetec, CaCO<sub>3</sub> - CERTBIO, Compósito A, Compósito B, Compósito C e Compósito D.

Com o aumento da concentração do carbonato de cálcio no PEEK para obtenção dos compósitos B e D, pode-se observar que as fases cristalinas com maior intensidade foram obtidas no compósito com maior concentração de CaCO<sub>3</sub>.

Logo, os dois tipos de CaCO<sub>3</sub> utilizados apresentaram características semelhantes, bem como os compósitos, A, B, C e D também apresentaram semelhanças nos seus picos.

Outra característica importante é a bicompatibilidade, dado que para que um material seja aplicado como biomaterial não devem conter substância tóxica e nem desencadear reações adversas. O gráfico de avaliação citológica, a partir das células L929, de todos os compósitos obtidos está representado na Figura 5. Estes resultados estão apresentados com erro padrão.

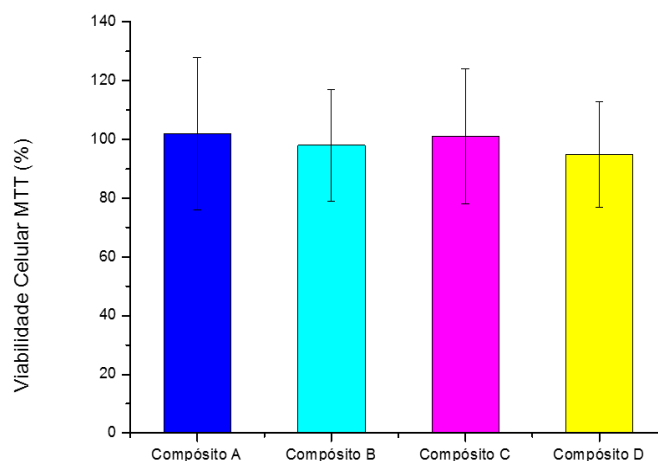


Figura 5. Gráfico de avaliação citológica com células L929, dos compostos A, B, C e D.

Através da Figura 5, é possível observar que as atividades metabólicas celulares dos compostos foram 102% ± 26 para o composto A, 98% ± 19 para o composto B, 101% ± 23 para o composto C e 95% ± 18 para o composto D. Quando a viabilidade celular do material for maior que 70%, ele é considerado não citotóxico. Portanto, têm-se que toda as amostras de compostos avaliadas apresentaram viabilidade celular acima do índice de citotoxicidade 70%, determinando que estas amostras não apresentam efeitos citotóxicos em contato com a linha celular L929.

A morfologia dos compostos A, B, C e D após o ensaios de adesão celular *in vitro* e analisada por MEV está apresentada na Figura 6.

As imagens foram obtidas em diferentes regiões dos compostos. Com base nas micrografias obtidas foi possível observar que após 7 dias de cultivo celular, as células demonstraram capacidade para aderir a todas as superfícies dos compostos. As células aderidas se apresentaram de forma cilíndrica e achatadas ao longo dos compostos.



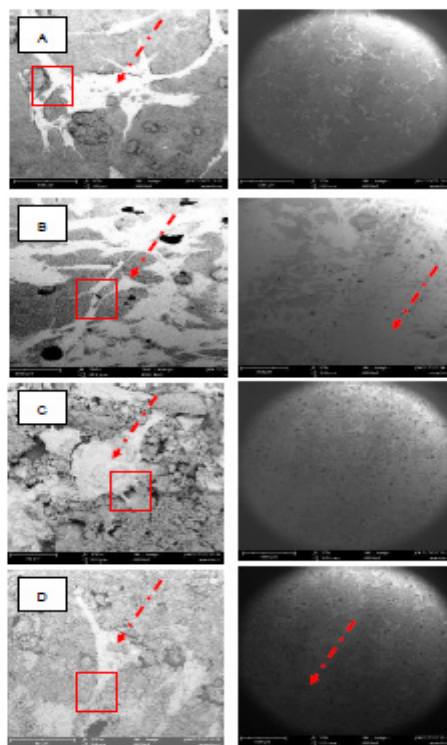


Figura 23 - Micrografias por MEV dos compósitos A, B, C e D. (A) 800x e 135x (B) 700x e 200x (C)3000x e 135x (D) 1000x e 114x.

Figura 6. Micrografias por MEV dos compósitos A, B, C e D. (A) 800x e 135x (B) 700x e 200x (C)3000x e 135x (D) 1000x e 114x

Além disso, essas exibiram prolongamentos celulares mais densos formando um tapete celular, os quais são característicos de seu desenvolvimento e viabilidade.

As diferenças mais evidentes entre as superfícies analisadas, se observa a quantificação no desenvolvimento celular. Neste estudo os compósitos B e D se apresentaram com maior crescimento celular nas superfícies analisadas, indicando que a resposta biológica para esses compósitos ocorreu de forma mais rápida. Nesta etapa de experimento *in vitro* é evidente a influência da concentração do  $\text{CaCO}_3$ . Os compósitos A e C também apresentaram crescimento com uma velocidade de desenvolvimento celular menor.

Desta forma, os compósitos desenvolvidos mostraram um bom substrato para aderência e desenvolvimento celular.

#### 4 | CONCLUSÃO

A partir do objetivo da pesquisa, os compósitos de PEEK/ $\text{CaCO}_3$ , foram obtidos de forma eficazes com a metodologia utilizada. Através do ensaio de FTIR e DRX evidenciaram a presença do PEEK e  $\text{CaCO}_3$ , sem presença de novas bandas, picos

ou transições de fases. Esses resultados demonstraram que não ocorreram interações químicas entre eles, característica típica de um material compósito.

No que diz respeito aos compósitos, pode ser um indicativo para aplicação como biomaterial, dado que os ensaios biológicos *in vitro* de citotoxicidade e adesão celular indicaram que o material se mostrou favorável para adesão e desenvolvimento celular, principalmente para as amostras que possuíam maior concentração de  $\text{CaCO}_3$ , ou seja, os compósitos com 20%PEEK/80%  $\text{CaCO}_3$  - Vetec e 20%PEEK/80%  $\text{CaCO}_3$  - CERTBIO. Portanto, verifica-se que os compósitos obtidos pela técnica de compressão a frio seguida de um tratamento térmico, são promissoras para o estudo de suporte ósseo, uma vez que o compósito combina principalmente as propriedades mecânicas do PEEK e com a atividade biológica do carbonato de cálcio.

## REFERÊNCIAS

- ALMASI, D.; IZMAN, S.; ASSADIAN, M.; GHANBARI, M.; KADIR, A. M. **Crystalline há coating on PEEK via chemical deposition**. Applied Surface Science, v. 314, p. 1034-1040, 2014.
- BARBOSA, R. C. **Compósitos Quitosana/Carbonato de Cálcio para Utilização em Cânulas de Fístula Ruminal**. Tese [Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais]. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Campina Grande – UFCG. Campina Grande-PB.
- BESSLER, K. E.; RODRIGUES, L. C. **Os Polimorfos de Carbonato de Cálcio – Uma Síntese Fácil de Aragonita**. Quimica Nova, v. 31, n. 1, 178-180, 2008.
- FAN, J. P., TSUI, C. P, TANG, C. Y. **Modeling of the mechanical behavior of HA/PEEK biocomposite under quasi-static**. Materials Science and Engineering, 382. 341-350, 2004.
- FREIRE, M. N.; HOLANDA, J. N. F. **Reciclagem de resíduo casca de ovo em massa cerâmica para revestimento poroso**. In: 51º Congresso Brasileiro de Cerâmica. 2007. Salvador, BA. Anais.
- GOYAL, R. K, TIWARI, A. N., NEGI, Y. S. **Microhardness of PEEK/ceramic microand nanocomposites: Correlation with Halpin–Tsai model Halpin-Tsai**. Materials Science and Engineering, v 491, p.230-236, 2008.
- KURTZ, S. M., DEVINE, J. N. **PEEK biomaterials in trauma, orthopedic, and spinal implants**. Biomaterials, 28 (32), 4845–69, 2007.
- KURTZ, S. M. PEEK Biomaterials Handbook. **Plastic Desing Library, 2012**. ISBN 13: 978-1-4377-4463-7.
- LEEUWENBURGH, S. C. G., ANA, I. D., JANSEN, J. A. **Sodium citrate as an effective dispersant for the synthesis of inorganic-organic composites with a nanodispersed mineral phase**. Acta Biomaterialia, 6, 836-844, 2010.
- MONICH, P. R., HENRIQUES, B., DE OLIVEIRA, N. P. A., SOUZA, M. C. J., FREDEL, C. M. **Mechanical and biological behavior of biomedical PEEK matrix composites: A focused review**. Materials Letters, 185, 593-597, 2016.
- MOSTAFA, N. H., ISMARRUBIE, M. S., SULTAN, M. T. H. **Fibre prestressed composites: Theoretical and numerical modelling of unidirectional and plain-weave fibre reinforcement**

**forms.** Composite Structures, 159, 410-423, 2016.

NAJEEB, S., ZAFAR, M. S., KHURDHID, Z., SIDDIQUI, F. **Applications of polyetheretherketone (PEEK) in oral implantology and prosthodontics.** Journal of Research Prosthodontic, 60, 12-19, 2016.

QUEIROZ, R. A. S. **Compósito de policaprolactona e carbonato de cálcio (PCLC): um novo biomaterial para enxerto.** Dissertação [Mestrado em Ciência de materiais] - Universidade Federal de Pernambuco, 2006.

REGO, B. T. **Avaliação do comportamento mecânico de nanocompósito de PEEK/nHA sob curta e longa duração para aplicação como biomaterial.** Dissertação [Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais] - Universidade Federal de São Carlos, 2012.

RIVIÈRE, L., CAUSSÈ, N., LONJON, A., DANTRAS, E., LACABANNE, C. **Specific heat capacity and thermal conductivity of PEEK/Ag nanoparticles composites determined by modulated-temperature differential scanning calorimetry.** Polymer Degradation and Stability, 127, 98-104, 2016.

WANG, L., ELE, S., LIANG, S., MU, Z., WEI, J., DENG, F., DENG, Y., WEI, S. **Polyetheretherketone/nanofluorohydroxyapatite composite with antimicrobial activity and osseointegration properties.** Biomaterials, 35, 6758-6775, 2014.

## AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DE PRODUTO TIPO CAVIAR DEFUMADO PROVENIENTE DA TRUTA ARCO-ÍRIS (*Onchorynchus mykiss*)

### **André Luiz Medeiros de Souza**

Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro (FIPERJ)  
Niterói – Brasil

### **Flávia Aline Andrade Calixto**

Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro (FIPERJ)  
Niterói – Brasil

### **Frederico Rose Lucho**

Médico veterinário autônomo  
Nova Friburgo – Brasil

### **Marcos Aronovich**

Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro (PESAGRO-Rio)  
Niterói – Brasil

### **Eliana de Fátima Marques de Mesquita**

Universidade Federal Fluminense, Faculdade de Veterinária, Departamento de Tecnologia de Alimentos  
Niterói – Brasil

**RESUMO:** No Brasil, experimentos com ovas de pescado de diferentes espécies de peixes vêm sendo realizados nos últimos anos em busca da ampliação de mercados e fortalecimento de agronegócios. O cultivo de truta arco-íris tem destaque na Região Serrana do Estado do Rio de Janeiro, e um dos produtos desenvolvidos é ova defumada. Objetivou-se a avaliação da qualidade microbiológica e

análise da composição centesimal de produto tipo caviar defumado, oriundo de truticulturas da Região Serrana do Estado do Rio de Janeiro, realizado com o intuito de auxiliar os aquicultores responsáveis na legalização do produto. Foram realizadas análises microbiológicas: pesquisa de *Salmonella* spp., contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo (UFC/g) e enumeração de coliformes totais e termotolerantes (NMP/g); e análises físico-químicas: matéria seca a 105°C; cinzas; proteína bruta (Micro Kjeldahl); lipídeos (método Blight-Dyer). Os resultados microbiológicos foram: coliformes totais - 13 NMP/100g; coliformes termotolerantes - < 2 NMP/100g; *Salmonella* spp. - ausência; *Staphylococcus* coagulase positivo – não detectado em 10g. Os resultados físico-químicos foram: 68,57% - umidade; 3,08% - cinzas/mineral; 17,77% - proteína; 16,61% – lipídeo. O produto analisado apresentou qualidade microbiológica satisfatória e composição centesimal aproximada aos produtos previamente produzidos. Quanto à qualidade nutricional, o destaque foi o alto percentual de proteína.

**PALAVRAS-CHAVE:** pescado; novos produtos derivados de pescado; qualidade de pescado; inovação tecnológica

**ABSTRACT:** In Brazil, experiments with fish roe of different species of fish have been carried

out in the last years in search of the expansion of markets and the strengthening of agribusiness. The cultivation of rainbow trout is highlighted in the Serrana Region of the State of Rio de Janeiro, and one of the products developed is smoked caviar. The objective of this study was to evaluate the microbiological quality and analysis of the centesimal composition of smoked caviar products from the State of Rio de Janeiro, in order to assist aquaculture producers responsible for legalizing the product. Microbiological analyzes were performed: *Salmonella* spp., *Staphylococcus* coagulase positive (CFU/g) and enumeration of total and thermotolerant coliforms (MPN/g); and physical-chemical analyzes: dry matter at 105°C; ashes; crude protein (Micro Kjeldahl); lipids (Blight-Dyer method). The microbiological results were: total coliforms - 13 NMP / 100g; thermotolerant coliforms - <2 NMP / 100g; *Salmonella* spp. - absence; *Staphylococcus* coagulase positive - undetected in 10g. The physical-chemical results were: 68.57% - humidity; 3.08% - ash/mineral; 17.77% - protein; 16,61% - lipid. The analyzed product presented satisfactory microbiological quality and approximate centesimal composition to the products previously produced. Regarding nutritional quality, the highlight was the high percentage of protein.

**KEYWORDS:** fish; new fish products; fish quality; technologic innovation

## 1 | INTRODUÇÃO

Os derivados de pescado são tradicionalmente processados e destinados para alimentação humana, como é o caso das ovas de muitas espécies de peixes. Considerados iguarias gastronômicas de alto valor comercial, recebem comumente o termo “caviar”, ao se referir ao produto oriundo das ovas de esturjão, ou sucedâneo de caviar, produzido a partir de ovas das demais espécies (Pereda et al., 2007).

No Brasil, experimentos com sucedâneos de caviar vêm sendo realizados nos últimos anos em busca da ampliação de mercados, fortalecimento de agronegócio e desenvolvimento de produtos alternativos (Johannesson, 2006). E assim como a matéria-prima, o sucedâneo é facilmente deteriorado em casos de manipulação, processamento e/ou armazenamento inadequados.

Com isso, objetivou-se a avaliação da qualidade microbiológica e composição centesimal de produto tipo caviar defumado, oriundo do cultivo de trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) da Região Serrana do Estado do Rio de Janeiro, realizado com o intuito de auxiliar o aquicultor responsável na legalização do produto.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletados aleatoriamente três frascos de vidro do produto tipo caviar congelado do mesmo lote para realização das análises microbiológicas e físico-químicas. Após identificação, as amostras (Fig.1) foram acondicionadas em caixas

de poliestireno expandido com quantidade suficiente de gelo e transportadas para o Centro Estadual de Pesquisa em Qualidade de Alimentos (CEPQA) para realização das análises em triplicata (ICMSF, 1986; APHA, 2015).

Quanto às análises microbiológicas, foram realizadas por semeadura “spread plate” a contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo (UFC/g), a enumeração de coliformes totais e termotolerantes através da técnica de Número Mais Provável (NMP/g) e a pesquisa de *Salmonella* spp. (Brasil, 2001; Brasil, 2003). Além disso, realizou-se as seguintes análises físico-químicas (Brasil, 2011): matéria seca a 105°C, cinzas e proteína bruta (metodologia de Micro Kjeldahl). Para lipídeos, o método Blight-Dyer foi utilizado (Blight e Dyer, 1959). Não foi indicada a realização de análise estatística pois ocorreu apenas uma coleta amostral. Com isso, os dados foram apresentados como a média dos resultados obtidos.



Fig.1: Amostra de sucedâneo de caviar oriundo da truta arco-íris

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados médios das avaliações microbiológicas são relatados na Tabela 1.

Análises bacteriológicas	Resultados médios
Coliformes totais	13 NMP/100g
Coliformes termotolerantes	< 2 NMP/100g
<i>Salmonella</i> spp.	Ausência
<i>S. coagulase</i> positiva	Não detectado

Tabela 1: Resultados médios das análises microbiológicas em amostras de caviar.

Os baixos valores encontrados sugerem que as ovas foram adequadamente processadas e manipuladas, prezando pela segurança do produto. A partir dos resultados obtidos, nota-se que a amostragem analisada encontrou-se dentro dos padrões estipulados pela legislação (Brasil, 2001), e, portanto, foi considerada com boa qualidade microbiológica e apta para consumo humano.

Observam-se similaridades dos resultados obtidos com dados anteriores na literatura. Por exemplo, em análise do produto oriundo de tainha, Ferreira et al. (2011) observaram que o mesmo estava em conformidade com os padrões nacionais e internacionais, a partir de valores baixos na contagem de microrganismos aeróbios viáveis ( $< 10^1$  UFC/g), de *S. coagulase positivo* ( $< 10^2$  UFC/g), na enumeração de coliformes termotolerantes ( $< 3$  NMP/g) e ausência de *Salmonella* spp.

Na Tabela 2, é possível visualizar os resultados médios obtidos nas análises físico-químicas.

<b>Análises físico-químicas</b>	<b>Resultados médios (%)</b>
Cinzas/mineral	3,08
Proteína	17,77
Lipídeos	16,61
Umidade	68,57

Tabela 2 – Resultados médios das análises físico-químicas em amostras de caviar

De acordo com Catarci (2004), o caviar fresco e granulado, oriundo do esturjão, não deve exceder os valores de 55% de umidade, teor mínimo de 18% de lipídeos e 23% de proteínas. Comparativamente ao presente estudo, observa-se que na truta os valores obtidos não atingiram o preconizado pelo autor supracitado, com exceção do resultado da umidade, superior no presente estudo. Tais diferenças podem ser notadas de espécie para espécie, assim como pelo processamento aplicado e o estado de maturação das gônadas (Espírito Santo et al., 2003).

#### **4 | CONCLUSÕES**

A partir dos dados encontrados, notou-se que a qualidade microbiológica e nutricional do produto é satisfatória, e o produto analisado apresentou composição centesimal aproximada à produtos produzidos em estudo prévios. Destacou-se nas amostras de sucedâneo de caviar o alto percentual de proteína. Com isso, há a indicação e incentivo aos produtores locais na produção das ovas tipo caviar de truta arco-íris para comercialização como maior lucratividade da produção, uma vez que esteja corretamente legalizado frente às legislações vigentes.

#### **5 | AGRADECIMENTOS**

Os autores gostariam de agradecer à Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro (FIPERJ) pela permissão dos técnicos para promoção da parte experimental do atual projeto, assim como a colaboração e parceria com o Centro Estadual de Pesquisa em Qualidade de Alimentos (CEPQA), cujos laboratórios foram

utilizados para realização das análises microbiológicas e físico-químicas. Gostaríamos de agradecer também aos produtores de truta arco-íris do município de Nova Friburgo que cederam as amostras de ovas defumadas do pescado.

## REFERÊNCIAS

- APHA – American Public Health Association. (2015). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 5a. ed. Washington: American Public Health Association.
- Blight, E. G., Dyer, W. J. (1959). **A rapid method of total lipid extraction and purification**. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 37(8): 911-917.
- Brasil, Ministério da Saúde. (2001). Aprova o Regulamento sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos e seus Anexos I e II. **Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 12, de 02 de janeiro de 2001**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil.
- Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2003). Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Instrução Normativa (IN) nº 62, de 26 de agosto de 2003**. Diário Oficial da União.
- Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2011). Aprova os Métodos Analíticos Oficiais Físico-químicos para Controle de Pescado e seus derivados. **Instrução Normativa nº 25, de 2 de junho de 2011**. Diário Oficial da União.
- Catarci, C. (2004). **Sturgeons (Acipenseriformes)**. In: World Markets and Industry of Selected Commercially – Exploited Aquatic Species with and International Conservation Profile, FAO Fisheries Circulars – C990. Roma: FAO.
- Espírito Santo, M. L. P., Beirão, L. H., Sant’Anna, E. S., Damian, C., Franco, B. D. G. M. (2003). **Avaliação da atividade bacteriocinogênica do *Lactobacillus sakei* na fermentação da sardinha-verdadeira (*Sardinella brasilienses*) utilizando glicose como carboidrato fermentescível**. Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, 21:83-98.
- Ferreira, F. A., Carbonera, N., Santo, M. L. P. E. (2011). **Influência do teor de NaCl no caviar à base de ovas de tainha (*Mugil platanus*)**. Revista do Instituto Adolfo Lutz, 70 (1):35-40.
- ICMSF – International Commission on Microbiological Specifications for Foods. (1986). **Microorganisms in Foods – 2: Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications**. 2a ed. Toronto: University of Toronto Press.
- Johannesson, J. (2006). **Lumpfish caviar - from vessel to consumer**. FAO Fisheries Technical Paper nº 485. Roma: FAO. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/009/a0685e/a0685e00.htm>> Acesso: 28 mar 2018.
- Pereda, J. A. O., Rodríguez, M. I. C., Álvarez, L. F., Sanz, M. L. G., Minguillón, G. D. G. F., Perales, L. H., Cortecero, M. D. S. (2007). **Tecnologia de Alimentos – Alimentos de origem animal Vol. 2**. Porto Alegre: Artmed.



## AVALIAÇÃO DO TESTE RÁPIDO PARA DETECÇÃO DO VÍRUS HIV EM APARECIDA DE GOIÂNIA – GO

### **Mariley Gomes da Silva Lucas**

Universidade Federal de Goiás, Programa de Pós-Graduação em Assistência e Avaliação em Saúde.

Goiânia – Goiás

### **Alexander Itria**

Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública.

Goiânia - Goiás

**RESUMO:** Desde sua descoberta a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) em inglês *Acquired Immunodeficiency Syndrome* (AIDS) tornou-se um problema de saúde pública mundial. O objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto do Teste Rápido para HIV, no município de Aparecida de Goiânia em comparação com o teste convencional. Trata-se de um estudo epidemiológico e transversal, de caráter retrospectivo com base em fontes de dados das notificações compulsórias de casos de HIV/AIDS no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan), no período de 2007 a 2015 em Aparecida de Goiânia. Observou-se que com a implantação do Teste Rápido no município, os casos detectados da infecção tiveram um acréscimo de mais de 404% em relação ao convencional (Elisa - Ensaio de Imunoabsorção Enzimática). Em perfil dos 454 pacientes elegíveis foi similar para

os dois exames, a faixa etária predominante está entre 20 a 34 anos. Os indivíduos mais acometidos são do sexo masculino e a categoria de exposição heterossexual. A raça/cor de mais de 70% dos indivíduos é parda e a escolaridade ensino médio completo. Quanto aos custos dos exames, o Teste Rápido custa dez vezes menos que o exame de laboratório convencional. Pode-se concluir que alguns dados são condizentes com a literatura e, outros, discordantes da realidade. Após os resultados apresentados evidencia-se que o maior impacto do Teste Rápido, constitui-se em ser uma ferramenta estratégica e vantajosa para detecção de casos de HIV/aids, então, contribui com o perfil epidemiológico para que as políticas sejam redirecionadas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Testes sorológicos. Avaliação. HIV. Teste Rápido.

**ABSTRACT:** Since its inception Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) in English has become a worldwide public health problem. The objective of this study was to evaluate the impact of the Rapid HIV Test in the city of Aparecida de Goiânia in comparison to the conventional test. This is an epidemiological and cross-sectional retrospective study based on data sources of compulsory notifications of cases of HIV / AIDS in the Notification System of Sinan (Sinan), from 2007 to 2015 in Aparecida

de Goiânia . It was observed that with the Rapid Test in the municipality, the detected cases of the infection had an increase of more than 404% in relation to the conventional one (Elisa - Enzyme Immunoabsorption Assay). The profile of the 454 eligible patients was similar for the two exams, the predominant age group being between 20 and 34 years. The most affected individuals are males and the category of heterosexual exposure. The race / color of more than 70% of the individuals is brown and the schooling completes high school. As for exam costs, the Rapid Test costs ten times less than the conventional lab exam. It can be concluded that some data are consistent with the literature and others are discordant with reality. After the results presented, it is evident that the greatest impact of the Rapid Test is to be a strategic and advantageous tool for the detection of HIV / AIDS cases, and thus contributes to the epidemiological profile so that the policies are redirected.

**KEYWORDS:** Serological tests. Evaluation. HIV. Rapid Test.

## 1 | INTRODUÇÃO

A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) tornou-se um problema de saúde em todo o mundo (MOURA; FARIA, 2017). A primeira descrição da Aids ocorreu em 1981 e desde então já ocasionou mais de 25 milhões de mortes no mundo todo, o que constitui uma das maiores epidemias (BRASIL, 2001; NUNES et al, 2015).

Globalmente, estima-se que 45% das pessoas que vivem com o HIV estão cientes do seu estado de HIV, muito abaixo da meta de 90% estabelecida recentemente pela OMS e UNAIDS (WHO, 2015). O maior número de pessoas vivendo com HIV não diagnosticado está na África Subsaariana, onde os sistemas de saúde e laboratórios frágeis têm dificultado os esforços para aumentar a cobertura do teste. Em países de baixa renda e alta carga de HIV com infraestrutura tecnológica limitada, os testes de diagnóstico rápido são amplamente utilizados em algoritmos de diagnóstico (BRASIL, 2001).

Os avanços no tratamento tornaram esta doença não apenas administrável, mas também diminuíram drasticamente a incidência de infecções oportunistas e também a progressão para a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). As diretrizes atuais sobre o tratamento do HIV são mais agressivas sobre quando iniciar o tratamento, uma vez que estudos recentes mostraram melhores resultados com o início precoce da terapia (BRASIL, 2015). O HIV é um retrovírus ribonucléico encapsulado do subgrupo lentivírus. Existem duas espécies de HIV que causam doenças humanas. O HIV-1 tem alta virulência e infectividade e é prevalente em todo o mundo, o HIV-2 tem menor virulência e infectividade e é mais prevalente na África Ocidental (WHO, 2015).

A prevalência do HIV aumentou em todo o mundo (WHO, 2015). Isso está relacionado ao aumento da sobrevivência de indivíduos infectados pelo HIV graças à terapia antirretroviral altamente ativa (NUNES et al, 2015). A incidência tem diminuído e espera-se que continue a diminuir com o aumento da conscientização sobre a doença

e o advento da terapia de profilaxia pré-exposição. A transmissão ocorre através da troca de fluidos corporais. A via de transmissão mais comum é a sexual através da mucosa anogenital (MOURA; FARIA, 2017).

Para que ocorra a infecção pelo HIV, o vírus deve encontrar uma maneira de entrar corrente sanguínea. É mais provável que isso aconteça se houver quantidades suficientes de o vírus no fluido (ou seja, sêmen, fluido vaginal e sangue ou leite materno), e um está exposto ao vírus por um longo tempo (NUNES et al, 2015).

A infecção aguda pelo HIV pode se manifestar como uma síndrome semelhante à mononucleose, com sintomas inespecíficos ou completamente assintomática (MOURA; FARIA, 2017). A infecção crônica não tratada progride para depleção de células e o desenvolvimento da síndrome da imunodeficiência adquirida com o surgimento de diferentes infecções oportunistas e comorbidades metabólicas, cardiovasculares, oncológicas e neurocognitivas.

Novos testes mais sensíveis para a detecção do HIV foram desenvolvidos e o algoritmo de diagnóstico foi revisado e atualizado recentemente. O teste rápido foi inicialmente utilizado em 1992 em países em desenvolvimento que não contavam com estrutura para realizar o exame Ensaio Imunoenzimático para HIV em inglês *Enzyme Linked Immunoassay* (ELISA). Desta forma, não foram inseridos aos programas de prevenção de forma imediata (BRASIL, 2015; REDOSCHI et al, 2017).

Pacientes que têm um resultado negativo ou indeterminado em um teste confirmatório devem ser testados com um teste de ácido nucléico. Um teste positivo indica infecção aguda pelo HIV-1. Um teste negativo indica um resultado falso positivo no teste inicial e o paciente deve ser considerado não infectado (WHO, 2015). Após a confirmação do diagnóstico e antes do início do tratamento, todos os casos devem ter uma contagem de células, carga viral, contagem metabólica e sanguínea completa, bem como testes de resistência genotípica ao vírus (MOURA; FARIA, 2017).

As diretrizes do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) recomendam exames de rotina para o HIV (WHO, 2015). Diante da importância da realização periódica de testes anti-HIV, como estratégia de prevenção na resposta programática à epidemia de HIV/AIDS, o teste rápido permite que os serviços de prevenção e cuidados se expandam para ambientes com infraestrutura de laboratório limitada (WHO, 2015; AFFELDT; SILVEIRA, BARCELOS, 2015). A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que, antes de sua implementação, os testes rápidos de HIV sejam avaliados primeiramente em um laboratório de referência e, em seguida, nos pontos de atendimento, e que sejam tomadas medidas para garantir a qualidade e confiabilidade dos testes.

No Brasil, conforme citado nas Portarias n. 008/1996 e 488/1998 da Secretaria de Vigilância Sanitária, somente conjuntos diagnósticos com registro da Vigilância Sanitária e submetidos a testes de análise prévia poderão ser comercializados no País. Os testes rápidos deverão ser realizados por profissionais de saúde devidamente capacitados e o sistema submetido a controle de qualidade, como é feito para os

laboratórios que realizam a sorologia convencional (BRASIL, 2010).

Segundo informações do Departamento de DST, aids e Hepatites Virais do Ministério da Saúde (MS), do período compreendido entre 1980 e junho de 2015 foram registrados no município de Aparecida de Goiânia, 1.185 casos de aids, destes, 756 pessoas do sexo masculino e 429 do sexo feminino. A taxa de detecção dos casos no período de 2003 a 2014 apresentou uma média de 14,10 casos por 100.000 habitantes. Apesar da taxa de detecção em homens ser maior que em mulheres no município, ambas apresentam tendência de crescimento (BRASIL, 2015). A utilização da tecnologia de teste rápido para detecção do vírus HIV teve início no segundo semestre do ano de 2011 (BRASIL, 2012).

No contexto do sistema nacional de saúde pública, é extremamente importante compreender a população com HIV, para implementar medidas direcionadas e baseadas em evidências que abordem os grupos mais afetados pela epidemia do HIV e os que mais correm risco de contrair doenças e transmissão (BRASIL, 2017; BRASIL, 2015).

O artigo tem como objetivo avaliar o impacto do teste rápido para HIV, no município de Aparecida de Goiânia em comparação com o teste convencional (Elisa).

## 2 | MÉTODOS

Trata-se de um estudo epidemiológico e transversal, de caráter retrospectivo conduzido entre 01 de janeiro de 2007 e 31 de dezembro de 2015, na cidade de Aparecida de Goiânia, localizada na Região Metropolitana da capital com uma população de 455.657 habitantes, com estimativa do ano de 2016 de 532.135 habitantes (BRASIL, 2018).

O estudo foi composto pelas informações registradas no banco de dados de notificações compulsórias dos casos de HIV/AIDS do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan) utilizando-se usuário da Secretaria Municipal de Saúde (SMS) de Aparecida de Goiânia e nas fichas de notificação de aids, além de registros do CTA e da Coordenação do Programa de DST/Aids e Hepatites Virais do município.

Para o perfil sociodemográfico dos pacientes com diagnóstico positivo para HIV com o teste rápido, o critério de inclusão foram pacientes de ambos os sexos, acima de 13 anos, com recorte temporal do período de janeiro de 2012 a dezembro de 2015. Foram excluídos aqueles que não apresentaram classificação/definição de caso ou apresentaram definição diferente de HIV ou aids, as notificações de pacientes menores que 13 anos e gestante com HIV.

Para verificar os valores de exames laboratoriais e comparar com o valor dos Testes Rápidos, foi utilizada a tabela de valores do Sistema Único de Saúde (SUS) do Sistema de Gerenciamento da Tabela de Procedimentos, Medicamentos e OPM do SUS (SIGTAP), disponível no site DATASUS.

Os dados foram digitados e manipulados em Excel, para posterior tratamento dos dados utilizando o programa *Statistical Package for Social Science* (SPSS) do Windows (versão 21.0). As variáveis foram apresentadas como valor absoluto (f) e valor percentual (%). O teste de Wilcoxon foi usado para comparar o valor do Teste Rápido em relação ao teste Elisa.

O teste Qui-quadrado foi usado para verificar a existência ou não de diferença significativa nas variáveis: Faixa etária, Raça, Orientação Sexual e Escolaridade dos pacientes detectados com AIDS antes e após o Teste Rápido. O teste de Fisher foi usado para testar a variável sexo antes e após o teste Rápido. Para todos os testes foi considerado nível de 95% de confiança, ou seja,  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

Foram analisados os critérios da Resolução do Conselho Nacional de Saúde (CNS) n. 466, de 12 de dezembro de 2012 e seus complementos<sup>14</sup>. Foram observados todos os princípios éticos e a confidencialidade dos dados dos pacientes incluídos no estudo. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Goiás (UFG) sob Parecer de n. 2.078.322.

### 3 | RESULTADOS

Os resultados obtidos a partir da análise epidemiológica das notificações de casos de HIV/AIDS realizadas no período de 2007 a 2015 foram relacionados na Tabela 1.

Casos detectados	Frequência	Percentual	p
Antes do Teste Rápido	90	19,8	< 0,001*
Após o Teste Rápido	364	80,2	
Total	454	100,0	

Tabela 1 – Distribuição dos casos detectados de aids antes se após o teste rápido.

Verifica-se o aumento progressivo no número de casos detectados de pessoas vivendo com HIV/AIDS no município de Aparecida de Goiânia. No período compreendido entre 2007 e 2011 foram diagnosticados 90 indivíduos com o exame convencional. O teste rápido começou a ser utilizado no mês de agosto de 2011. Desta forma, os usuários que buscaram o serviço para conhecer seu estado sorológico, foram apresentados à essa nova tecnologia. Acredita-se, portanto, que os diagnósticos realizados neste ano não tenham sofrido interferência significativa da utilização do teste rápido para HIV.

Do ano de 2012 até 2015 foram detectados 364 casos de HIV/AIDS. Observou-se que com a introdução dos testes rápidos no município e maior conhecimento da população acerca destes, os casos detectados da infecção tiveram um acréscimo de (404%).

Na Tabela 2, são descritos o perfil sócio demográfico dos pacientes diagnosticados pelo Teste Rápido. Quanto à faixa etária do paciente, observa-se em todos os anos que

a maior concentração de casos está em indivíduos adultos/jovens, com idade entre 20 e 34 anos (51,9%). Os indivíduos mais acometidos por HIV/aids em Aparecida de Goiânia são do sexo masculino (71,3%). No que diz respeito ao indicador raça/cor, as pessoas vivendo com HIV/AIDS são de cor parda (76,8%) de todos os indivíduos. Em relação à orientação sexual (56,9%) afirmaram ser heterossexuais.

Variáveis	Ano da notificação (n/%)							
	2012 (n=49)		2013 (n=51)		2014 (n=83)		2015 (n=181)	
	f	%	f	%	f	%	f	%
Faixa etária								
15-19	-	0,0	2	3,9	12	14,5	14	7,7
20-34	28	57,1	34	66,7	44	53,0	94	51,9
35-49	15	30,6	11	21,6	16	19,3	60	33,1
50-64	5	10,2	4	7,8	11	13,3	12	6,6
> 64	1	2,0	-	0,0	-	0,0	1	0,6
Sexo								
Masculino	30	61,2	37	72,5	63	75,9	129	71,3
Feminino	19	38,8	14	27,5	20	24,1	52	28,7
Raça								
Branca	3	6,1	5	9,8	16	19,3	22	12,2
Preta	3	6,1	2	3,9	4	4,8	7	3,9
Amarela	-	0,0	-	0,0	-	0,0	6	3,3
Parda	43	87,8	40	78,4	61	73,5	139	76,8
Indígena	-	0,0	1	2,0	-	0,0	-	0,0
Ign/Branco	-	0,0	3	5,9	2	2,4	7	3,9
Orientação Sexual								
Homossexual	13	26,5	14	27,5	37	44,6	63	34,8
Heterossexual	29	59,2	27	52,9	36	43,4	103	56,9
Bissexual	1	2,0	3	5,9	2	2,4	4	2,2
Ign/Branco	6	12,2	7	13,7	8	9,6	11	6,1

Tabela 2 – Frequência das variáveis sociodemográficas no teste rápido.

Na Tabela 3, são demonstrados que os indivíduos com HIV/aids diagnosticados com Teste Rápido em Aparecida de Goiânia possuem em sua maioria o Ensino Médio Completo (38,1%).

Variáveis	Ano da notificação (n/%)							
	2012 (n=49)		2013 (n=51)		2014 (n=83)		2015 (n=181)	
	f	%	F	%	f	%	f	%
Escolaridade								
Analfabeto	1	2,0	2	3,9	3	3,6	1	0,6

Ensino fund. incompleto	16	32,7	14	27,5	23	27,7	32	17,7
Ensino fund. completo	5	10,2	3	5,9	2	2,4	15	8,3
Ensino médio incompleto	4	8,2	5	9,8	17	20,5	25	13,8
Ensino médio completo	16	32,7	14	27,5	25	30,1	69	38,1
Educação Sup. incompleta	5	10,2	5	9,8	6	7,2	15	8,3
Educação Sup. completa	1	2,0	1	2,0	1	1,2	13	7,2
Ign/Branco	1	2,0	7	13,7	6	7,2	11	6,1

Tabela 3 – Frequência da escolaridade com o teste rápido.

Na Tabela 4, é demonstrado os percentuais de distribuição e comparação dos pacientes detectados com o HIV, segundo as variáveis antes e após a implantação do Teste Rápido. Foi possível notar que o perfil do paciente do teste convencional é similar ao do Teste Rápido, em relação à faixa etária, cuja maior concentração está em indivíduos adultos/jovens, com idade entre 20 e 34 anos (54,4%). Os indivíduos mais acometidos por HIV/aids são do sexo masculino (65,6%). Em relação à raça/cor, são de cor parda (77,8%), e a orientação sexual foi (61,1%) de pacientes heterossexuais.

Variáveis	Período em relação ao teste Rápido (n/%)				p
	Antes (n=90)		Após (n=364)		
	F	%	f	%	
<b>Faixa etária</b>					
15-19	3	3,3	28	7,7	
20-34	49	54,4	200	54,9	
35-49	28	31,1	102	28,0	0,337
50-64	8	8,9	32	8,8	
> 64	2	2,2	2	0,5	
<b>Sexo<sup>1</sup></b>					
Masculino	59	65,6	259	71,2	0,059
Feminino	31	34,4	105	28,8	
<b>Raça</b>					
Branca	17	18,9	46	12,6	
Preta	2	2,2	16	4,4	
Amarela	1	1,1	6	1,6	
Parda	70	77,8	283	77,7	0,412
Indígena	-	0,0	1	0,3	
Ign/Branco	-	0,0	12	3,3	
<b>Orientação Sexual</b>					

Homossexual	20	22,2	127	34,9	0,010*
Heterossexual	55	61,1	195	53,6	
Bisexual	7	7,8	10	2,7	
Ign/Branco	8	8,9	32	8,8	

Tabela 4 – Distribuição e comparação dos pacientes detectados com HIV segundo as variáveis antes e após o Teste Rápido.

Na Figura 1 é demonstrado o percentual de custos dos dois exames, o teste rápido para detecção de infecção pelo HIV tem o valor de R\$ 1,00 (um real), enquanto o exame convencional de laboratório – Pesquisa de anticorpos anti-HIV-1 + HIV-2 (ELISA) custa R\$ 10,00 (dez reais). Logo a cada teste rápido que o município realiza em detrimento do teste laboratorial, há uma economia de R\$ 9,00 (nove reais) por paciente. Assim, nestes nove anos considerando somente os casos diagnosticados, foram poupados R\$ 4.086,00 (quatro mil e oitenta e seis reais) com exames de triagem ao município.

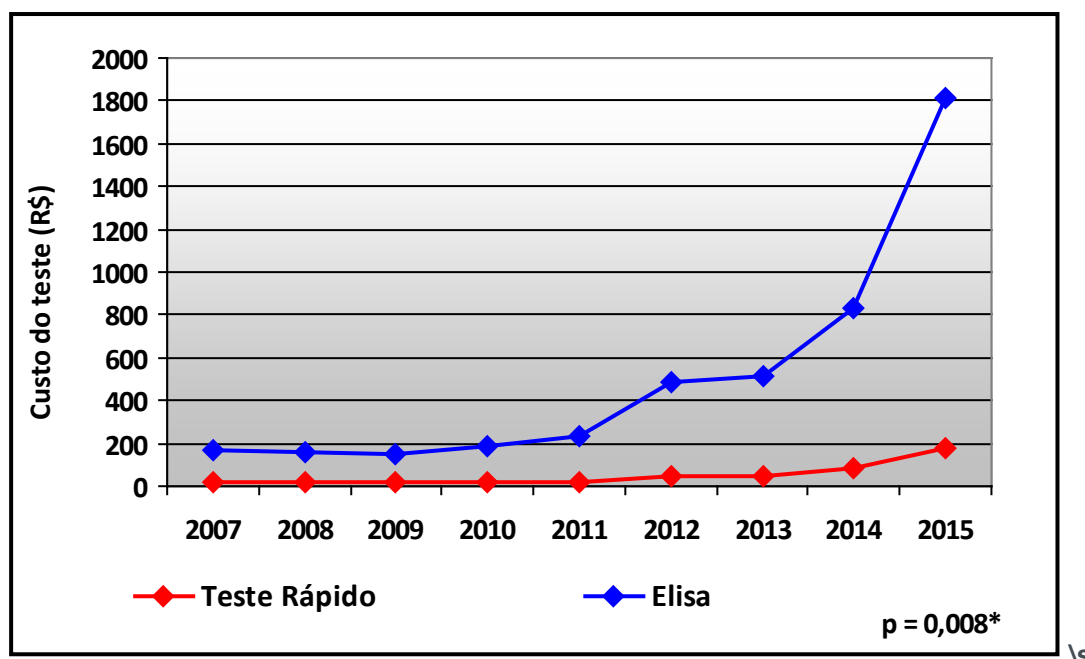


Figura 1 – Comparativo de custos financeiros com os dois testes.

#### 4 | DISCUSSÃO

Foram analisadas 454 fichas de notificação de indivíduos infectados pelo HIV em Aparecida de Goiânia. No estudo, foram obtidos dados que confirmam o aumento significativo (404%) na confirmação de casos de HIV com a utilização do teste rápido, diante deste alarmante número, Mizevski, *et al* (2017) demonstram que a disponibilidade dos testes rápidos constitui-se como uma relevante estratégia de enfrentamento. Diante destes resultados, nota-se a preocupação do CDC que em



2003, lançou a campanha Promovendo a Prevenção do HIV, cujo objetivo é aumentar o diagnóstico precoce de pessoas HIV positivas e encaminhar esses indivíduos para os serviços de saúde e prevenção. A iniciativa do CDC destaca a disponibilidade de testes rápidos de HIV (CDC, 2003).

Estudos demonstram que é necessário fornecimento adequado de testes para as unidades, ampliação da oferta do teste e expansão da capacitação para os membros da equipe de Estratégia de Saúde da Família (ESF). O estudo fornece subsídios para melhorar a prática de profissionais da área da saúde na testagem rápida anti-HIV (OMS, 2015). Ou seja, deve existir uma preocupação em oferecer um serviço de saúde público, que permite que o teste seja conduzido em uma variedade de ambientes não clínicos, com os resultados dos testes disponíveis para os clientes em até 30 minutos.

É possível reconhecer potencialidades e fragilidades na implementação do TR anti-HIV, de acordo com a literatura, em que o TR apresenta simplicidade no seu manuseio, e trouxe alterações significativas na gestão do tempo (SILVA; VALENÇA; SILVA, 2017).

Mizevski et al (2017) demonstram que dos estabelecimentos estudados, em 96,6% o teste para sífilis e em 86% o teste anti-HIV não estavam disponíveis. O teste em quantidade reduzida dificulta o acesso das populações ao exame. Atualmente, há um crescimento do número de casos de HIV entre heterossexuais, mulheres e população de baixa renda (SILVA; VALENÇA; SILVA, 2017).

A população diagnosticada, em sua maioria é jovem com idade entre 20 e 34 anos (51,9%), sendo que destes (71,3%) são homens. Uma pesquisa no Brasil evidenciou que os casos de aids encontram-se em indivíduos de faixa etária entre 25 e 39 anos para ambos os sexos. Há, ainda, similaridade com outras pesquisas, nas quais prevaleceram indivíduos do sexo masculino (MOURA; FARIA, 2017 ; BRASIL, 2015; NAVARRO et al, 2011), atualmente, são 16 homens acometidos para cada 10 mulheres (SILVA, 2005). Já, os achados de Ferreira, Souza e Rodrigues Junior (2015) houve também uma diferença significativa entre os sexos, em que (63,8%) eram do sexo masculino e (36,2%) do sexo feminino, dado condizente com este estudo.

Dos 364 pacientes elegíveis no estudo com o teste rápido, a população estudada mostra nível de escolaridade baixo, a maioria cursou até o ensino médio. Nos achados de Schuelter-Trevisol et al (2010) foi identificado que a grande maioria estudou menos de oito anos. Já Ferreira, Souza e Rodrigues Junior<sup>21</sup> afirmam que seu perfil é a maioria para o ensino fundamental incompleto. Moura e Faria (2017) demonstram que o tempo de estudo ficou em torno de 8 a 11 anos de estudos. O nível de escolaridade consiste em mais um fator que se associa ao novo panorama de epidemia de aids no Brasil. No início da epidemia, a maioria dos pacientes apresentava segundo grau e nível universitário; atualmente, esta maioria apresenta somente o primeiro grau escolar (BERTONI et al, 2010).

Em relação a raça, neste estudo foram, predominantemente, indivíduos de cor parda (76,8%). Em outro estudo, foi encontrada importante prevalência de indivíduos

considerados brancos (MOURA; FARIA, 2017 ; AFFELDT; SILVEIRA; BARCELOS, 2015).

Em relação à orientação sexual, os resultados demonstraram que (56,9%) são heterossexuais. A maioria dos pacientes (66%) do estudo de De Castro *et al* (2013) os pacientes revelaram terem adquirido o HIV em relações heterossexuais. Um estudo que corrobora com estes achados, demonstrou que com exceção da região Sudeste do país, o predomínio da categoria de exposição também foi heterossexual (DE CASTRO *et al*, 2013; BRASIL, 2016).

Além dos ganhos econômicos, o método do Teste Rápido é simples e fácil de usar e se constitui em um dos aspectos que o caracterizam como uma boa alternativa para o diagnóstico do HIV (SILVA; VALENÇA, SILVA, 2017).

No Brasil, o Aconselhamento e Testagem Voluntária (ATV) para o HIV é oferecido por serviços de aconselhamento e testagem financiados por fundos públicos (BRASIL, 2015; BERTONI, 2010; BRASIL, 2016). Nos últimos anos, ações para fortalecer o diagnóstico precoce e aumentaram a distribuição do teste rápido para e expandiram o número de instalações que fornecem ATV para o HIV. No entanto, o teste ainda é oferecido em grande parte em locais clínicos, e os programas de extensão permanecem escassos. Esta situação resulta em oportunidades perdidas de prevenção do HIV, particularmente para a maioria das populações em risco que podem não procurar testes em ambientes tradicionais baseados em instalações (BRASIL, 2015 ; BRASIL, 2016).

Ensaio de testes baseados na comunidade aumentaram a captação de testes entre populações-chave e podem facilitar a ligação aos cuidados (ARAUJO *et al*, 2014). É importante ressaltar que opções não invasivas para coleta de amostras, como testes baseados em saliva, podem facilitar o acesso e a aceitação do teste de HIV. Atividades de extensão de pares demonstraram ser eficazes em alguns países, e os níveis de renda aumentaram o uso do teste de HIV entre populações-chave, como HSH e indivíduos envolvidos em drogas. Além disso, o teste de HIV pode alcançar populações difíceis de alcançar que anteriormente não tinham acesso (ARAUJO *et al*, 2014 ; BARROS *et al*, 2017).

Diante do cenário epidemiológico do país e das necessidades não atendidas de prevenção, o Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais (DDAHV) do Ministério da Saúde do Brasil lançou uma intervenção em 2013 denominada “Viva Melhor Sabendo” (BRASIL, 2015). Este programa envolveu uma combinação de estratégias de prevenção e intervenção do HIV direcionadas aos grupos de maior risco, com medidas para alcançar um efeito sinérgico na redução da transmissão do vírus (ARAUJO *et al*, 2014).

Os componentes da intervenção foram previamente descritos em detalhe. Resumidamente, o programa consiste em um programa de extensão que oferece testes rápidos de HIV por via oral em pares a nível da comunidade. A DDAHV colabora com organizações da sociedade civil intimamente ligadas à populações chave, o que

é crucial para a concepção e implementação de toda a intervenção e permite que aqueles diagnosticados estejam conectados com o sistema de saúde (BARROS et al, 2017).

Diante das tantas discussões, nota-se que a testagem do HIV com o teste rápido é fundamental para os indivíduos em relação à prevenção e tratamento. Portanto, abordagens inovadoras que incorporam os diagnósticos mais simples são necessárias para alcançar o grande número de indivíduos que não estão cientes de que estão infectados pelo vírus (ARAUJO et al, 2014; SILVA; NASCIMENTO JUNIOR; RODRIGUES, 2014). Os testes rápidos disponíveis atualmente para o HIV demonstraram sensibilidades e especificidades comparáveis ao teste padrão, mesmo sem os requisitos de recursos sofisticados de laboratório e/ou pessoal altamente treinados (OMS, 2015).

Este estudo avaliou uma nova abordagem para diagnosticar o HIV, em que os testes rápidos para HIV estão sendo cada vez mais usados em vários cenários clínicos para diminuir o número de oportunidades perdidas para a detecção da infecção (SILVA; VALENÇA; SILVA, 2017 ; ARAUJO et al, 2014; BARROS et al, 2017). Seu uso é particularmente aplicável em contextos clínicos e não clínicos específicos; configurações de saúde pública; momento do parto e parto; em exposições ocupacionais; e em configurações com recursos limitados (BARROS et al, 2017).

Os objetivos em conseguir uma ampla implementação de testes rápidos para o HIV em outras realidades brasileiras, estão em aumentar o número de indivíduos conscientes de seu status sorológico, oportunizar a inclusão de pessoas com HIV em serviços de prevenção e cuidados e evitar mais transmissão do vírus. Desde 1996, o Ministério da Saúde, com o programa DST/AIDS, vem garantindo acesso universal e gratuito à Terapia Antirretroviral (TARV) a todas as pessoas portadoras do HIV e que tenham indicação de recebê-la (DE CASTRO et al, 2013).

Estudos sobre a transmissão sexual do HIV sugerem que as pessoas que desconhecem a sua infecção têm 3,5 vezes mais chances de transmitir o vírus a um parceiro do que indivíduos que estão cientes do seu estado de HIV (ARAUJO et al, 2014). Portanto, o fornecimento de oportunidades para testes generalizados e detecção precoce beneficiaria grandemente os esforços de prevenção. No entanto, devido ao estigma tradicionalmente associado ao HIV/aids, as recomendações e políticas que envolvem o uso do teste geralmente incluem requisitos para o aconselhamento extensivo sobre a doença, com a solicitação de consentimento explícito antes de obter o teste (BRASIL, 2016).

Tomados em conjunto, os resultados da vigilância e dos dados da pesquisa de base populacional revelam algumas tendências importantes, enquanto servem como desafios significativos que permanecem no contexto das disparidades sociais, econômicas e de acesso à saúde (BRASIL, 2015; BRASIL, 2016). Os avanços terapêuticos resultaram em redução da mortalidade, maior sobrevivência e melhor qualidade de vida entre os indivíduos infectados pelo HIV (ARAUJO et al, 2014). Campanhas de saúde pública

para fornecer educação, testes e tratamento, levam a uma possível diminuição no número de infectados.

Infecções por HIV transmitidas por transfusão e por homossexualidade foram diminuídas no Brasil. Por outro lado, os dados de vigilância indicam que as disparidades raciais/étnicas, de gênero e possivelmente socioeconômicas na infecção persistem. No entanto, as atuais estimativas de prevalência dos dados de vigilância não podem discriminar entre infecções novas e de longa duração e, portanto, não explicam adequadamente o impacto dessas disparidades no futuro da epidemia (BRASIL, 2015).

Em conclusão, programas de teste rápido para HIV devem ser implantados em toda a rede do SUS, principalmente pela economia financeira, a fim de diagnosticar um grande volume de pessoas e vincular pessoas HIV positivas ao tratamento, e também fornece por meio de educação mensagens de prevenção para toda a população brasileira. Brasileiros vêm incentivando o desenvolvimento de novos estudos científicos sobre as características epidemiológicas indivíduos com doenças infecciosas, com o objetivo de aumentar a visibilidade do sistema público de saúde brasileiro para investir em estratégias de prevenção e controle.

Por meio dos resultados apresentados e discutidos neste artigo, é possível considerar que as infecções detectadas por HIV atingiu heterogeneamente diferentes segmentos da população estudada, e que mesmo com a implementação do Teste Rápido a doença ainda está aumentando. Conhecimento do perfil epidemiológico e situação dos indivíduos com HIV são necessários para planejar e avaliar os cuidados de saúde.

A esse respeito, os achados do presente estudo não apenas fornecem apoio à elaboração de novas políticas de saúde, mas também melhorar a qualidade dos cuidados prestados a estes indivíduos em fornecer suporte científico para estudos futuros. As limitações deste estudo foi o desenho transversal.

## REFERÊNCIAS

AFFELDT AB, SILVEIRA MF, BARCELOS RS. **Profile of elderly people living with HIV/AIDS in Pelotas, Southern Brazil, 1998-2013.** Epidemiol Serv Saúde. 2015;24(1):79-86. DOI: <http://dx.doi.org/10.5123/S1679-49742015000100009>

ARAÚJO CLF, AGUIAR PS, SANTOS GKA, OLIVEIRA MGP, CÂMARA LS. **A testagem anti-HIV nos serviços de ginecologia do município do Rio de Janeiro.** Esc Anna Nery. 2014;18(1):82-9. [citado 2018 jul 11]. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/ean/v18n1/1414-8145-ean-18-01-0082.pdf>. DOI: 10.5935/1414-8145.20140012

BARROS CHD, SABIDÓ M, MIRANDA LTD, PASCOP RP, PASINI E, *et al.* **Community-Based Rapid HIV Testing in Brazil for Vulnerable Populations: Whom are We Reaching?** J AIDS Clin Res. 2017; 8:679. DOI:10.4172/2155-6113.1000679

BERTONI RF, BUNN K, DA SILVA J, TRAEBERT J. **Perfil demográfico e socioeconômico dos portadores de HIV/AIDS do Ambulatório de Controle de DST/AIDS de São José, SC.** Arqui Catari

de Medic. 2010;39(4).

BRASIL. Conselho de Saúde. **Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012.** [20 mar 2018] Disponível em: <http://conselho.saude.gov.br/resolucoes/2012/reso466.pdf>

BRASIL. IBGE. **Censo Demográfico 2010. Dados população de Aparecida de Goiânia.** [citado 2018 jul 6]. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/go/goiania/panorama>.

BRASIL. Ministério da Saúde do Brasil. **Boletim Epidemiológico – Aids XIV nº 2. Sobre a correção do atraso de notificação de aids no Brasil. Semanas Epidemiológicas 14 à 26. Abril a Junho de 2001.** Brasília, 2001. p. 31-40.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico - Aids e DST, A.e.H.V. Secretaria de Vigilância em Saúde.** Departamento de DST, Editor. 2015: Brasília.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde - Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Boletim Epidemiológico HIV/Aids.** Brasília, 2015. [citado 2018 jul 13]. Disponível em: [http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicação/2015/58534/boletim\\_aids\\_11\\_2015\\_web\\_pdf\\_19105.pdf](http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicação/2015/58534/boletim_aids_11_2015_web_pdf_19105.pdf).

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais,** Brasília, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Boletim epidemiológico HIV/AIDS.** Brasília: Ministério da Saúde, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria-Executiva. Área de Economia da Saúde e Desenvolvimento. **Avaliação de tecnologias em saúde: ferramentas para a gestão do SUS.** Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2012.

BRASIL. **Testes rápidos: considerações gerais para seu uso com ênfase na indicação de terapia anti-retroviral em situações de emergência.** Ministério da Saúde. 2010. [citado 2018 jul 6]. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/61testes\\_rapidos.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/61testes_rapidos.pdf)

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Advancing HIV prevention: new strategies for a changing epidemic** — United States, 2003. MMWR 2003, 52:329–332.

DE CASTRO AP, MAGALHÃES AAM, LIRIOB M, PASTEC AA. **Perfil socioeconômico e clínico dos pacientes internados com HIV/Aids em hospital de salvador, Bahia.** Rev Bai de Saúde Públ.2013;37(1):122-132.

FERREIRA, TCR, SOUZA APC, RODRIGUES JÚNIOR RS. **Perfil clínico e epidemiológico dos portadores do HIV/AIDS com coinfeção de uma unidade de referência especializada em doenças infecciosas parasitárias especiais.** Rev da Univer Val do Rio Ver. 2015;13(1): 419-431.

MIZEVSKI VD, , , , , et al. **Disponibilidade do teste rápido para sífilis e anti-HIV nas unidades de atenção básica do Brasil, no ano de 2012.** Saúde em Red.2017;3(1):40-49.

MOURA JP, FARIA MR. **Caracterização e perfil epidemiológico das pessoas que vivem com HIV/ aids.** Rev enferm UFPE. 2017;11(12):5214-20.

NAVARRO AMA, BEZERRA VP, OLIVEIRA DA, MOREIRA MAS, ALVES MSCF, GURGEL SN. **Representações sociais do HIV/AIDS: percepção dos profissionais da atenção primária à saúde.** Rev Pesqui Cuid Fundam. 2011. [citado 2018 jul 13]. Disponível em: [http://www.seer.unirio.br/index.php/cuidadofundamental/article/view/1966/pdf\\_529](http://www.seer.unirio.br/index.php/cuidadofundamental/article/view/1966/pdf_529)

NUNES AA, CALIANI LS, NUNES MS, SILVA AS, MELLO LM. **Análise do perfil de pacientes com HIV/Aids hospitalizados após introdução da terapia antirretroviral (HAART).** Ciênc & Saú Colet. 2015;20(10):3191-3198.

OMS. Organização Mundial de Saúde. Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS. **90-90-90: uma meta ambiciosa de tratamento para contribuir para o fim da epidemia de AIDS** [Internet]. Genebra: Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS; 2015. [citado 2018 jul 6]. Disponível em: [http://unaids.org.br/wp-content/uploads/2015/11/2015\\_11\\_20\\_unaids\\_tratamento\\_meta\\_pt\\_v4\\_gb.pdf](http://unaids.org.br/wp-content/uploads/2015/11/2015_11_20_unaids_tratamento_meta_pt_v4_gb.pdf)

REDOSCHI BRL, ZUCCHI EM, BARROS, CRS, PAIVA VSF. **Uso rotineiro do teste anti-HIV entre homens que fazem sexo com homens: do risco à prevenção.** *Cad. Saúde Pública.* 2017;33(4):e00014716.

S , PUCCI P, ZANETTA A, PUCCI N, SILVA ACB. **Perfil epidemiológico dos pacientes com HIV atendidos no sul do Estado de Santa Catarina, Brasil, em 2010.** *Epidemiol. Serv. Saúde.* 2013;22(1):87-94. [citado 2018 jul 11]. Disponível em:

SILVA ITS, VALENÇA CN, SILVA RAR. **Cartografia da implementação do teste rápido anti-HIV na Estratégia Saúde da Família: perspectiva de enfermeiros.** *Esc Ann Ner.* 2017;21(4). [citado 2018 jul 15]. Disponível em: [http://www.scielo.br/pdf/ean/v21n4/pt\\_1414-8145-ean-2177-9465-EAN-2017-0019.pdf](http://www.scielo.br/pdf/ean/v21n4/pt_1414-8145-ean-2177-9465-EAN-2017-0019.pdf)

SILVA JVF, NASCIMENTO JÚNIOR FJM, RODRIGUES APRA. **Fatores de não adesão ao tratamento antirretroviral: desafio de saúde pública.** *Ciênc Biol Saúde.* 2014;2(1):165-75. [citado 2018 jul 19]. Disponível em: <https://periodicos.set.edu.br/index.php/fitsbiosauade/article/view/1193/772>

SILVA LMS, GUIMARÃES TA, PEREIRA MLD, MIRANDA KCL, OLIVEIRA EN. **Integralidade em saúde: avaliando a articulação e a coresponsabilidade entre o Programa Saúde da Família e um serviço de referência em HIV/aids.** *Epidemiol Serv Saúde* [Internet]. 2005;14(2):97-104. [citado 2018 jul 13]. Disponível em: <http://scielo.iec.pa.gov.br/pdf/ess/v14n2/v14n2a05.pdf>

WHO. World Health Organization. **Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS).** Geneva: WHO; 2015.

## AVALIAÇÃO DOS ASPECTOS HIGIÊNICO-SANITÁRIOS DA COMERCIALIZAÇÃO DE PESCADO “IN NATURA” NO MERCADO DE PEIXES DO VER-O-PESO NO MUNICÍPIO DE BELÉM, PARÁ

### **Sheylle Marinna Martins Garcia**

Universidade do Estado do Pará (UEPA), Centro de Ciência Naturais e Tecnologia (CCNT), Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), Belém, Pará, Brasil.

### **Nathalia Rodrigues Cardoso**

Universidade do Estado do Pará (UEPA), Centro de Ciência Naturais e Tecnologia (CCNT), Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), Belém, Pará, Brasil.

### **Malena Marília Martins Gatinho**

Universidade Estadual de Goiás, PPG Mestrado em Ensino de Ciências (PPEC), Goiás.

**RESUMO:** Os pescados são altamente perecíveis e susceptíveis a uma série de contaminações biológicas, químicas e/ou físicas, e sua comercialização requer constante atenção, pois quando não manipulado corretamente, há favorecimento de sua deterioração. O trabalho teve como objetivo analisar os aspectos higiênico-sanitários da venda de pescado “in natura” no mercado de peixes do Ver-o-Peso, localizado no município de Belém do Pará, identificando possíveis riscos à saúde pública, com intuito de destacar os pontos críticos dessa comercialização. A pesquisa foi realizada no mês de março de 2018, participaram do estudo proprietários e manipuladores de pescado do referido mercado, que atualmente é composta por uma

equipe distribuída em 60 boxes. A coleta de dados se deu pelo método de observação, com aplicação de um *check-list* adaptado à norma resolutiva nº 275, de 21 de outubro de 2002. As condições higiênico-sanitárias encontradas nos boxes visitados, comprovaram que todos apresentavam um ou mais itens que estavam em desacordo com a resolução RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004, de forma que compromete a qualidade dos produtos e coloca em risco a saúde do consumidor.

**PALAVRAS-CHAVE:** pescado; manipulação; riscos; saúde.

**ABSTRACT:** Fish are highly perishable and susceptible to a series of biological, chemical and / or physical contaminations, and their commercialization requires constant attention, because when not manipulated correctly, there is favor of their deterioration. The objective of this study was to analyze the hygienic-sanitary aspects of the sale of fresh fish in the Ver-o-Peso fish market, located in the city of Belém do Pará, identifying possible public health risks, in order to highlight the critical points of this marketing. The research was carried out in March 2018, participated in the study owners and fish handlers of said market, which currently consists of a team distributed in 60 boxes. Data collection was done using the observation method, with a check list adapted to Resolution

No. 275, dated October 21, 2002. The hygienic-sanitary conditions found in the boxes visited confirmed that all had one or more items which were in disagreement with Resolution No. 216 of 15 September 2004, in a manner that compromises the quality of products and endangers the health of the consumer.

**KEYWORDS:** fish; manipulation; scratches; Cheers.

## 1 | INTRODUÇÃO

Conforme a definição contida no Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), pescado é todo animal que vive normalmente em água doce ou salgada usados na alimentação humana, tais como: peixes, crustáceos, moluscos, anfíbios, quelônios e mamíferos. (BRASIL, 1984). A carne de pescado se destaca nutricionalmente por conter proteínas de alto valor biológico, vitaminas, minerais como cálcio, fósforo, ferro, selênio e ácidos graxos poli-insaturados. (ANVISA, 2008).

Todavia, o pescado está entre os gêneros alimentícios mais susceptíveis ao processo de deterioração, isso se deve a associação de fatores intrínsecos e extrínsecos. Entre os fatores intrínsecos apresentam com maior relevância: grande atividade de água nos tecidos, alto teor de nutrientes, o que facilita a ação rápida e destrutiva de microrganismos e das enzimas presentes nos tecidos, microbiota com elevada atividade metabólica, o pH bem próximo a neutralidade, e apresenta grande quantidade de lipídeos insaturados. (Leitão, 1984; Alves *et al*, 2016).

Santos *et al*, (2016) afirma que, além de uma cadeia produtiva segmentada devida as grandes distancias, ainda, pela presença de atravessadores entre o pescador e o consumidor final, há necessidade da manutenção da cadeira de frio, com a finalidade de garantir as boas características sensorial e nutritiva do alimento.

A qualidade higiênico-sanitária tem sido abordada de forma continua na atualidade, tendo em vista os surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de 70% das enfermidades transmitidas pelos alimentos são de origem da manipulação inadequada. (VENTURINE, 2004). De acordo com Almeida *et al*. (2011), os manipuladores são os principais veículos de contaminação, e podem chegar a ser considerados como 26% das fontes de contaminação de alimentos.

Os hábitos irregulares podem procriar desmedidos distúrbios na saúde do consumidor. Dentre os microrganismos patogênicos potencialmente presentes destacam-se, o *Staphylococcus aureus* que causa a intoxicação alimentar estafilocócica, pois é resultado de contaminação do alimento por um portador humano, a manipulação é uma importante forma de contaminação ou transferência de microrganismos de um alimento para outro e está associada às condições higiênico-sanitárias dos próprios manipuladores. Os equipamentos e utensílios utilizados para a preparação das refeições, quando mal higienizados também são importantes meios para os surtos



de doenças alimentares (SOUZA et al., 2004). A intoxicação alimentar estafilocócica é caracterizada por vômitos intensos, diarreia, dor abdominal, febre e cefaléia e os sintomas geralmente duram menos de vinte e quatro horas.

A feira livre no Brasil é uma das práticas de mercado, ao ar livre, que está presente desde o período colonial, introduzida pelos portugueses, sendo o modelo de mercado periódico mais antigo e tradicional do país (ANDRADE, 2015). Essa prática tornou-se cada vez mais presentes nos logradouros públicos da maioria das cidades. As vantagens apontadas pelos consumidores são a facilidade para a escolha dos produtos e preços baixos. (MOURA, 2007).

O mercado está ligado a locais que se destacam pela comercialização de produtos “in natura”, dispondo da diversidade. Entretanto muitos apresentam sérios problemas no armazenamento, conservação e manipulação dos produtos e podem refletir diretamente na saúde do consumidor.

O Ver-o-Peso é um centro comercial localizado em uma das áreas mais antigas da cidade de Belém, é considerado cartão-postal da cidade e é também uma das mais famosas feiras do Brasil. Mas é, principalmente, um lugar que possui uma intensa vida social devido às suas atividades comerciais através das quais são percebidas práticas cotidianas de trabalho e pelas quais são construídas suas redes de relações. O Mercado do Ver-o-Peso, é um dos principais pontos de desembarque e comercialização de pescado do Brasil, tendo como os peixes mais consumidos na região a Dourada (*Salminus brasiliensis*), Filhote/piraba (*Brachyplatystoma filamentosum*) e pirarucu (*Arapaima gigas*). O mercado de peixe foi inaugurado em 1901, é constituído por uma estrutura metálica, do lado exterior e interior, com suas torres, colunas e escadas em ferro e zinco, foi toda forjada em Londres e Nova York, transportada e montada no local. Inicialmente o mercado abrigou a feira com a comercialização de frutas, verduras e demais produtos e somente depois passou a funcionar exclusivamente como Mercado de Peixe (Iphan 2015)

Este trabalho teve por objetivo avaliar as condições higiênico-sanitário na comercialização de pescado in natura no mercado de peixe Ver-o-Peso localizado no município de Belém-PA, com base na resolução RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004, identificando possíveis riscos a saúde.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no mercado de peixe Ver-o-Peso, localizado no município de Belém do Pará, durante o mês de março de 2018. Se trata de uma pesquisa de campo, de natureza exploratória qualitativa, com observação direta da realidade e preenchimento de check list pré-formatado, para averiguar a viabilidade do desenvolvimento da pesquisa. A escolha do referido mercado se deu pela tradicionalidade e referência na comercialização de pescados, que atende a um público das mais diversas regiões da

cidade.

Todos os proprietários e/ou manipuladores de pescado do mercado, foram convidados a participar do estudo, de ambos os sexos, com predominância do sexo masculino, entre a faixa etária de 25 a 60 anos os quais vivem exclusivamente da comercialização dos produtos ali ofertados. Apenas 12,16% dos manipuladores aceitaram participar do estudo.

Para avaliação higiênico-sanitária a elaboração do questionário foi baseada na RDC nº 216, com um total de 60 questões, para os itens de edificação, equipamentos/instrumentos, utensílios e higienização, vestuário, hábitos higiênicos, equipamentos de proteção individual e qualidade da matéria prima.

Após a aplicação do check list os dados tabulados foram agrupados, para avaliação do resultado e diagnóstico, dos principais itens referentes a condições higiênicos-sanitárias do estabelecimento.

### **3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Com base na RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004, da ANVISA, o mercado de peixes pesquisado apresenta algumas inconformidades, diagnosticadas a partir dos aspectos avaliados nos parágrafos que se segue.

O mercado de peixe contém no total 60 boxes, sendo que 10% encontram-se em desuso. Apresentam balcões fixos, e paredes revertidas de mármore entre eles, estações sanitárias e abastecimento de água. O piso e as paredes estão em conformidade, apresentando superfícies lisas, impermeáveis e laváveis, porém a cor não se encontra no padrão, visto que deveria ser de cor clara segundo a RDC nº 275, de 21 de outubro de 2002, no ponto 1.6.1, e alguns pisos encontram-se com rachaduras, facilitando o acúmulo de sujidades, logo procriação de microrganismos.

As caixas de gordura e de esgoto estão em áreas externas do local de manipulação, conforme a legislação. Os boxes não apresentam lixeiras próprias, assim o descarte de vísceras e escamas, proporciona o acúmulo de lixo, pois além dos resíduos orgânicos, copos e sacos plásticos foram encontrados no local (figura1). Os resíduos produzidos, são recolhidos várias vezes por dia pela própria prefeitura da cidade, porém, é visível o acúmulo de detritos nas redondezas do mercado, além da presença de animais (cachorros, gatos, urubus, ratazanas, baratas entre outros).



Figura 2: Dejetos no chão

As fiações elétricas estavam devidamente instaladas na estrutura de ferro. O local apresenta ventiladores, que por falta de manutenção e limpeza estão em desuso, por esse motivo o mercado conta com a ventilação natural do ambiente. A altura do teto contribui para circulação de ar junto com 4 portas laterais do mercado. As luminárias não são protegidas, logo, em caso de quebra acidental ou explosão da mesma, o pescado estará vulnerável a contaminação de natureza física.

Todos os boxes apresentam bancadas de aço inoxidáveis, porém os balcões não possuíam refrigerações, deste modo, o pescado fica exposto a elevadas temperaturas, o que propicia uma deterioração mais rápida, conforme mostra a figura:



Figura 2: Pescado exposto e sem conservação

Segundo RIISPOA, 1952, o pescado em natureza pode ser fresco, ou seja, destinado ao consumo sem ter sofrido qualquer processo de conservação, a não ser a ação do gelo. Visto que o resfriamento evita ou retarda as reações químico enzimáticas envolvido no processo de autólise e no desenvolvimento de microrganismo que contribui para deterioração dos alimentos. (ROSA, 2011).

Observou-se que 100% dos manipuladores fazem o uso de isopor térmico para a conservação dos produtos, entretanto, 99% dos isopores encontravam-se deteriorados e desgastados, apresentando fissuras onde há acúmulos de bactérias e sujidades. Apenas 46% fazem uso de refrigeração frigorífica, onde alguns apresentaram a

oxidação do ferro, conhecido também como ferrugem.

Notou-se que 100% dos comerciantes fazem uso de tábuas de cortar de material plástico e/ou madeira, não atendendo os padrões, pois segundo o regulamento da ANVISA, as superfícies dos utensílios utilizados na manipulação de alimentos devem ser lisas, impermeáveis, laváveis e estar isentas de rugosidades, frestas e outras imperfeições que possam comprometer a higienização dos mesmos e serem fontes de contaminações dos alimentos. Notou-se que há insuficiência de produtos de higienização e sanitização das mãos e utensílios nos boxes.



Figura 3: Área de manipulação

Ressalta-se o perigo representado pela ocorrência de microrganismos em pescado, indicador de contaminação oriunda de fossas nasais, boca e pele de manipuladores, bem como de sanitização inadequada de utensílios utilizados na manipulação, o que evidencia a importância do controle higiênico-sanitário em estabelecimentos industriais e comerciais, quanto ao pessoal, utensílios e superfícies que entram em contato com o produto (EVANGELISTA, 2001), visto que 100% dos manipuladores não faziam uso de luvas e máscaras, apenas 15% utilizavam toucas, enquanto 71% faziam utilização de chapéus e bonés como protetores e 14% nenhuma proteção dos cabelos, conforme a legislação da ANVISA, 4.6.6.

Os manipuladores devem usar cabelos presos e protegidos por redes, toucas ou outro acessório apropriado para esse fim, não sendo permitido o uso de barba; em relação aos aventais, 100% faziam uso do mesmo. 78% estavam devidamente calçados com botas e sapatos fechados, já 22% fazem uso de calçados abertos. Todos apresentavam vestimentas de cor clara.

Dos que resolveram participar da pesquisa, 100% afirmaram que apesar de ter a carteira do manipulador a mesma não é cobrada pela fiscalização, sendo que 62% não portava a mesma no momento, alegando receio de perder ou danificar o documento. Muitos dos manipuladores trabalham sem ajudantes e/ou funcionários, manipulando assim, o dinheiro e os produtos simultaneamente.

Observou-se também a presença de muitos objetos em desuso e estranho ao ambiente, como bicicleta, carrinhos de compras de supermercado, pá de material de

construção, entre outros.

Conforme o gráfico, observamos a frequência da higienização das mãos dos manipuladores, que afirmam lavar 2 ou 3 vezes por dia durante a manipulação. Observou-se que os aventais usados permaneciam no local, expostos a contaminações de natureza química e biológica. Afirmavam também, ao final do expediente, que lavavam os utensílios, e alguns durante a manipulação.



Gráfico 1 – Frequência de higienização das mãos, dos aventais e dos utensílios.

As análises gerais da adequação dos boxes estão representadas no gráfico a seguir; visando, que cada box foi identificado por letras do alfabeto, segundo a RDC nº 216/2004:

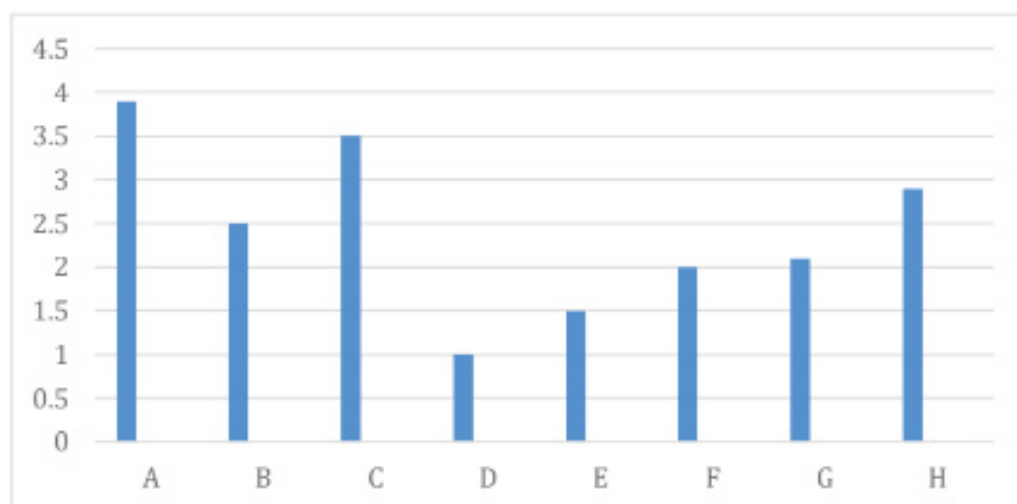


Gráfico 2 – Adequação geral das condições higiênico-sanitárias dos boxes

Foi realizado uma pesquisa com os consumidores em relação a satisfação das condições do local e dos produtos, onde a porcentagem satisfeita é similar a porcentagem não satisfeita e que não tinha opinião formada sobre, observou-se que a satisfação está diretamente ligada a cultura local.



Gráfico 3 – Satisfação dos consumidores

#### 4 | CONCLUSÕES

O mercado de peixe do Ver-o-peso no município de Belém do Pará não atende aos padrões preconizados de higiene, sanidade e acondicionamento dos produtos comercializados, permitindo considerar que os produtos ofertados podem impor possíveis riscos à saúde do consumidor, visto que, uma parcela considerável dos manipuladores não apresenta parâmetros ideais de boas práticas de manipulação dos pescados.

Dessa forma, é imprescindível que haja capacitações de manipuladores periodicamente, alertando aos cuidados e exigências das legislações. Fazendo-se necessário maior rigidez das fiscalizações dos órgãos competentes. Neste âmbito, diante do exposto, é de fundamental importância adotar devidas medidas para que se obtenha melhorias na qualidade de comercialização, incluindo condições de trabalho dos próprios manipuladores. Não obstante, são necessários estudos aprofundados, com análises físico-químicas e análises microbiológicas para determinar os riscos ali ofertados.

#### AGRADECIMENTOS

A elaboração deste trabalho não teria sido possível sem a colaboração, estímulo e empenho de diversas pessoas. Gostaríamos de agradecer principalmente aos manipuladores e consumidores do mercado de peixe do Ver-o-peso. A todos manifestamos nossos sinceros agradecimentos, agradecemos o modo que se disponibilizaram na contribuição da pesquisa.

#### REFERÊNCIAS

ANDRADE, A. A. **A FEIRA LIVRE DE CAICÓ/RN**: um cenário de tradição e resistência às novas estruturas comerciais modernas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade

Federal do Rio Grande do Norte/UFRN, Caicó, 2015.

ALMEIDA, R. B.; ANDRADE, L. P.; BRANDESPIM, D. F.; DINIZ, W. J. S.; DINIZ, W. P. S.; LEAL, J. B. G.; SILVA, P. T. V.; **CONDIÇÕES HIGIÊNICO-SANITÁRIAS DA COMERCIALIZAÇÃO DE CARNES EM FEIRAS LIVRES DE PARANATAMA, PE. Alimentos e Nutrição**, v. 22, n. 4, 2011.

BRASIL. 1997. Portaria n. 326 de 04 de setembro de 1997. DISPÕE O “ **REGULAMENTO TÉCNICO SOBRE AS CONDIÇÕES HIGIÊNICO- SANITÁRIO E DE BOAS PRÁTICAS DE FABRICAÇÃO PARA ESTABELECIMENTO ELABORADOS / INDUSTRIALIZADORES DE ALIMENTOS**”. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. RIISPOA - **REGULAMENTO DA INSPEÇÃO INDUSTRIAL E SANITÁRIA DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL**. Decreto nº 30691, de 29/03/52. Brasília/DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 1952.

BRASIL. **RESOLUÇÃO RDC Nº 216 DO MINISTÉRIO DA SAÚDE** - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2004a. Diário Oficial da União, Brasília, DF.

EVANGELISTA, J. Tecnologia de Alimentos. 2ed. São Paulo: pág. 664, 2001

JOSUPEIT, H. **FUTURE DEMAND OF FISH AND IMPACT ON TRADE. GLOBEFISH. FISH UTILIZATION AND MARKETING SERVICE**. Fisheries department, FALL, Home. 2004 [online] <http://>:

IPHAN. **MERCADO DE FERRO: RESTAURAÇÃO E CONSERVAÇÃO 2010/2015** / organização, Carla Ferreira Cruz, Fernando José de Mesquita e Giovanni Blanco Sarquis. – Belém, PA: Iphan-PA, 2015. 32 p.; 20 x 20 cm

LEITÃO, M.F.F. **DETERIORAÇÃO MICROBIANA DO PESCADO E SUA IMPORTÂNCIA EM SAÚDE PÚBLICA. HIGIENE ALIMENTAR**. São Paulo, v.3, n.3/4, p.143-152, 1984.

MACEDO, A. R. G.; SILVA, F. N. L.; SAMPAIO, L. S. O.; RIBEIRO, S. C. A. **ANÁLISES DAS CONDIÇÕES HIGIÊNICO-SANITÁRIAS NA VENDA DE PESCADO “IN NATURA” NO MERCADO DE PEIXE NO MUNICÍPIO DE CASTANHAL-PA, BRASIL**. 3º Congresso Internacional de Tecnologias para o Meio Ambiente. Bento Gonçalves-RS, Brasil. 2012.

MOURA, H. F. **QUALIDADE DOS ALIMENTOS NO CONTEXTO DA POLÍTICA DE SEGURANÇA ALIMENTAR: estudo de Caso numa Feira Livre Tradicional de Fortaleza**. 2007. 114p Tese (Mestrado em Planejamento de Políticas Públicas)- Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2007.

ROSA, M. P. **OS FATORES QUE INFLUENCIAM NA QUALIDADE DO PESCADO**. 2001. Pós-Graduação em Saúde Pública. Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública. São Paulo, 2001

SANTOS, E. H. B.; ALVARENGA, F. K. M.; NOGUEIRA, S. M. V.; RIBEIRO, I. C. D. **AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES HIGIÊNICO-SANITÁRIAS NO COMÉRCIO DE PESCADOS EM UM MERCADO DO PEIXE**. *Journal of Health Sciences*, v. 18, n. 3, p.151-158, 2016.

SOUZA, R.R. et al. **TÉCNICA DA SIMULAÇÃO APLICADA AO TREINAMENTO DE MANIPULADORES DE ALIMENTOS, COMO RECURSO PARA A SEGURANÇA ALIMENTAR DE REFEIÇÕES TRANSPORTADAS**. *Revista Higiene Alimentar*, v.18, n.122, p.21-24, 2004.

VENTURI, I.; SANT’ANNA, L. C.; CRISPIM, S. P.; BRAMORSKI, A.; MELLO, R. M. A. V. de. **TREINAMENTO PARA CONSERVAÇÃO E HIGIENE DOS ALIMENTOS: UMA PROPOSTA PARA A PRÁTICA EDUCATIVA**. *Revista Higiene Alimentar*, São Paulo, v. 18, n. 125, p. 32-35, out. 2004.

## CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DE *NUGGETS* DE FRANGO ENRIQUECIDO COM B-GLUCANA

### **Evellin Balbinot-Alfaro**

Universidade Federal Tecnológica do Paraná (UTFPR), Departamento de Tecnologia de Alimentos, Medianeira-Paraná.

### **Karen Franzon**

Universidade Federal Tecnológica do Paraná (UTFPR), Departamento de Tecnologia de Alimentos, Medianeira-Paraná.

### **Kari Cristina Pivatto**

Universidade Federal Tecnológica do Paraná (UTFPR), Departamento de Tecnologia de Alimentos, Medianeira-Paraná.

### **Alexandre da Trindade Alfaro**

Universidade Federal Tecnológica do Paraná (UTFPR), Departamento de Tecnologia de Alimentos, Francisco Beltrão-Paraná.

### **Cristiane Canan**

Universidade Federal Tecnológica do Paraná (UTFPR), Departamento de Tecnologia de Alimentos, Medianeira-Paraná.

**RESUMO:** O objetivo deste trabalho foi desenvolver um *nuggets* de frango enriquecido com B-glucana, variando o percentual de fibra (B-glucana) e emulsão, com o intuito de obter um alimento funcional. Foi realizado um planejamento experimental, empregando um planejamento fatorial 2<sup>2</sup> com triplicata no ponto central, totalizando sete ensaios. Os *nuggets* foram avaliados de acordo com o preconizado pela legislação vigente para

produtos empanados, os resultados das análises para ambas as formulações se apresentaram de acordo com o preconizado pela legislação. Todas as amostras foram analisadas sensorialmente e a melhor aceita pelos julgadores foi a formulação (F) 6. O teor de fibra foi analisado e a F6 apresentou 16% de fibra alimentar. De acordo com a legislação vigente, este percentual de fibras indica que o *nuggets* de frango enriquecido com B-glucana pode ser considerado uma opção de alimentos atrativa enriquecido com fibra. Caracterizando como alimento funcional quando associado a uma dieta equilibrada e hábitos de vida saudável.

**PALAVRAS-CHAVE:** Fibra; alimento funcional; reestruturado; empanado.

**ABSTRACT:** This work aimed to develop a  $\beta$ -glucan enriched chicken nugget, varying the fiber ( $\beta$ -glucan) percentage and emulsion, in order to obtain a functional food. It was performed an experimental planning, using a 2<sup>2</sup> factorial planning with triplicate at the central point, totalizing seven essays. The nuggets were evaluated according to the recommended by current legislation for breaded products. The analyses results for both formulations presented themselves according to the recommended by current legislation. All samples were analyzed sensorially and the best accepted by the judges



was the formulation 6 (F6). The fiber content was analyzed and the F6 formulation presented 16% of food fiber. According to current legislation, this fiber percentage indicates that the  $\beta$ -glucan enriched chicken nugget can be considered an attractive high-fiber food option, and can be characterized as functional food when associated to a balanced diet and healthy lifestyle habits.

**KEYWORDS:** Fiber; functional food; restructured; breaded.

## 1 | INTRODUÇÃO

A Instrução Normativa nº 6 de 15 de fevereiro de 2001 do Ministério da Agricultura define o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Empanados, como o produto cárneo industrializado, obtido de carnes de diferentes espécies de animais de açougue, acrescido de ingredientes, moldado ou não, recheado ou não, e revestido de cobertura apropriada (BRASIL, 2001). Dentre eles, destacam-se os produtos reestruturados e empanados, tipo *nuggets*, cuja elaboração é dada pela desintegração da carne por processos mecânicos, seguido da mistura dos ingredientes, moldagem em porções específicas, congelamento, empanamento com cobertura apropriada e algumas vezes pré-fritos para realizar o cozimento parcial ou completo do produto (BRESSAN; PERES, 2001). Os empanados podem apresentar diferentes formatos, matérias-primas e modos de apresentação e comercialização.

Por se tratar muitas vezes de um produto semi-pronto ou pronto, os *nuggets* são de fácil e rápido preparo com elevada aceitação pelos consumidores de produtos cárneos, fato este que juntamente à mudança de hábitos alimentares contribui para o desenvolvimento cada vez maior de produtos alimentícios semi-prontos ou prontos.

O empanamento além de contribuir com o sabor e textura do produto empanado, retarda a oxidação, protege a carne da desidratação e queima pelo frio durante o congelamento, desse modo aumentando a vida útil deste alimento (NOLETO et al., 2017).

A indústria alimentícia tem introduzido produtos cada vez mais funcionais com aplicações saudáveis, reunindo em um único produto mais de um atributo funcional para torná-lo atrativo aos consumidores. Esse movimento é decorrente da mudança de comportamento dos consumidores, mais conscientes agora em relação à sua saúde e bem-estar e, portanto, em busca de alimentos que ofereçam benefícios relacionados à saúde (POLIZER, et al., 2015). A aveia é um alimento reconhecido pelo seu teor e qualidade de fibras alimentares que possui propriedade de redução do colesterol sanguíneo, prevenindo doenças do coração, em sua composição química aminoácidos, ácidos graxos, vitaminas, sais minerais e fibras alimentares (MIRA; GRAF; CÂNDIDO, 2009).

Segundo a *American Dietetic Association*, as fibras alimentares apresentam alegação de alimento funcional, uma vez que auxiliam no funcionamento do intestino (ADA, 1999). A fibra alimentar B-glucana, presente na aveia, promove a redução da

absorção do colesterol, devendo o alimento fornecer no mínimo 3 g de B-glucana, proveniente da aveia, para ser considerado como tal. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária sugere a ingestão de líquidos para acompanhar o consumo desse produto. Os alimentos funcionais correspondem de 5 a 7% dos alimentos no comércio mundial, seu consumo aumentou consideravelmente devido a preocupações individuais com a saúde (CARVALHO et al., 2013).

O desenvolvimento de *nuggets* de frango enriquecido com B-glucana visa enriquecer ainda mais a variedade de produtos empanados e pré-prontos ofertados pelo mercado. Percebendo-se assim um nicho de mercado a ser explorado devido à funcionalidade e a busca por alimentos mais saudáveis.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Materiais

A B-glucana foi fornecida pela SL Alimentos, os aditivos e ingredientes utilizados para o empanamento foram de diferentes marcas comerciais e adquiridos no comércio local. As matérias primas de frango utilizadas foram gentilmente cedidas pela Unidade Industrial de Aves – LAR, localizada em Matelândia – PR. Os reagentes foram de diferentes procedências e pureza analítica.

### 2.2 Métodos

As matérias primas utilizadas na elaboração dos *nuggets* enriquecidos com B-glucana foram coxa e sobre coxa desossada, CMS (carne mecanicamente separada de frango) e pele de frango. As formulações dos *nuggets* basearam-se no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Empanados (BRASIL, 2001) e foram desenvolvidos em escala piloto. Todo o projeto foi realizado nos laboratórios de Tecnologia em Alimentos da UTFPR – Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Medianeira – PR. Posteriormente submetidos às análises físico-químicas, microbiológicas e sensorial.

#### *2.2.1 Planejamento experimental para o preparo de nuggets de frango enriquecido com B-glucana*

Para elaboração dos *nuggets* de frango enriquecidos com B-glucana foi empregado um planejamento fatorial  $2^2$  com triplicata no ponto central, totalizando sete ensaios (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 1996). As variáveis independentes foram B-glucana (%) e emulsão (%), enquanto as variáveis dependentes foram sabor, cor, aroma e avaliação global. Utilizando o *software* STATISTICA 7.0. A Tabela 1 apresenta as variáveis independentes e seus respectivos níveis reais e codificados.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
B-glucana (%)	5	10	15
Emulsão (%)	40	45	50

Tabela 1 – Níveis e fatores do planejamento fatorial completo

### 2.2.2 Preparo do Nuggets

As matérias-primas e os ingredientes foram pesados de acordo com as formulações apresentadas nas Tabelas 2 e 3. Elaborou-se 7 formulações, variando-se a quantidade de fibra (B-glucana) e emulsão.

A coxa e sobre coxa desossada foram submetidas à moagem em multiprocessador (Marca: Arno) até granulometria considerada desejada. Separadamente, a emulsão foi preparada também em multiprocessador sendo adicionados a proteína concentrada de soja, o gelo picado, a pele de frango e a CMS e homogeneizados até consistência adequada. A mistura da carne de frango moída, o pré-mix dos condimentos e a emulsão foi realizada manualmente. Os *nuggets* foram moldados em molde retangular com espessura de aproximadamente 0,5 cm. Posteriormente, foram cobertos com filme de polietileno e congelados em *freezer* (-18 °C) (Congelamento I) por 24 h. A massa congelada foi desenformada e cortada em quatro partes (2,25 cm de comprimento e 2 de largura) e empanada. O empanamento consistiu da adição de *predust* (pré-enfarinhamento) empregando amido de milho (marca: Maizena), *batter* (solução de empanamento) preparado conforme apresentado na Tabela 2 e *breader* (farinha de cobertura) fornecida pela Kerry do Brasil (Campinas, SP). Posteriormente, foram congelados a - 18 °C (Congelamento II). Para a pré-fritura foram mantidos a 4 °C ± 1 °C, por 3 h e pré-fritos em óleo de soja por 1 min à temperatura de 180°C ± 1 °C.

Ingredientes	F1 (%)	F2 (%)	F3 (%)	F4 (%)	F5, F6, F7 (%)
Coxa e sobre coxa desossada	40	40	30	50	40
Emulsão	40	50	50	40	45
Gelo picado	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6
Sal	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4
Eritorbato de sódio	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Tripolifosfato de sódio	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Alho desidratado	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12
Tempero verde	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12
Pimenta branca	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Cebola desidratada	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
Solução de Ácido Cítrico 1%	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
B-glucana	15	5	15	5	10

Tabela 2 – Formulação dos nuggets enriquecidos com B-glucana

	Insumos	Quantidade (%)
Emulsão	Pele de frango	32
	CMS	30
	Água (gelo picado)	32
	Proteína concentrada de soja	6
Batter	Água	67
	Farinha de trigo	10
	Amido de milho	10
	Leite em pó	4
	Carragena	1
	Sal	8

Tabela 3 – Formulação da emulsão e do batter utilizados na elaboração dos nuggets de frango enriquecidos com B-glucana

Os *nuggets* prontos foram embalados em embalagens de polietileno e congelados à  $-18\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . As análises físicas, químicas, microbiológicas e a estabilidade lipídica foram realizadas em triplicata.

### 2.2.3 Análises físico-químicas e microbiológicas

Os teores de umidade, proteína, lipídeos, cinzas e fibras alimentares do *nuggets*, foram determinados de acordo com a Official Methods of Analysis AOAC (2005).

### 2.2.4 Análises microbiológicas

Anterior a análise sensorial, foram realizadas análises microbiológica de Coliformes a  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  e a  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ , Estafilococos coagulase positiva e *Salmonella sp.* de acordo com a Instrução Normativa n. 62 (BRASIL, 2003) e os resultados foram comparados com a Resolução – RDC n. 12 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que estabelece o Regulamento Técnico dos Padrões Microbiológicos para Carnes e Produtos Cárneos (BRASIL, 2001).

### 2.2.5 Análise Sensorial

Para avaliar a aceitabilidade do produto foi realizada avaliação sensorial utilizando o teste da Escala Hedônica de 7 pontos (desgostei muitíssimo a gostei muitíssimo). Foi realizada em cabines individuais e luz branca do Laboratório de Análise Sensorial da UTFPR, Câmpus Medianeira, com 40 julgadores não treinados, selecionados aleatoriamente, constituídos por acadêmicos, professores e servidores da UTFPR. O preparo das amostras para análise sensorial foi realizado em forno elétrico pré-aquecido durante 10 minutos à temperatura de  $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ , mantidas por um tempo de 25 min ou até temperatura interna de  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, as amostras (20 g por julgador) foram servidas em prato descartável branco e codificadas com três

dígitos.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises microbiológicas dos *nuggets* de frango enriquecido com B-glucana para cada formulação estão expressos na Tabela 4. De acordo com os resultados, atenderam os padrões higiênico sanitários (Brasil, 2001) e estão próprios para consumo humano, segundo a RDC n. 12. Em *nuggets* de frango é aceitável a presença de coliformes a 45 °C até 10<sup>3</sup> UFC/g, todas as amostras apresentaram valor inferior a 10 UFC/g. Os resultados de Coliformes a 45 °C e Estafilococos coagulase positiva apresentaram-se inferior a 10<sup>-1</sup> UFC/g e para *Salmonella sp.*, ausência em 25 g. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4 todas as formulações estão próprios para consumo, conforme legislação vigente.

Formulações	Coliformes a 35°C	Coliformes a 45°C	Estafilococos coagulase positiva	<i>Salmonella sp.</i>
1	1,0X10 <sup>1</sup> UFC/g	<10 UFC/g	<10 UFC/g	Ausência em 25 g
2	3,5X10 <sup>1</sup> UFC/g	<10 UFC/g	<10 UFC/g	Ausência em 25 g
3	2,0X10 <sup>1</sup> UFC/g	<10 UFC/g	<10 UFC/g	Ausência em 25 g
4	<10 UFC/g	<10 UFC/g	<10 UFC/g	Ausência em 25 g
5	2,5X10 <sup>1</sup> UFC/g	<10 UFC/g	<10 UFC/g	Ausência em 25 g
6	<10 UFC/g	<10 UFC/g	<10 UFC/g	Ausência em 25 g
7	<10 UFC/g	<10 UFC/g	<10 UFC/g	Ausência em 25 g

Tabela 4 – Análises microbiológicas de nuggets de frango enriquecido com B-glucana

#### 3.1 Análise Proximal

A tabela 5 ilustra os resultados para análise proximal dos *nuggets* de frango enriquecidos com B-glucana. Os resultados apresentaram similaridade entre as formulações, indicando que a B-glucana e a emulsão nos níveis avaliados, não apresentaram efeitos significativos nas variáveis respostas, teor de carboidratos totais, lipídios e proteínas.

Os resultados obtidos para as análises dos *nuggets* de frango enriquecido com B-glucana foram de carboidratos totais variaram de (2,2% a 3,7%), lipídeos (17,9% a 21,8%) e proteínas (10,1% a 11,6%).

O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Empanados (Brasil, 2001), estabelece as características físico-químicas, para produto empanado, consta que o valor máximo para carboidratos totais é 30% e para proteína é no mínimo 10%. Desta forma, de acordo com os critérios estabelecidos para a legislação em vigor, todas as formulações de *nuggets* de frango enriquecidos com B-glucana apresentaram-se de acordo com o valor prescrito pela legislação vigente.

Formulação	Carboidratos Totais (%)	Lipídios (%)	Proteínas (%)
1	3,2	21,7	10,9
2	2,3	18,9	10,1
3	2,3	17,9	10,2
4	2,2	17,6	10,4
5	2,6	19	10,2
6	3,7	21,8	11,6
7	3,2	18,3	10,6

Tabela 5 – Resultados das análises proximal dos nuggets de frango enriquecidos com B-glucana

Os *nuggets* de frango enriquecido com B-glucana, apresentaram 18% a 21% de lipídeos, os valores são similares aos encontrados por Polizer et al (2015), que obtiveram 10 a 14% em *nuggets* de frango com substituição parcial de carne e gordura por fibra de ervilha.

Conforme os resultados obtidos na Tabela 6, pode-se concluir que não houve diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade nas análises de carboidratos totais, lipídios e proteínas.

Fatores	Carboidratos Totais		Lipídeos		Proteínas	
	Efeito	Valor p	Efeito	Valor p	Efeito	Valor p
Média	2,785714	0,000317	19,31429	0,000011	10,57143	0,000001
B-glucana	0,5	0,475805	1,55	0,456087	0,3	0,633335
Emulsão	-0,4	0,563591	-1,25	0,542573	-0,5	0,438623

Tabela 6 – Estimativa dos efeitos significativos da análise de carboidratos totais, lipídios e proteínas com o planejamento fatorial completo.

### 3.2 Análise Sensorial

Os atributos avaliados na análise sensorial foram sabor, cor, aroma, textura e avaliação global, os resultados estão apresentados na Tabela 7. Pelos resultados obtidos, a formulação 6 foi a preferida pelos provadores na maioria dos atributos avaliados, exceto na textura. Os resultados foram submetidos à análise de variância e estimativa dos efeitos.

Formulações	Variáveis		Média dos atributos				
	B-glucana (%)	Emulsão (%)	Sabor	Cor	Aroma	Textura	Avaliação Global
1	1	-1	5,23	4,80	4,93	5,13	5,13
2	-1	1	4,90	5,08	4,78	4,95	5,03
3	1	1	5,30	5,38	5,25	5,05	5,50

4	-1	-1	5,20	5,25	5,30	5,45	5,63
5	0	0	5,43	4,98	5,18	5,25	5,25
6	0	0	5,60	5,43	5,58	5,35	5,78
7	0	0	4,75	4,88	4,83	4,95	4,88

Tabela 7 – Resultados da análise sensorial dos nuggets de frango enriquecido com B-glucana

Na Tabela 8, estão apresentadas as influências das variáveis independentes e as variáveis dependentes, sabor, cor, aroma, textura e avaliação global e os efeitos significativos.

As variáveis dependentes e independentes, foram considerados estatisticamente significativos quando o valor  $p < 0,05$ . Pode-se concluir que não houve diferença significativa nos níveis das variáveis dependentes selecionados sobre as variáveis independentes avaliadas. Porém, pode-se observar que a B-glucana apresentou um efeito positivo sobre as variáveis respostas sabor, cor, aroma e avaliação global, indicando que o aumento desta, pode contribuir para aumentar a aceitação destes atributos. Enquanto que para textura a B-glucana apresentou efeito negativo, indicando que o aumento desta pode levar a diminuição do atributo avaliado. Para emulsão observa-se um efeito negativo para as variáveis respostas sabor, aroma e textura indicando que a diminuição deste fator pode levar a diminuição do valor dos atributos avaliados. A emulsão apresentou efeito positivo para as variáveis respostas cor e avaliação global indicando que aumentando a quantidade de emulsão pode levar a um aumento da avaliação global e do atributo cor.

Fatores	Sabor		Cor		Aroma		Textura		Avaliação Global	
	Efeito	Valor P	Efeito	Valor p	Efeito	Valor p	Efeito	Valor p	Efeito	Valor p
Média	5,20	0,00002	5,143	0,0001	5,121	0,0003	5,161	0,000	5,314	0,0004
B-glucana	0,21	0,5592	0,075	0,8022	0,05	0,8931	-0,11	0,573	0,015	0,9720
Emulsão	-0,11	0,7508	0,205	0,5049	-0,1	0,7888	-0,29	0,187	0,115	0,7888

Tabela 8 – Estimativa dos efeitos significativos na análise sensorial com o planejamento fatorial completo

Com base nos resultados da análise sensorial, a formulação 6 foi a preferida pelos provadores. Sendo assim está foi avaliada com relação ao percentual de fibra alimentar e apresentou 16,94%, podendo ser considerado um alimento funcional. De acordo com a legislação vigente (BRASIL, 1998), para um produto ser considerado fonte de fibras deve apresentar um mínimo de 3 g/100 g (sólidos) e alto teor de fibras, mínimo de 6 g/100 g (sólidos) desta forma os *nuggets* de frango enriquecido com B-glucana atendem estas especificações.

## 4 | CONCLUSÕES

A adição de B-glucana em *nuggets* de frango é viável, sendo que todas as formulações atenderam a legislação quanto aos padrões microbiológicos e físico-químicos segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Empanados. O teor de fibra alimentar da formulação preferida permitiu classificar o *nuggets* de frango enriquecido com B-glucana como “produto funcional”, quando associado a uma dieta equilibrada e hábitos de vida saudável.

## REFERÊNCIAS

ADA Reports. Position of the American Dietetic Association: Functiond foods. I. AM. Diet. Assoc. Chicago, v. 99, n. 10, p. 127 – 85, out. 1999.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº12, de 02 de janeiro de (2001).

AOAC (Association of Official Analytical Chemistis). *Official Methods of Analysis of the AOAC*. 18 ed. Gaithersburg: AOAC International, 2005.

BARROS NETO, B.B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. Planejamento e otimização de experimentos. Campinas: Editora da Unicamp, 1996. 299 p.

BRASIL, Portaria nº398 de 30 de abril de (1999) do Serviço de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. *Dispõe sobre definição de alimentos funcionais. Portaria nº 27, de 13 de janeiro de 1998.*

BRASIL – ANVISA-Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999.*

BRASIL, Instrução Normativa nº6 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, de 15 de fevereiro de (2001). *Dispõe sobre a aprovação dos Regulamentos Técnicos Identidade e Qualidade de Paleta cozida, Produtos cárneos Salgados, Empanados, Presunto tipo Serrano e Prato elaborado pronto ou semi-pronto contendo produtos de origem animal.*

BRASIL, Instrução Normativa n. 62, de 26 de agosto de 2003, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária (DISPOA). *Dispõe sobre Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Publicada no Diário Oficial da União em 26 de agosto de 2003.*

BRASIL, Ministério da Educação e Cultura. (2010). *Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos; altera a Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998; e dá outras providências (Lei nº 12.305, de 2 de agosto de 2010).* Diário Oficial da República Federativa do Brasil.

BRESSAN, M. C., PERES, J. R. O. **Tecnologia de carnes e pescados**. Lavras: UFLA/FAEPE, p.84, 88 – 93, 2001.

CARVALHO, J. A., CRISTIANE SANTIAGO SABENÇA SANTOS, S. S.C., CARVALHO, P.M., SOUZA, L. S. O. Alimento como remédio: Considerações sobre o uso dos alimentos funcionais. **Revista Científica do ITPAC**, v. 6, (4), 2013.

MIRA, G. S., GRAF, H., CÂNDIDO, L. M. B. Visão retrospectiva em fibras alimentares com ênfase em beta-glucanas no tratamento do diabetes. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.45, p.



11-20, 2009.

POLIZER, J. Y., POMPEU, D., HIRANO, H. M., FREIRE, A. T. M., TRINDADE, A. M. Development and evaluation of chicken nuggets with partial replacement of meat and fat by pea fibre. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 18 n.1. p. 62-69, 2015.

## DETERMINING CONTAMINANTS IN MINCED MEAT FROM BUTCHERIES IN CUIABÁ AND VÁRZEA GRANDE – MT

### Luan Stewart de Paula Jales de Oliveira

Federal Institute of Mato Grosso (IFMT), Campus Cuiabá – Bela Vista, Student of Bachelor of Science in Food Engineering  
Cuiabá - Mato Grosso

### James Moraes de Moura

Federal Institute of Mato Grosso (IFMT), Campus Cuiabá – Bela Vista, Master of Bachelor of Science in Food Engineering  
Cuiabá - Mato Grosso

### Alan Tocantins Fernandes

Federal University of Mato Grosso (UFMT), Campus Cuiabá, Master of Course of Letters – Portuguese/English  
Cuiabá - Mato Grosso

**RESUMO:** A carne moída é um alimento é obtido a partir da moagem de massas musculares de carcaças de bovinos ou bubalinos, seguido de imediato resfriamento ou congelamento, evitando a fixação de microrganismos patogênicos. Objetivou-se analisar os mais comuns contaminantes microbiológicos nesta fonte alimentar em amostras em açougues de Cuiabá e Várzea Grande, MT. Foram coletadas 5 amostras de carne moída (A a E), e analisadas no Laboratório de Microbiologia do IFMT – Cuiabá Bela Vista para determinar a presença de *Escherichia coli* (EC – diluição seriada  $10^{-1}$  a  $10^{-3}$ ), *Bacillus cereus* (XBC – diluição  $10^{-1}$  a  $10^{-2}$ ),

*Salmonella* spp. (SL – diluição e  $10^{-1}$ ), através de cultivo em placas prontas *Compact Dry*. Todas as amostras apresentavam EC, sendo amostra E com maior resultado ( $7,5 \times 10^4$  UFC/g). Para XBC, a amostra D obteve  $4,1 \times 10^3$  UFC/g em relação as demais. Mesmo presentes, o valor máximo de bactérias é até  $1,0 \times 10^6$  UFC/g para aceitação de alimentos cárneos crus que serão cozidos antes de serem servidos, portanto todas as amostras estão dentro do limite permitido para consumo. Para SL, amostras B, C e D obtiveram resultados positivos, podendo estar associadas as ineficientes práticas de obtenção, processamento e comercialização deste produto, o que pode acarretar intoxicação alimentar nos consumidores.

**PALAVRAS-CHAVE:** Bactérias; Cárneos; *Salmonella* ssp

**ABSTRACT:** Minced meat is obtained from grinding muscle mass of bovine or buffalo carcasses, followed by immediate cooling or freezing to avoid the settling of pathogenic microorganisms. The objective of this study was to analyze common microbiological contaminants in this food source in samples from butcheries of Cuiabá and Várzea Grande – MT. Five samples of minced meat (A to E) were collected and analyzed at the Microbiology Laboratory of IFMT Cuiabá - Bela Vista to determine the presence of *Escherichia coli* (EC

– serial dilution  $10^{-1}$  to  $10^{-3}$ ), *Bacillus cereus* (XBC - dilution  $10^{-1}$  to  $10^{-2}$ ), *Salmonella* spp. (SL – dilution at  $10^{-1}$ ) by culture in ready-made Compact Dry plaques. All samples presented EC; the biggest result was found in sample E ( $7.5 \times 10^4$  Colony Forming Units - CFU/g). For XBC, the sample D obtained  $4.1 \times 10^3$  CFU/g in relation to the others. The maximum number of bacteria is up to  $1.0 \times 10^6$  CFU/g for acceptance of raw meat foods that will be cooked before being served. Therefore, all samples are within the limit allowed for consumption. Results for SL in samples B, C and D were positive, possibly due to inefficient acquisition, processing and marketing practices, which could lead to food poisoning in consumers.

**KEYWORDS:** Bacteria; Meat; *Salmonella* spp.

## 1 | INTRODUCTION

Food and its nutrients provide energy and building materials for countless substances that are essential for the growth and survival of living beings (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 2002). However, this same food may contain microorganisms and present health risks. These microorganisms are known generically as “pathogenic” and can affect both humans and animals.

The average domestic consumption of beef per capita in 2001, according to the Brazilian Agricultural Research Corporation, was 36.5 kg/person. Brazil is the world’s largest exporter of beef since 2003 (PINHO, 2009) and in the first half of 2010 produced 3,516.235 tons (total weight of carcasses), placing the country among the world’s largest producers (IBGE, 2010).

This food is an important source of proteins of high biological value considering that its composition of amino acids meets human nutritional needs very closely. Micronutrient supply is also a major source of iron, B vitamins (mainly B12) and zinc (MEDEIROS, 2008). Due to its varied nutritional composition, high-water activity, pH close to neutrality, among other factors, meat is an excellent mean of proliferation of microorganisms that can cause both economic and health hazards if not controlled well.

For Philippi (2006) “meat is the set of tissues of characteristic color and consistency, which covers the skeleton of animals. Commercially, it is defined as meat all parts of the animals that serve as food for man”. In general, it consists of 75% water, 19% protein, 3.5% soluble non-protein substances and 2.5% fat (LAWRIE, 2005). This fact, together with the great competitiveness, has forced producers and traders to invest in the quality of their products (MANTENSE, 2004). According to Ornellas (2001), in the purchase of meat products, an important point to be observed is the hygienic-sanitary quality of the products, considering the normal color as the bright red and the odor itself – meat with greyish, purplish or greenish color and with strong and unpleasant odor must be avoided.

Muscle tissue is made up of approximately 75% of water and, under certain

conditions, can retain or absorb much more than that. The Water Retention Capacity (WRC) of meat – i.e. the ability to maintain its own aqueous material or that which is added – directly influences its characteristics such as color, texture, firmness, softness and, above all, its succulence (ORDONEZ, 2005).

Many factors may influence meat WRC, especially those caused by *post mortem*. The death of the animal inevitably entails some loss of WRC. However, the speed and intensity of pH variation will directly affect this ability. The higher the pH the lower the reduction in WRC; the faster the lowering of this pH the greater the denaturation of proteins. Plus, physiological factors such as species, age, muscular and physical-chemical functions (e.g. heat), ionic force influence and chelating action also affect the meat WRC (LAWRIE, 2005).

Minced meat is a product obtained by grinding muscle mass from bovine or buffalo carcasses, followed by immediate cooling or freezing. The labeling must contain the expression 'minced meat' followed by expressions or names which characterize the temperature and the animal species from which it was obtained. The sex of the animal and the cut from which it was extracted is optional, provided that it consists exclusively of muscle mass. (BRASIL, 2003).

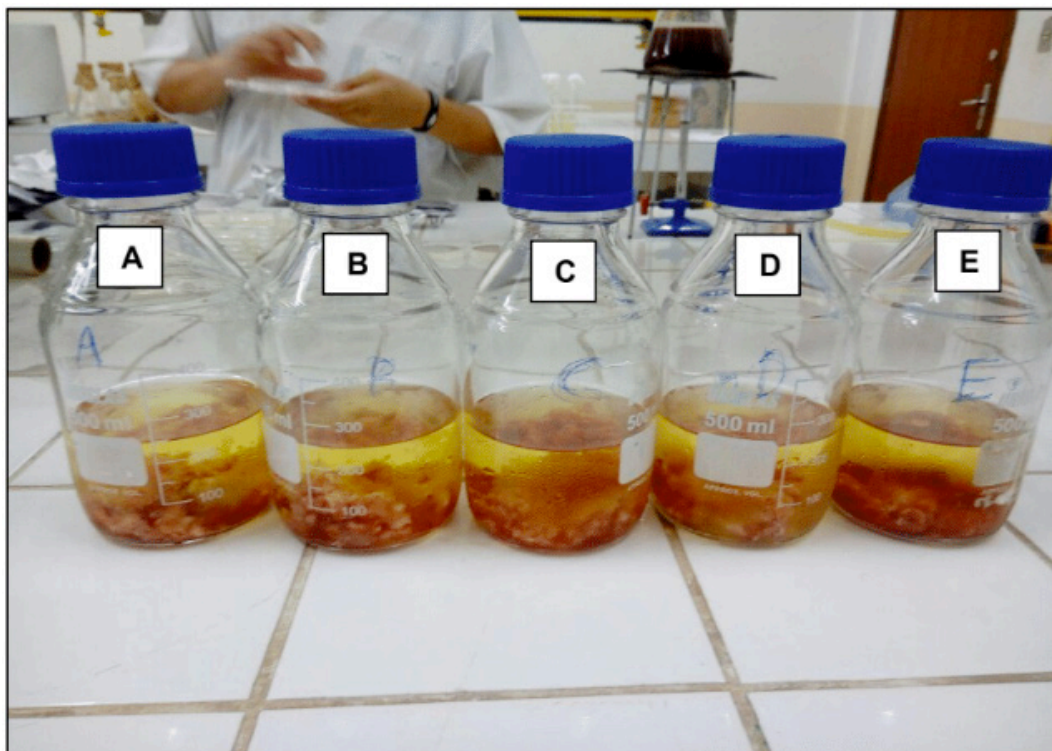
For Evangelista (2005), meat contamination can occur both in the animal *in vivo* (endogenous) and *post mortem* (exogenous). Endogenous contamination is less prevalent and results from diseases established in the living animal. It is commonly caused by parasitic bacteria and worms, especially salmonellosis, trachinosis and teniasis (LAWRIE, 2005). Even if the internal tissues of the healthy living animal are considered sterile, analyzes carried out on fresh meat, commercialized at the retail level, indicate the presence of different types and quantities of microorganisms, which demonstrates exogenous meat contamination (JAY, 2005).

By ingesting a food contaminated with undesirable microorganisms or toxins, the individual may develop a particular disease that is often called food toxoinfection (FORSYTHE, 2002). According to Collegiate Board Resolution (RDC) N°.12 of January 2<sup>nd</sup> 2001, from the National Health Surveillance Agency (ANVISA) of the Ministry of Health, illnesses are considered to be foodborne when they are “caused by the ingestion of food contaminated by a specific infectious agent or the toxin produced by it, by the transmission of that agent, or of its toxic product” (BRASIL, 2001).

## 2 | MATERIAL E METHODS

Five samples were randomly collected from butchereries in the cities of Cuiabá-MT and Várzea Grande-MT. As a procedure to select the samples, a cut of approximately 100g of chuck steak and muscle was applied. After the grinding process, the minced meat was refrigerated at 20° C and transported in a thermal box to the Laboratory of Microbiology at the IFMT Cuiabá – Campus Bela Vista – for microbiological analyzes.

Once in the laboratory, approximately 25g of each sample of meat (samples A, B, C, D and E) (Figure 1) was mixed with 225mL of 1% buffered peptone water; the flask was shaken for 2 minutes and the serial dilution technique was performed for each sample.



**Figure 1** - Samples A, B, C, D e E of minced meat in flasks.

Serial dilutions  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  were inoculated into *Escherichia coli* (EC) in duplicates in the ready-made Compact Dry plates (IDEXX brand); then, the plates were incubated in a microbiological oven at  $36^{\circ}\text{C}$  for 24 hours. For *Bacillus cereus* (XBC) the serial dilution used was  $10^{-2}$  in the inoculated plates which were then incubated in a microbiological oven at  $36^{\circ}\text{C}$  in 24h. For the cultivation of *Salmonella* spp. (SL), after the samples were pre-enriched for 24 hours in a microbiological oven at  $36^{\circ}\text{C}$ , the procedure of inoculation was done on the ready-made Compact Dry plates. For this, 0.1mL of the homogenized sample ( $10^{-1}$ ) was pipetted into the top of the plate, and then 1mL of distilled water was applied to the bottom of the same plate. This procedure was repeated for all samples on separate plates, which were then incubated in the microbiological oven for 24 hours at  $43^{\circ}\text{C}$ .

The results of each microbiological group were tabulated after readings of 24 hours and after their respective incubations. The data was tabulated through the Microsoft Office Excel package, generating tables and graphs for descriptive analyzes. For comparison purposes, the microbiological analyzes were performed in duplicate on fresh meat under refrigeration at  $20^{\circ}\text{C}$  to  $27^{\circ}\text{C}$ , according to the Sanitary Microbiological Standards for Food, recommended by the National Agency for Sanitary Surveillance (ANVISA), and in accordance with RDC N<sup>o</sup>.12 of January 2nd 2001, of ANVISA's

regulation approved by Decree 3.029.

### 3 | RESULTS AND DISCUSSION

According to Table 1, it is possible to observe that for genus *Escherichia coli* at a dilution of  $10^{-3}$  sample E presented  $7.5 \times 10^4$  CFU/g higher amount compared to the others. And about 40% of these samples were between  $3.0 \times 10^3$  to  $6.0 \times 10^3$  CFU/g.

Microorganisms	A	B	C	D	E
<i>Escherichia coli</i> (EC)	$4,5 \times 10^3$	$7,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$	$3,5 \times 10^3$	$7,5 \times 10^4$
<i>Bacillus cereus</i> (XBC)	$2,0 \times 10^2$	0	0	$4,05 \times 10^3$	$6,5 \times 10^2$
<i>Salmonella</i> spp. (SL)	Negative	Positive	Positive	Positive	Negative

Table 1 - Results obtained from quantification (CFU/g) of microorganisms on plaques

From the results, there is an excessive amount of strains of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* being ingested with the consumption of minced meat and raw milk. Similar results were obtained in minced meat and raw milk where these microorganisms can produce *shiga-like* toxins (stx1 and stx2) and their variants (MENARD et al., 2004). This category is associated with episodes of diarrhea with complications. The most important serotype is O157: H7, associated with hemorrhagic colitis, diarrhea with blood and hemolytic uremic syndrome (HUS). Figure 2 shows the plaque with the largest number of CFU/g *Escherichia coli*.

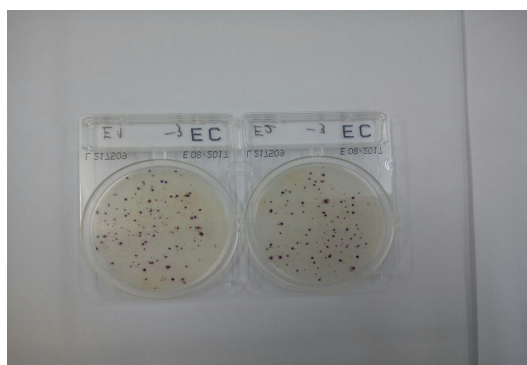


Figure 2 – Colonies of *Escherichia coli* (EC) found in plaques of sample E.

The handler may have attended hospitals, have a urinary infection or some wound infection due to surgery; those are the cases related to this bacterium according to the Antimicrobial Surveillance Program SENTRY (SADER et al., 2001). According to Table 1 it is possible to observe that for sample *Bacillus cereus*, sample D (Figure 3) presented  $4.1 \times 10^3$  CFU/g – higher amount compared to the others. About 60% of these samples were between  $0.0 \times 10^0$  to  $3.0 \times 10^2$  CFU/g.

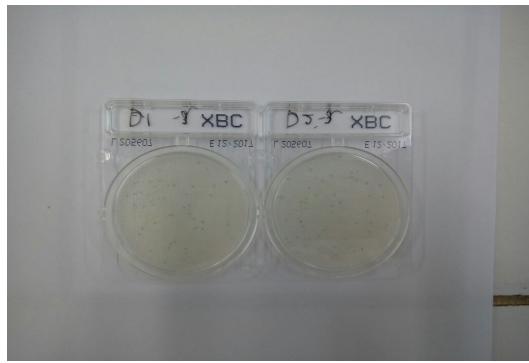


Figure 3 – Colonies of *Bacillus cereus* (XBC) found in plaques of sample D.

*Bacillus cereus* stands out for its spore-forming properties, wide distribution in the environment and the ability to produce toxins associated with diarrheal or emetic dietary diseases. Foodborne outbreaks reported in the literature have been associated with several types of food and the diarrheal form is generally related to the consumption of protein-rich foods such as meat and fish. Researchers consider that high *Bacillus cereus* counts in meat, particularly in ready-to-eat meat products, should be considered as a potential risk to consumers.

Resolution RDC N<sup>o</sup>.12 (BRASIL, 2001) establishes as a parameter of microbiological quality of *in natura* meat only the absence of *Salmonella* spp. in 25g of sample. Of the 5 meat samples analyzed, according to Table 1, in a dilution of 10<sup>-1</sup> in this study, three samples of meat ground at the time of acquisition showed presence of this microorganism – about 60% of the total (samples B, C and D) – demonstrating inadequacy to consumption (figure 4).

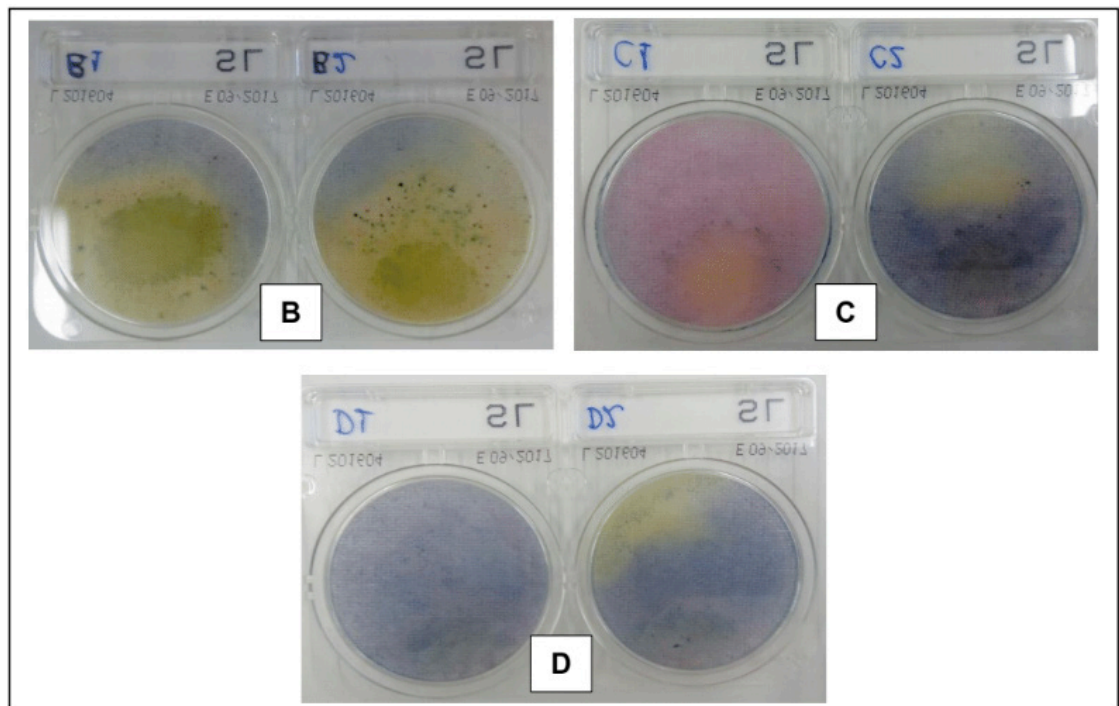


Figure 4 – Results for *Salmonella* spp. (SL) found in plaques of samples B, C e D.

According to Franco and Landgraf (2004), diseases caused by *Salmonella* spp.

can have serious consequences, especially in children and people with weakened immune systems, which can lead to death. For Pigarro and Santos (2008) “the presence of *Salmonella* spp. in minced meat may occur as a result of inefficient practices of obtaining, processing and commercializing the product”. It can be stated that the meat analyzed did not agree with what is recommended, which represents greater risks to public health. The results exceeded in severity those obtained by other studies, in which the presence of *Salmonella* spp. was not detected in any of the samples.

According to Solberg et al. (1990), the minimum number allowed is up to  $1.0 \times 10^6$  CFU/g for acceptance of raw meat foods that will be cooked before being served, so no sample collected in the area of Cuiabá-MT and Várzea Grande-MT is above the permitted.

#### 4 | CONCLUSIONS

Considering the analyzes of minced meat collected in Cuiabá and Várzea Grande, it was verified that the highest contamination by *Escherichia coli* was found in sample E, while the contaminant *Bacillus cereus* showed increasing values in samples A, E and D. For *Salmonella* spp., negative results were expected for all samples. This was evidenced only in samples A and E. According to the legislation, the presence of this microorganisms in samples B, C and D may be related to poor handling by butchers and poor hygiene of work equipment, which could potentially represent risks to public health by causing illnesses such as food poisoning.

#### 5 | ACKNOWLEDGMENTS

The author would like to thank teacher James Moraes de Moura for the encouragement, knowledge and willingness to carry out the scientific research and IFMT – Campus Bela Vista for the availability of the laboratory and equipment to carry out the analyzes.

#### REFERENCES

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n.83, de 21 de novembro de 2003**. Diário Oficial da União, Brasília, seção 1, 2003, p.29.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001**. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 02 jan. 2001.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2005.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2004.



FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa Trimestral do Abate de Animais**. 2017.

JAY, J.M. **Microbiologia de Alimentos**. 6ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

Lawrie, R. A. A. **Qualidade Sensorial da Carne**. In: Lawrie, R. A. *Ciência da Carne*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed. 2005.

MEDEIROS, S. R. **Valor nutricional da carne bovina e suas implicações para a saúde humana**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2008.

MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. K. **Alimentos, nutrição & dietoterapia**. 10 ed. São Paulo: Roca, 2002.

MENARD, L. P.; LUSSIER, J.G.; LÉPINE, F.; SOUZA, C.P. **Expression, purification and biochemical characterization of enteroaggregative Escherichia coli heat-stable enterotoxin 1. Protein Expression and Purification**, v. 33, 2004, p. 223-231.

ORDÓNEZ, J. **A Tecnologia de Alimentos: Alimentos de Origem Animal**. 6ed. v.2. Porto Alegre: Artmed, 2005.

ORNELLAS, L. H. **Técnica dietética: seleção e preparo de alimentos**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2001.

PHILIPPI, S. T. **Nutrição e Técnica dietética**. 2ed. Rev. e atual. Barueri: Manole, 2006.

PIGARRO, M. A. P.; SANTOS, M. **Avaliação microbiológica da carne moída de duas redes de supermercados da cidade de Londrina – PR**. Monografia (Pós-graduação em Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal) – Universidade Castelo Branco, Instituto Qualittas, Londrina, 2008, 59p.

PINHO, A. P. S. **Caracterização Físico-Químicas da Carne Bovina de Marcas Comercializadas no Município de Porto Alegre**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Porto Alegre. 2009, 171p.

SADER, H. S.; GALES, A. C.; REIS, A. R.; ZOCCOLI, C.; SAMPAIO, J.; JONES, R. N. **Sensibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas do trato respiratório de pacientes com infecções respiratórias adquiridas na comunidade: resultados brasileiros do Programa SENTRY de Vigilância de Resistência a Antimicrobianos dos anos de 1997 e 1998**. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.1, n.27, 2001, p.25-34.

SOLBERG, M.; BUCKALEW, J. J.; CHEN, C. M.; SHAFFNER, D. W.; O'NEILL, K.; MCDOWELL JR, L. S.; POSL, L. S.; BODERCK, M.; BUCKALEW, J.; O'NEILL, K.; MCDOWELL, L.M. **Microbiological safety assurance systems for foodservice facilities**. **Food Technology**, v.44, n.12, 1990, p.68-73.

## EPIDEMIOLOGIA DO HPV (PAPILOMAVÍRUS HUMANO) EM ADOLESCENTES, NA CIDADE DE ARAÇATUBA-SP

### **Mayara Pepece Brassioli**

Centro Universitário Católico Salesiano *Auxillium*-Araçatuba

### **Gislene Marcelino**

Centro Universitário Católico Salesiano Auxillium de Araçatuba-SP

### **Rossana Abud Cabrera-Rosa**

Centro Universitário Católico Salesiano Auxillium de Araçatuba-SP

### **Juliane C.T. Sanches**

Centro Universitário Católico Salesiano Auxillium de Araçatuba-SP

### **Natalia Félix Negreiros**

Centro Universitário Católico Salesiano Auxillium de Araçatuba-SP

**RESUMO:** O Papilomavírus humano, conhecido como HPV, é um vírus que infecta as células epiteliais da pele e das mucosas, causando diversos tipos de lesões como a verruga comum e a verruga genital (condilomatose), afeta tanto homens quanto mulheres. Atualmente, a infecção por HPV é a doença sexualmente transmissível (DST) mais frequente, de etiologia viral sendo associado em 90% dos casos de câncer do colo do útero. O presente estudo buscou descrever o perfil clínico e epidemiológico dos diagnósticos de HPV pelo SUS, em Araçatuba-SP, e explicar as formas de diagnóstico de câncer de colo uterino além

de abordar as principais formas de transmissão do HPV. Os dados demonstram que o grupo acima de 20 anos contém o maior número de pacientes. Os registros de adolescentes que procuram atendimento médico ainda é pequeno e foi não significativo. Houve diferença de resultado entre os meses, e março apresentou o maior registro de atendimentos, chegando a 2153.

**PALAVRAS-CHAVE:** câncer de colo de útero, diagnóstico, epidemiologia.

**ABSTRACT:** Human papillomavirus, known as HPV is a virus that infects epithelial cells of skin and mucosa, causing various types of lesions such as common warts and genital warts (condylomata), affects both men and women. Currently, HPV infection is a sexually transmitted disease (STD) more frequent viral etiology is associated in 90% of cases of cervical cancer. This study aimed to describe the clinical and epidemiological profile of HPV diagnostics by SUS in Araçatuba, and explain the ways of diagnosing cervical cancer and abort the main forms of transmission of HPV. The data show that the group over 20 years old has the largest number of patients. Records of teens seeking medical care is still small and was not significant. There was difference in the results between the months, and March had the highest record of attendances, reaching 2153.

**KEYWORDS:** cervical cancer, diagnostics, epidemiology.

## INTRODUÇÃO

O papilomavírus humano (HPV) engloba uma classe com mais de 100 diferentes espécies de vírus (SCHEURER; TORTOLERO-LUNA; ADLER-STORTHZ, 2005), o material genético composto de DNA, apresenta tropismo por células epiteliais e sua replicação ocorre dentro das células escamosas sendo seu ciclo diretamente relacionado com o da célula hospedeira (NELSON; ROSE; MOROIANU, 2002; NEVES et al., 2002) and its association to human papillomavirus (HPV. A infecção por HPV está associado a lesões benignas da pele e mucosas, sendo o principal responsável por inúmeras doenças da região genital, que compreende colo, vagina, vulva e ânus nas mulheres e nos homens, pênis e ânus e ao desenvolvimento de diversos tumores cutâneo mucosos como câncer de vulva, pênis, e o mais frequente o de colo de útero (AL-DARAJI; SMITH, 2009).

A infecção já vista desde a Grécia antiga, porém somente no século XX foi iniciado as pesquisas contra o HPV. Sua primeira aparição foi em coelhos, com o surgimento de verrugas em suas genitálias, até então normais, tendo isso como causa para a paralisação dos estudos. Em 1935, segundo Rous as verrugas dos coelhos eram propícias à evolução maligna, e somente em 1949 houve a primeira manifestação e observação de partículas de HPV em verrugas humanas, em seguida em 1950 foi descoberto o potencial carcinogênico do papilomavírus humano, tal estrutura do genoma viral só foi descoberta em 1963 (CRAWFORD; CRAWFORD, 1963).

Dos diversos tipos de HPV, são capazes de originar tumores, o 16 e o 18, que são os responsáveis por 80% dos casos de câncer de colo de útero em todo o mundo. Os tipos 31,33,39,45,51,52,56,58,59,68,73,82 também são considerados potenciais carcinogênicos, mas sua associação com o câncer do colo é menos intensa em comparação aos tipos 16 e 18 (MUÑOZ et al., 2003) but the risk associated with the various HPV types has not been adequately assessed. METHODS We pooled data from 11 case-control studies from nine countries involving 1918 women with histologically confirmed squamous-cell cervical cancer and 1928 control women. A common protocol and questionnaire were used. Information on risk factors was obtained by personal interviews, and cervical cells were collected for detection of HPV DNA and typing in a central laboratory by polymerase-chain-reaction-based assays (with MY09/MY11 and GP5+/6+ primers).

O câncer de colo de útero é o sexto tipo mais frequente na população e em geral, é o segundo mais comum entre as mulheres (PARKIN; PISANI; FERLAY, 1993) 52% of which occur in developing countries. The most common cancer in the world today is lung cancer, accounting for 17.6% of cancers of men worldwide, and 22% of cancers in men in the developed countries. Stomach cancer is now second in frequency (it was slightly more common than lung cancer in 1980. No Brasil, dados do ministério

da Saúde mostram que surgem anualmente 20 mil novos casos, uma incidência de 20/100 mil, onde evidências epidemiológicas comprovam que a infecção pelo HPV é uma necessidade para o desenvolvimento do câncer (BOSCH et al., 2002).

Para combater esse tipo de câncer foi realizado vários tipos de estudos e testes para se obter a vacina para o controle dessa doença, não havendo sucesso logo de início, por não haver técnicas laboratoriais que permitissem obter partículas virais em cultura de tecidos e não havia modelos animais para infecção (DERCHAIN; SARIAN, 2007).

A maioria das vacinas contra vírus é baseada no uso de virions, contudo, não se pode produzir virions de HPV, então foi observado que com o conjunto de duas proteínas (L1 e L2), obteve-se resultado semelhante ao dos virions, assim denominado (VLP), sendo mais seguras por serem destituídas de DNA e ter melhor resposta imune não ocorrendo o risco de infecção ou o caso de uma neoplasia (DOORBAR, 2006; NADAL; MANZIONE, 2006). Um problema das VLPs é que apesar de serem eficazes, as mesmas são capazes somente de induzir anticorpos apenas contra tipos específicos do HPV, e não sendo possível combinar, numa mesma vacina, muitas VLPs por razões técnicas e global, ao redor de 15% as empresas responsáveis pela manufatura da vacina, produziram vacinas contra os tipos 16 e 18 (LOWY; SCHILLER, 2006).

A implantação das vacinas, tem como objetivo, educar o público em geral sobre o HPV, diminuir o contágio da infecção e ganhar a confiabilidade para vacinar adolescentes para uma futura DST, antes de se iniciar a vida sexual (FRANCO; DUARTE-FRANCO; FERENCZY, 2001).

Para o ponto de vista ético a vacina universal seria recomendada, mas não obrigatória, e deveria incluir meninas de 9 a 13 anos. Entretanto, deve-se tomar alguns cuidados para com as crianças vacinadas, orientando as mesmas que a vacina contra o HPV não irá as proteger de outras DSTs, e que o HPV é responsável por apenas uma parte das consequências de relações sexuais sem proteção (GOLDIE et al., 2007).

O objetivo desse trabalho, foi descrever o perfil clínico e epidemiológico dos diagnósticos de HPV pelo SUS, em adolescentes na região de Araçatuba.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Foi realizado um estudo descritivo, retrospectivo de série temporal, baseado em dados secundários coletados do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS).

Foram coletados os seguintes dados secundários pelo DATASUS: Zona de transição; epitélio escamoso, glandular e metaplasia; amostras com normalidade; alterações benignas com inflamação, metaplasia, reparação, atrofia entre outros. Os dados foram obtidos através do Sistema de Informação sobre a ocorrência do câncer de colo de útero referentes à população feminina nos anos de 2010 a 2015, obtida

através da informação do censo demográfico (para anos censitários) e das projeções intercensitárias do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (anos não censitários), na região de Araçatuba - SP.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

De maneira geral, os dados demonstram que para todas as análises, o grupo acima de 20 anos contém o maior número de pacientes.

Na zona de transformação pode ocorrer obstrução dos ductos excretores das glândulas endocervicais, dando origem a estruturas císticas e onde se localizam mais de 90% dos cânceres do colo do útero. O número de pacientes adolescentes investigadas na zona de transição (Gráfico 1) durante o período de estudo foi pequeno e não significativo ( $p>0,05$ ), porém Duarte (HENRIQUE DUARTE et al., 2011) o câncer de colo uterino é o segundo tipo de câncer mais comum entre as mulheres, em todas as faixas etárias. Embora a evolução dessa neoplasia seja gradual, conhecer os fatores de risco é relevante para que seja oferecida assistência qualificada às mulheres que a eles estejam expostas. O estudo objetivou identificar fatores de risco para câncer de colo uterino entre mulheres com resultados alterados de exames de Papanicolaou, residentes em uma das áreas de abrangência da Estratégia Saúde da Família no município de Cuiabá, MT, onde o Projeto PETSÁUDE/Saúde da Família está implantado. O estudo é de natureza quantitativa e descritiva. Participaram 22 mulheres com resultados alterados do exame de Papanicolaou no período de outubro de 2007 a outubro de 2009. Os dados foram coletados com um questionário semiestruturado aplicado no domicílio das participantes após a assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido. Os resultados evidenciam que 16 (73 por cento) salienta que a precocidade da atividade sexual possui relação direta com o aumento do risco de neoplasia do colo do útero, visto que esta zona do epitélio cervical se encontra mais proliferativa durante a adolescência tornando esta população mais vulnerável às alterações cervicais causadas por agentes sexualmente transmissíveis. Assim como na zona de transição, o número de paciente adolescentes foi pequeno ( $p>0,05$ ) quando comparado com as pacientes acima de 20 anos, que apresentaram números expressivos ( $p<0,05$ ).

O epitélio metaplásico (Gráfico 2) é considerado uma neoplasia maligna de evolução lenta, passando da fase precursora para doença invasiva no período de aproximadamente 10 anos. Após a invasão, a morte ocorre em cerca de três a cinco anos para as pacientes não tratadas e para aquelas não responsivas à terapêutica. Quanto mais precoce for a intervenção, maior a probabilidade de sobrevivência.

No Brasil, em pesquisa recente realizada pelo INCA (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER., 2010), cerca de 31 % das mulheres na região sudeste jamais submeteram-se a exame de citologia cervical. Este número alcança 42% das mulheres na região nordeste. Números realmente assustadores, que

colocam nosso país entre os com maior incidência do câncer de colo do útero.

As alterações benignas inflamatórias (Gráfico 3), quando resultado do Papanicolau, são declaradas alterações que não causam nenhum risco para um potencial carcinogênico, normalmente são alterações normais quando feito o exame.

### Zona de Transição (ZT)

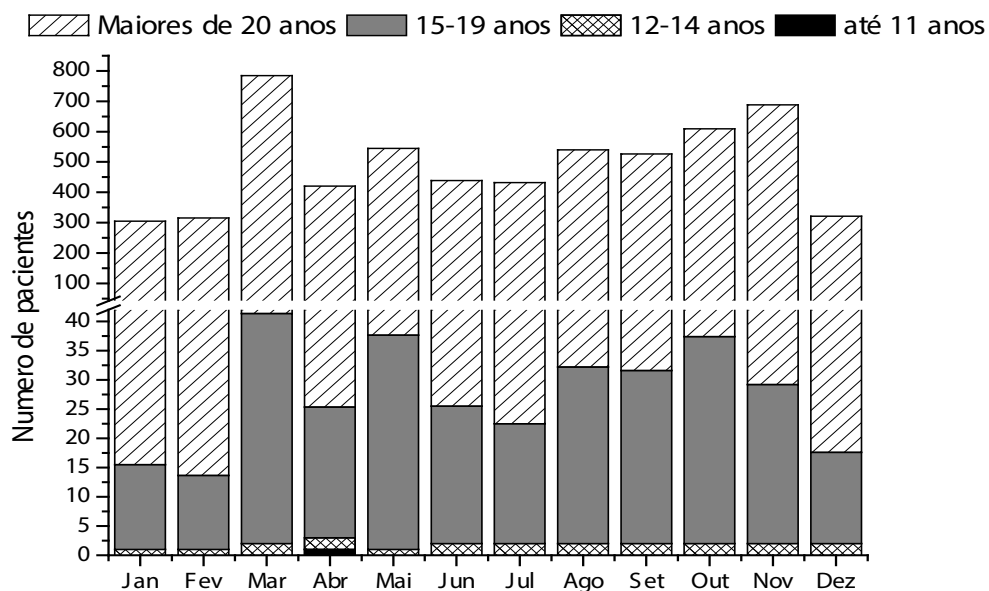


Gráfico 1. Valores médios do número total de pacientes investigadas na zona de transição (ZT), de Janeiro de 2010 a julho de 2015, em Araçatuba-SP, de acordo com dados do Datasus.

### Epitêlio Metaplasia

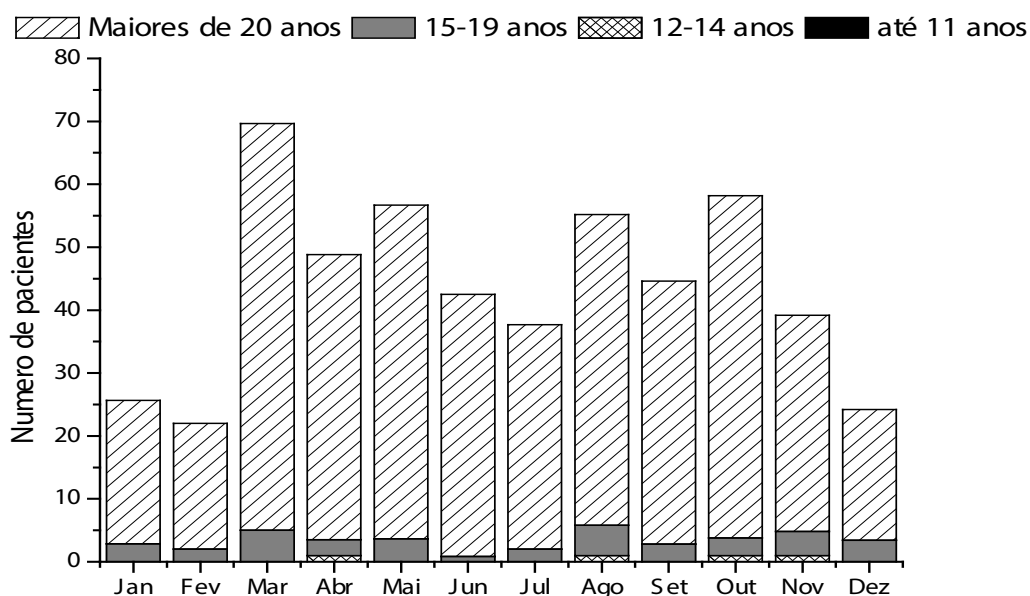


Gráfico 2. Valores médios do número total de pacientes investigadas do epitélio metaplasia de Janeiro de 2010 a julho de 2015, em Araçatuba-SP, de acordo com dados do Datasus.

### Alteração Benigna - Inflamação

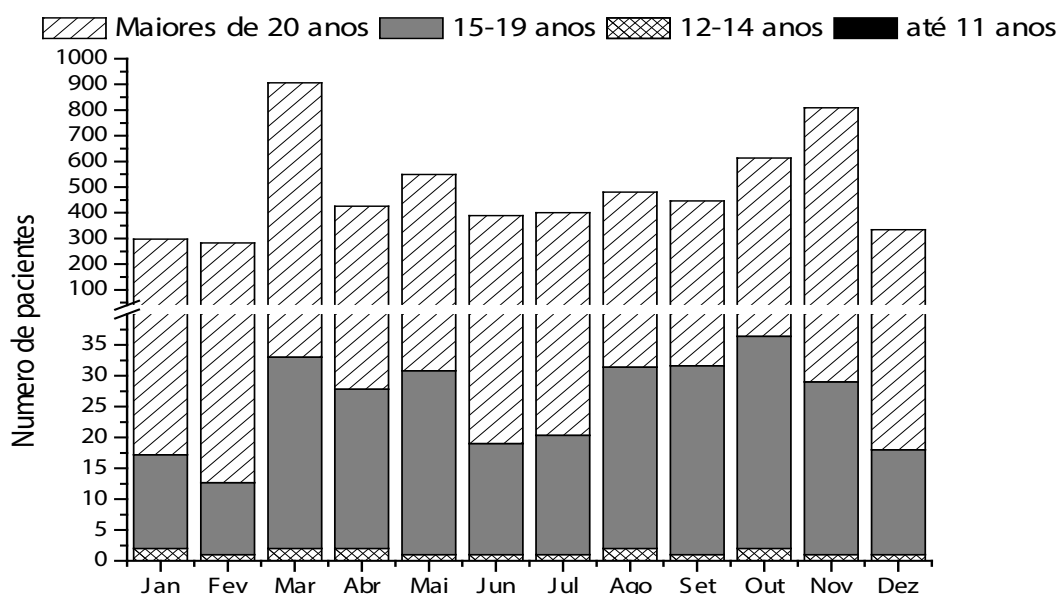


Gráfico 3. Valores médios do número total de pacientes investigadas pelas alterações benignas com inflamação, de Janeiro de 2010 a julho de 2015, em Araçatuba-SP, de acordo com dados do Datasus.

A campanha de vacinação contra o HPV do ano de 2014, teve início no dia 10 de março, imunizando adolescentes de 9 a 13 anos, e as que obtivessem o vírus do HIV também foram imunizadas mulheres de 9 a 26 anos de idade. Em 2015, o Ministério da Saúde vacinou cerca de 4,5 milhões de meninas em todo o Brasil (SECRETARIA DO ESTADO DE SÃO PAULO DA SAÚDE, 2014). Segundo o ministério, a cobertura da vacinação contra HPV chegou a 92,3% do público alvo entre 2014 e 2015, mas caiu para 69,5% no ano passado entre as meninas que ainda precisavam tomar a primeira dose. A vacina é dita e confirmada com 100 % de eficácia em adolescentes que ainda não tiveram a vida sexual ativa, dados confirmam que os homens deveriam também receber a imunização, pois a contaminação é maior de homem para mulher, por ser uma doença assintomática na maioria das vezes (GIRALDO et al., 2008; NATUNEN et al., 2011).

As técnicas de citologia disponíveis resultam em diversas classificações e estimativas de prevalência do HPV, impossibilitando a comparação direta entre os resultados. O tipo de HPV prevalente varia conforme o resultado da citologia cervical, normal ou não. Dentre as anormalidades citológicas, também ocorre variação na prevalência do HPV (prevalência específica por tipo do HPV, por tipo de resultado de citologia ou para ambas (BAO et al., 2008; CLIFFORD et al., 2003) 1653, 958, and 16,803 women with invasive cervical cancer (ICC).

As mulheres com mais de 50 anos de idade estão mais propícias a infecção pelo vírus, assim facilitando o desenvolvimento de uma possível neoplasia maligna. Somando a isso, as mulheres a cima dos 56 anos apresentam uma certa pré-disposição para desenvolverem uma NIC 3, quando comparadas as mais jovens (CASTELLSAGUÉ et

al., 2011; HARPER; VIERTHALER, 2011).

Existe um período de latência entre a infecção pelo HPV e o desenvolvimento de lesões pré-malignas, existindo assim outros cofatores que possam estar relacionados com o contágio do vírus e o desenvolvimento de carcinogênese cervical, sendo eles: início precoce da vida sexual ativa, múltiplos parceiros sexuais, paridade, predisposição genética, tabagismo, uso de contraceptivos via oral, HIV entre outros (CASTELLSAGUÉ et al., 2011; GRAVITT, 2011; KATHERINE et al., 2009; NATUNEN et al., 2011; RODEN; WU, 2006; ROSA et al., 2009) incluindo todos os artigos encontrados até janeiro de 2009, combinando os descritores para cada base de dados específica, para alcançar maior sensibilidade na busca da intervenção (vacina profilática).

O câncer do colo do útero tem seu controle baseado na análise microscópica de alterações no esfregaço cervical, que permite detectar precocemente as lesões precursoras ou o próprio câncer, o problema das adolescentes é que só vão à procura de orientação médica quando já existe as verrugas e nunca para um exame preventivo, por isso os dados se confirmam altos (LINHARES; VILLA, 2006).

Tais números relativamente altos como no mês de março, podem estar relacionados pela falta de conhecimento do vírus, por pensamentos incorretos sobre a vacina, os pais deduzem que o uso da vacina irá induzir suas filhas a ter relações sexuais precocemente, não permitindo que as mesmas sejam imunizadas (PARELLADA; PEREYRA, 2005). A vacina não previne nenhuma DST e que é uma forma de prevenção e não tratamento, que o uso do preservativo é indispensável e a realização do exame de prevenção Papanicolau é a única forma de monitorar a saúde da mulher, não só pelo HPV, mas também de outras DSTs (FUTURE II STUDY GROUP, 2007; GIRALDO et al., 2008).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A vida sexual tem tido início cada vez mais cedo e por essa razão adolescentes a partir dos 9 anos estão sendo vacinadas, porém, com base nos dados do DATASUS os registros de adolescentes que procuram atendimento médico ainda é pequeno e não significativa entre os anos de 2010 e julho de 2015, houve variações de resultado entre os meses, como março, por exemplo, tendo o maior número de casos em todo os tópicos analisados no site, tende-se a entender que o motivo seja pelas festividades carnavalescas que acontece em todo o Brasil, onde o ato sexual com múltiplos parceiros sem uso de proteção adequada eleve esses números de tal forma.

O exame preventivo Papanicolau é a melhor forma de prever esse contágio com o HPV e prevenindo a tempo um futuro câncer de colo de útero, já que estudos confirmam que para ser diagnosticado com o câncer, deve-se ter o contágio com o vírus por conto sexual ou até mesmo por outras vias, tais como: materno fetal; hetero ou autoinoculação a partir de lesões cutâneas ou genitais; transmissão indireta por “fômites” (toalhas, roupas íntimas, etc.); ou por instrumental ginecológico não



adequadamente esterilizado.

## REFERÊNCIAS

AL-DARAJI, W. I.; SMITH, J. H. Infection and cervical neoplasia: facts and fiction. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 2, n. 1, p. 48–64, 2009.

BAO, Y.-P. et al. Human papillomavirus type distribution in women from Asia: a meta-analysis. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 18, n. 1, p. 71–79, jan. 2008.

BOSCH, F. X. et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. **Journal of clinical pathology**, v. 55, n. 4, p. 244–65, abr. 2002.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CâNCER. **Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer**. Rio de Janeiro: [s.n.].

CASTELLSAGUÉ, X. et al. End-of-study safety, immunogenicity and efficacy of quadrivalent HPV (types 6, 11, 16, 18) recombinant vaccine in adult women 24–45 years of age. **British Journal of Cancer**, v. 105, n. 1, p. 28–37, jun. 2011.

CLIFFORD, G. M. et al. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. **British Journal of Cancer**, v. 88, n. 1, p. 63–73, 28 jan. 2003.

CRAWFORD, L. V.; CRAWFORD, E. M. A comparative study of polyoma and papilloma viruses. **Virology**, v. 21, n. 2, p. 258–263, out. 1963.

DERCHAIN, S. F. M.; SARIAN, L. O. Z. Vacinas profiláticas para o HPV. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 29, n. 6, p. 281–284, jun. 2007.

DOORBAR, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Clinical Science**, v. 110, n. 5, p. 525–541, 1 maio 2006.

FRANCO, E. L.; DUARTE-FRANCO, E.; FERENCZY, A. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. **CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne**, v. 164, n. 7, p. 1017–25, 3 abr. 2001.

FUTURE II STUDY GROUP. Quadrivalent Vaccine against Human Papillomavirus to Prevent High-Grade Cervical Lesions. **New England Journal of Medicine**, v. 356, n. 19, p. 1915–1927, 10 maio 2007.

GIRALDO, P. et al. Prevenção da infecção por HPV e lesões associados com o uso de vacinas. **DST – J bras Doenças Sex Transm**, v. 20, n. 2, p. 132–140, 2008.

GOLDIE, S. J. et al. Cost-effectiveness of HPV 16, 18 vaccination in Brazil. **Vaccine**, v. 25, n. 33, p. 6257–6270, 14 ago. 2007.

GRAVITT, P. E. The known unknowns of HPV natural history. **Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 12, p. 4593–4599, 1 dez. 2011.

HARPER, D. M.; VIERTHALER, S. L. Next Generation Cancer Protection: The Bivalent HPV Vaccine for Females. **ISRN obstetrics and gynecology**, v. 2011, p. 457204, 2011.

HENRIQUE DUARTE, S. J. et al. Fatores de risco para câncer cervical em mulheres assistidas por uma equipe de saúde da família em Cuiabá, MT, Brasil TT - Factores de riesgo de cáncer de cuello

uterino en mujeres asistidas por un equipo de salud de la familia en Cuiabá, MT, Brasil TT. **Cienc. enferm**, v. 17, n. 1, p. 71–80, 2011.

KATHERINE, A. et al. A eficácia da vacina profilática contra o HPV nas lesões HPV induzidas. **Femina**, v. 37, n. 1, p. 519–526, 2009.

LINHARES, A. C.; VILLA, L. L. Vacinas contra rotavírus e papilomavírus humano (HPV). **Jornal de Pediatria**, v. 82, n. 3, p. s25–s34, jul. 2006.

LOWY, D. R.; SCHILLER, J. T. Prophylactic human papillomavirus vaccines. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 5, p. 1167–1173, 1 maio 2006.

MUÑOZ, N. et al. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 6, p. 518–527, 6 fev. 2003.

NADAL, S. R.; MANZIONE, C. R. Vacinas Contra o Papilomavirus Humano. **Rev bras Coloproct**, v. 26, n. 3, p. 337–340, 2006.

NATUNEN, K. et al. Aspects of Prophylactic Vaccination against Cervical Cancer and Other Human Papillomavirus-Related Cancers in Developing Countries. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, v. 2011, p. 675858, 2011.

NELSON, L. M.; ROSE, R. C.; MOROIANU, J. Nuclear Import Strategies of High Risk HPV16 L1 Major Capsid Protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 26, p. 23958–23964, 28 jun. 2002.

NEVES, D. et al. Prevalence of human papillomavirus in penile carcinoma. **International Braz J Urol**, v. 28, n. 3, p. 221–226, 2002.

PARELLADA, C.; PEREYRA, E. Papilomavíroses Humana. In: **Tratado de Infectologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 89–102.

PARKIN, D. M.; PISANI, P.; FERLAY, J. Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. **International journal of cancer**, v. 54, n. 4, p. 594–606, 19 jun. 1993.

RODEN, R.; WU, T.-C. How will HPV vaccines affect cervical cancer? **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 10, p. 753–763, out. 2006.

ROSA, M. I. DA et al. Papilomavírus humano e neoplasia cervical. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, n. 5, p. 953–964, 2009.

SCHEURER, M. E.; TORTOLERO-LUNA, G.; ADLER-STORTHZ, K. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 15, n. 5, p. 727–746, set. 2005.

SECRETARIA DO ESTADO DE SÃO PAULO DA SAÚDE. **INFORME TÉCNICO - Vacina contra o papilomavírus humano (HPV)** São Paulo, 2014. Disponível em: <ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc\_tec/imuni/HPV14\_INFORME\_TECNICO.pdf>. Acesso em: 18 dez. 2018

## INFECÇÃO SIMULTÂNEA POR MORBILIVÍRUS CANINO E ADENOVÍRUS EM UM MÃO-PELADA (*Procyon cancrivorus*)

### **Mariana de Mello Zanim Michelazzo**

Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva – Laboratório de Anatomia Patológica, Londrina, Paraná.

### **Nayara Emily Viana**

Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva – Laboratório de Anatomia Patológica, Londrina, Paraná.

### **Zalmir Silvino Cubas**

Itaipu Binacional, Refúgio Biológico Bela Vista, Foz do Iguaçu, Paraná.

### **Selwyn Arlington Headley**

Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva – Laboratório de Anatomia Patológica, Londrina, Paraná.

Mão-pelada (*Procyon cancrivorus*), também conhecido como Guaxinim, é um mamífero de pequeno a médio porte que apresenta uma máscara facial característica, corpo coberto por pelos castanho-acinzentados, com exceção das mãos (característica que lhe confere um de seus nomes populares), cauda longa e anelada. Podem ser encontrados desde a América Central até a América do Sul, estando presentes em todos os biomas brasileiros (Bianchi, 2009). Em relação ao risco de extinção, são considerados espécie Menos Preocupante (*Least Concern*), segundo a IUCN (*International Union for Conservation of Nature*).

Dentre os procionídeos, o Mão-pelada é uma das espécies menos estudadas no Brasil, com escassa literatura sobre sua ecologia em vida livre e, sobretudo, sobre as enfermidades que apresentam (Teixeira and Ambrosio, 2014). Não há relatos brasileiros sobre doenças infecciosas envolvendo especificamente essa espécie. Este relato objetiva determinar a ocorrência de possíveis infecções através da análise histopatológica e imunohistoquímica (IHQ). Fragmentos de tecidos já fixados em solução formalina a 10% foram gentilmente cedidos pelo Refúgio Biológico Bela Vista de Itaipu (RBV), como parte de um extenso projeto de investigação sobre doenças infectocontagiosas em animais selvagens, onde estão sendo avaliados tecidos de 13 espécies de carnívoros silvestres da coleção do RBV. Os tecidos do exemplar de *P. cancrivorus* foram processados para histopatologia de rotina no Laboratório de Anatomia Patológica da Universidade Estadual de Londrina. Posteriormente foram selecionados para a realização de ensaios imuno-histoquímicos, onde fragmentos de intestino delgado foram testados para parvovírus canino tipo 2 (CPV-2), os de pulmão para o morbilivírus canino (cinomose, CDV), adenovírus tipo 1 (CAdV-1) e tipo 2 (CAdV-2) e o cerebelo para CDV. O

diagnóstico histopatológico revelou no intestino, enterite atrófica com necrose e fusão multifocal moderada das vilosidades (Figura 1 – A); no pulmão, degeneração balonosa multifocal moderada no epitélio brônquico (Figura 1 – B); no cerebelo, esponjose e edema perivascular difuso moderado na substância branca. O padrão das lesões observadas na histopatologia foi utilizado como direcionamento para a escolha dos ensaios IHQ. Tripla infecção viral foi detectada na IHQ: o intestino delgado continha antígenos de CPV-2 nos enterócitos das criptas e nas vilosidades (Figura 1 – C), enquanto houve imunorreatividade para os antígenos de CDV e CAdV-2 nas células epiteliais do pulmão (Figura 1 - D); antígenos de CAdV-1 não foram identificados no pulmão e não houve imunorreatividade para CDV no cerebelo. Não foram encontrados relatos de co-infecções por esses agentes infecciosos em *P. cancrivorus* no Brasil e há poucos relatos no mundo. A enterite observada no intestino delgado deste mão-pelada é semelhante àquela observada na parvovirose canina (Courtenay et al., 2001), assim como a degeneração balonosa no epitélio dos brônquios e bronquíolos para infecções por CAdV-2 em cães. Curiosamente, este animal não apresentava pneumonia intersticial, que é frequentemente diagnosticada em casos de CDV (Headley et al., 2018), porém, apresentou-se imunorreativo para CDV no pulmão, sugerindo que existiu a infecção, mas sem apresentar lesões microscópicas detectáveis. As lesões observadas no encéfalo foram inespecíficas. Acredita-se que a proximidade de cães domésticos errantes, com acesso à reserva do RBV seja o principal fator predisponente para a infecção dos carnívoros silvestres dessa região, mantendo assim a fonte de infecção permanentemente ativa entre os cães domésticos e os carnívoros silvestres (Courtenay et al., 2001). Este relato demonstra que o *P. cancrivorus* está susceptível a infecções virais por agentes de cães domésticos e resultam em lesões microscópicas que são consistentes com as lesões observadas no cão doméstico.

## REFERÊNCIAS

- Bianchi, R. C., (2009). Ecologia de mesocarnívoros em uma área no Pantanal Central, Mato Grosso do Sul. *Centro de Ciências Biológicas e da Saúde*, p. 205. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande.
- Courtenay, O., R. J. Quinnell and W. S. Chalmers, (2001). Contact rates between wild and domestic canids: no evidence of parvovirus or canine distemper virus in crab-eating foxes. *Veterinary Microbiology*, 81, 9-19.
- Headley, S. A., T. E. S. Oliveira, A. H. T. Pereira, J. R. Moreira, M. M. Z. Michelazzo, B. G. Pires, . . . A. A. Alfieri, (2018). Canine morbillivirus (canine distemper virus) with concomitant canine adenovirus, canine parvovirus-2, and *Neospora caninum* in puppies: a retrospective immunohistochemical study. *Scientific Reports*, 8, 13477.
- Teixeira, R. H. F. and S. R. Ambrosio, (2014). Carnívora - Procyonidae (Quati, Mão-pelada e Jupará). In: Z. S. Cubas, J. C. R. Silva and J. L. Catão-Dias (eds), *Tratado de Animais Selvagens*, p. 2470. ROCA, São Paulo.

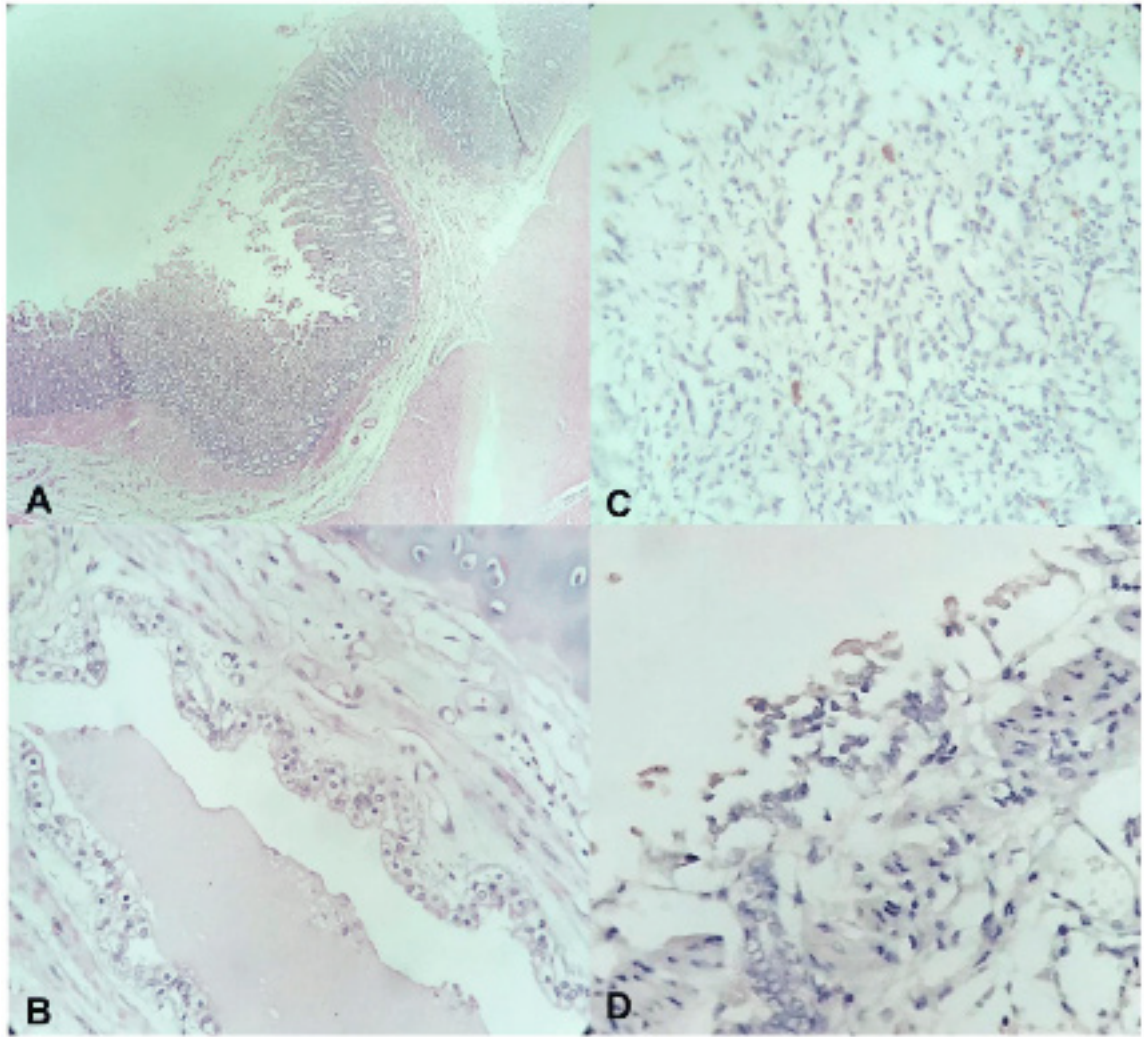


Figura 1 - A: Intestino delgado, enterite atrófica (4x); B: Pulmão, degeneração balonosa do epitélio brônquico (40x); C: Intestino delgado, imunopositividade para CPV (40x); D: Pulmão, imunopositividade para CDV nas células epiteliais dos brônquios (40x)

## LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA: EPIDEMIOLOGIA DA FORMA MUCOSA NO ESTADO DO TOCANTINS NO PERÍODO DE 2011 A 2015

### **Bruna Silva Resende**

Faculdade Presidente Antônio Carlos Porto  
(FAPAC - ITPAC PORTO), Faculdade de Medicina  
Porto Nacional - Tocantins.

### **Ana Lívia Fonseca Ferreira**

Faculdade Presidente Antônio Carlos Porto  
(FAPAC - ITPAC PORTO), Faculdade de Medicina  
Porto Nacional - Tocantins.

### **Fernanda da Silva Ferreira**

Faculdade Presidente Antônio Carlos Porto  
(FAPAC - ITPAC PORTO), Faculdade de Medicina  
Porto Nacional - Tocantins.

### **Joandson dos Santos Souza**

Faculdade Presidente Antônio Carlos Porto  
(FAPAC - ITPAC PORTO), Faculdade de Medicina  
Porto Nacional - Tocantins.

### **Deyse Sabrinne de Souza Lopes**

Faculdade Presidente Antônio Carlos Porto  
(FAPAC - ITPAC PORTO), Faculdade de Medicina  
Porto Nacional - Tocantins.

### **Carina Scolari Gosch**

Faculdade Presidente Antônio Carlos Porto  
(FAPAC - ITPAC PORTO), Faculdade de  
Medicina, Departamento de Microbiologia,  
Imunologia e Parasitologia  
Porto Nacional – Tocantins

de pessoas em todo o mundo. As manifestações clínicas podem variar desde uma simples lesão cutânea até lesões destrutivas da mucosa nasal, oral, faríngea e laríngea. A forma mucosa é a mais grave manifestação, pois apresenta potencial para causar deformidade, leva a incapacidade e, em alguns casos, evolução para o óbito. O diagnóstico é feito através de dados clínico-epidemiológicos e laboratoriais. A identificação da prevalência e a análise das características clínico-epidemiológicas, laboratoriais, terapêuticas e evolução da forma mucosa no estado do Tocantins - Brasil, no período de 2011 a 2015, foi realizada através da coleta dos dados de notificação do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), com o objetivo de traçar o perfil da doença no estado. Foram notificados 1450 casos de LTA autóctones, dos quais 5,44% com a forma mucosa. A maior parte dos pacientes são homens acima dos 50 anos de idade (60,75%), pardos, com baixa escolaridade, residentes na zona urbana, com doença classificada como relacionada ao trabalho. O exame direto foi a metodologia mais empregada para confirmação do diagnóstico, seguido de Intradermorreção de Montenegro e histopatológico. No tratamento a droga de escolha foi o antimonial pentavalente, com 86% de cura. Verificou-se 1,2% de óbitos. O conhecimento do perfil dos pacientes mais acometidos pela doença é necessário para

**RESUMO:** A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecto parasitária, não contagiosa, que afeta milhões

melhorar a abordagem das estratégias de prevenção e controle, além de, melhor assistir os indivíduos mais susceptíveis a evoluírem para a forma mucosa.

**PALAVRAS-CHAVE:** Leishmaniose cutânea. *Leishmania*. Notificação de doenças. Doenças negligenciadas.

**ABSTRACT:** American tegumentary leishmaniasis (ATL) is a parasitic, non-contagious, infectious disease that affects millions of people around the world. Clinical manifestations can range from a simple skin lesion to destructive lesions of the nasal, oral, pharyngeal and laryngeal mucosa. The mucosal form is the most serious manifestation, since it presents potential to cause deformity, leads to the incapacity and, in some cases, evolution to the death. The diagnosis is made through clinical-epidemiological and laboratory data. The identification of the prevalence and the analysis of the clinical-epidemiological, laboratory, therapeutic and evolution characteristics of the mucosal form in the state of Tocantins, Brazil, in the period from 2011 to 2015, was carried out through the collection of the data of notification of the Information System of Injuries (SINAN), with the purpose of tracing the profile of the disease in the state. 1450 cases of autochthonous LTA were reported, of which 5.44% were mucosal. The majority of the patients are men over 50 years of age (60.75%), brown with low schooling, urban residents with work-related illness. Direct examination was the most used methodology to confirm the diagnosis, followed by Intradermorreção de Montenegro and histopathology. In the treatment the drug of choice was the pentavalent antimonial, with 86% cure. There were 1.2% of deaths. Knowledge of the profile of the patients most affected by the disease is necessary to improve the approach to prevention and control strategies, as well as better assist the most susceptible individuals to evolve to the mucosal form. **KEYWORDS:** Cutaneous Leishmaniasis. *Leishmania*, Disease Notification. Neglected diseases.

## 1 | INTRODUÇÃO

### 1.1 Agente etiológico e formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana

As leishmanioses são consideradas pela Organização Mundial de Saúde (OMS), uma das mais importantes antropozoonoses, com registro mundial de aproximadamente dois milhões de novos casos das diferentes formas clínicas ao ano. É considerada uma doença polimorfa, com elevados índices de negligência, constituindo um problema de saúde pública em vários países. De acordo com a localização dos parasitos no hospedeiro, e consequentes manifestações clínicas, as leishmanioses são classificadas como visceral ou tegumentar (WHO, 2015; BRASIL, 2017; NASSER; WILL, 2017; DOMINICIS et al., 2018).

No território brasileiro, a forma tegumentar da doença possui uma diversidade de agentes, reservatórios e vetores, com diferentes padrões de transmissão, requerendo grande empenho técnico, político e administrativo para manutenção de ações

sistemáticas de vigilância, prevenção e controle da doença (BRASIL, 2017; OPAS, 2018).

Do ponto de vista clínico, o conceito que se tem é que as várias espécies de *Leishmania* que parasitam o homem induzem a uma doença espectral, com uma grande variedade de manifestações clínicas, que dependem da interação entre a resposta imune do hospedeiro vertebrado e a patogenicidade, o tropismo e a virulência deste parasita (KASPER et al., 2017).

A apresentação da doença é resultado de uma complexa interação entre o vetor, a espécie do parasito infectante e a resposta imunológica do hospedeiro. Assim, a leishmaniose tegumentar americana (LTA) abrange desde a leishmaniose cutânea localizada ou disseminada, mucocutânea e mucosa, que representam o pólo responsivo da doença, até a forma cutânea difusa, que representa o pólo anérgico da doença, no qual se evidencia uma baixa ou inexistente resposta imunológica do hospedeiro. Esta variação da apresentação clínica da LTA torna o diagnóstico clínico difícil, sendo necessário na maior parte das vezes, correlacionar os dados epidemiológicos e laboratoriais, para se chegar a um diagnóstico definitivo (SILVEIRA et al., 2008; ALVAR et al., 2012).

A forma mucosa é a apresentação mais grave da LTA, geralmente, manifesta-se como lesão única ou múltipla do revestimento mucoso oral, das vias aéreas superiores, faringe e laringe. Gera lesões ulceradas e perfurantes ou vegetantes e necróticas do septo cartilaginoso, cornetos nasais, palato mole, palato duro, úvula, faringe e laringe. Pode comprometer seriamente a estrutura óssea do esplanocrânio e, conseqüentemente, ocasionar problemas na deglutição, fonação, respiração, queda da pirâmide nasal, além de causar também uma expressiva alteração estética na face dos indivíduos gerando graves problemas sociais, psíquicos e econômicos (SILVEIRA et al., 2008; PALHETA NETO et al., 2008).

Acredita-se que a forma mucosa da leishmaniose seja, geralmente, causada por disseminação hematogênica das leishmanias inoculadas na pele para as mucosas, e, excepcionalmente, traquéia e árvore respiratória superior, sendo a localização preferencial da doença a mucosa do septo nasal cartilaginoso e porções mais anteriores das fossas nasais (véstibulo, as conchas nasais inferiores e assoalho nasal) (MOTA; MIRANDA, 2011; PEARSON; SOUSA, 1996).

O período de incubação da LTA é em média, de 2 a 3 meses, podendo apresentar períodos mais curtos (2 semanas) ou mais longos (2 anos) (BRASIL, 2017).

Após a manifestação da doença, a forma mucosa pode ser classificada como: Forma mucosa tardia - é a forma mais comum. Pode surgir até vários anos após a cicatrização da forma cutânea. Classicamente, está associada às lesões cutâneas múltiplas ou de longa duração, às curas espontâneas ou aos tratamentos insuficientes da leishmaniose cutânea (LC) (MOTA; MIRANDA, 2011); Forma mucosa de origem indeterminada - quando a leishmaniose mucosa (LM) apresenta-se clinicamente isolada, não sendo possível detectar nenhuma outra evidência de LC prévia. Provavelmente



associada a infecções subclínicas ou a lesões pequenas, não ulceradas, de evolução rápida e que teriam passado despercebidas, sem deixar cicatrizes perceptíveis (PALHETA NETO et al., 2008); Forma mucosa concomitante - quando a lesão mucosa ocorre à distância, porém ao mesmo tempo em que a lesão cutânea ativa (não contígua aos orifícios naturais) (MOTA; MIRANDA, 2011); Forma mucosa contígua - ocorre por propagação direta de lesão cutânea, localizada próxima a orifícios naturais, para a mucosa das vias aerodigestivas. A lesão cutânea poderá encontrar-se em atividade ou cicatrizada na ocasião do diagnóstico (PALHETA NETO et al., 2008); Forma mucosa primária - ocorre, eventualmente, pela picada do vetor na mucosa ou semimucosa de lábios e genitais (BRASIL, 2017).

## **1.2 Diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana**

O diagnóstico da LTA é realizado através da combinação e análise de dados clínico-epidemiológicos e exames laboratoriais. O diagnóstico clínico pode ser feito através das características das lesões encontradas na anamnese e exame físico do paciente. (HENRICHSEN, 2005).

Além do diagnóstico clínico, os laboratoriais tem grande valor preditivo, sendo o diagnóstico parasitológico o mais utilizado. No diagnóstico parasitológico tem-se a visualização das formas amastigotas em esfregaço de raspado da borda da lesão ou em imprint, que é feito por sobreposição dos fragmento da biópsia em lamina de vidro; histopatológico e isolamento em cultura. A reação em cadeia da polimerase (PCR), técnica molecular para identificação de material genético, possui alta sensibilidade, mas devido ao seu alto custo é pouco empregado rotineiramente (GONTIJO, 1997). Na forma mucosa, normalmente encontra-se a presença do parasito em elevada concentração nos exames parasitológicos.

O diagnóstico imunológico é feito pela intradermoreação de Montenegro (IDRM) e reações sorológicas. A IDRM detecta a presença de hipersensibilidade tardia com endureção igual ou superior que 5mm de diâmetro, com valor apenas diagnóstico, pois tem-se o aparecimento de uma resposta celular tanto durante a doença quanto após a cura da infecção. Dentre as reações sorológicas há a imunofluorescência indireta, sendo o método mais utilizado. Na forma mucosa normalmente é observado grande área de endureção na IDRM e elevados títulos de anticorpos na reação de imunofluorescência indireta (GOMES et al., 2014; BRASIL, 2017).

## **1.3 Linhas gerais do tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana**

O tratamento de primeira escolha padronizado pelo Ministério da Saúde do Brasil são os antimoniais pentavalentes, seguido por anfotericina B ou isotionato de pentamidina, sendo a anfotericina B o medicamento mais eficaz na terapêutica das lesões mucosas (BRASIL, 2017).

O antimoniato de N-metil glucamina apresenta-se em frasco de 5ml (1 ampola),

correspondente a 405 mg de Sb+5 e cada ml contém 81 mg de Sb+5, para cada forma clínica tem-se um esquema terapêutico preconizado. Nas formas cutâneas, a dose é de 10 a 20 mg/Sb/kg/dia. Sugere-se 15 mg/Sb/kg/dia durante 20 dias seguidos, intramuscular ou endovenoso. Se não houver cicatrização completa até 3 meses após o tratamento, o esquema deverá ser repetido com duração de 30 dias. Se não tiver sucesso, opta-se pela droga de 2ª escolha: anfotericina B ou isotionato de pentamidina. Na forma difusa, a dose é de 20 mg/Sb/kg/dia durante 20 dias seguidos. As formas mucosas apresentam maior possibilidade de recidiva, assim, terapia máxima é recomendado, sendo usado a dose é de 20 mg/Sb/kg/dia durante 30 dias consecutivos. Se não houver cicatrização após 3 meses do término do tratamento, deve ser repetido o esquema apenas 1 vez. Caso não seja obtida resposta, deve utilizar uma das drogas de 2ª escolha (BRASIL, 2017).

Além da cardio, nefro e hepatotoxicidade o antimoniato pentavalente possui os efeitos colaterais: fadiga, dores pelo corpo, elevação dos níveis de aminotransferase, pancreatite, artralgia, mialgia, anorexia, náuseas, vômitos e cefaléia (ALVES, 2001).

A anfotericina B é um antibiótico que é mais eficaz nas lesões mucosas. A dose inicial é de 0,5 mg/kg/dia, aumentando gradativamente até 1 mg/kg/dia. Deve-se administrar em dias alternados, com máximo de 50 mg por aplicação, até a dose total de 1,0 – 1,5 g para LC e de 2,5 – 3,0 g para LM ou LCM (BRASIL, 2017).

A anfotericina B clássica é efetiva na forma mucosa de leishmaniose, mas muito tóxica e também passível de recidiva. Seu uso é limitado por suas reações adversas, incluindo anafilaxia, trombocitopenia, dor generalizada, convulsões, calafrio, febre, flebite, anemia, anorexia, diminuição da função tubular renal e hipocalcemia em um terço dos pacientes (SAMPAIO et al., 1971).

A vantagem do uso da anfotericina B associada à lipossoma fundamenta-se no fato dos lipossomas serem fagocitados pelos macrófagos, sítio da infecção intracelular, interagindo diretamente com o ergosterol do parasita e reagindo menos com o colesterol da célula do hospedeiro, aumentando a eficácia da droga e sua tolerabilidade assim reduzindo efeitos colaterais, inclusive em pacientes sem resposta terapêutica aos antimoniais pentavalentes. Seu uso é limitado pelo alto custo e administração endovenosa (OLIVEIRA et al., 2011; BLUM et al., 2014).

Existem outras drogas utilizadas no tratamento da leishmaniose, como: cetoconazol, itraconazol, dopsona, alupurinol, pentamidina, mefloquina e sulfato de aminosidina. Contudo, muitas destas não possuem resultados clínicos consistentes e garantidos (BLUM et al., 2014; ARONSON et al., 2017).

#### **1.4 Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana**

No ano de 2003, foi confirmada a autoctonia da leishmaniose em todas as unidades federadas do Brasil, e, apesar das falhas na notificação compulsória, entre os anos de 1991 e 2010 houve uma média anual de 27.374 casos registrados no

país, revelando a ocorrência de expansão geográfica da doença no território nacional (BRASIL, 2002; BRASIL, 2009).

O Brasil, no ano de 2016, foi o país o que apresentou maior número de casos de LC e LM dentre os países das Américas, com registro de 12.690 casos, seguido da Colômbia (10.966 casos) e Nicarágua (5.423 casos) (OPAS, 2018).

Observa-se ainda que, no período de 2011 a 2015, houve um registro médio anual 20.571 casos. As regiões Norte e Nordeste contribuem com as maiores taxas de notificação de LTA, com 45,25% e 30,82% dos casos notificados no período, respectivamente, já a região Sul contribui com os menores índices de notificação (BRASIL, 2016; NEVES, 2017).

No Tocantins, a taxa de incidência da LTA em 2012 foi de 31,18 por 100.000 habitantes, contrastando com a incidência brasileira, cuja taxa foi de 11,86 por 100.000 habitantes no mesmo ano. Os municípios do Tocantins com maiores números de casos de LTA notificados no ano de 2017 foram Palmas (30 casos), Araguaína (16 casos) e Lavandeira (9 casos) (BRASIL, 2012).

Os fatores que contribuem para a evolução de uma doença inicialmente cutânea para uma forma mais grave, como a mucosa, com possibilidade de deixar sequelas deformantes e/ou funcionais e até mesmo ser fatal, não é de todo conhecido, mas, sabe-se que, a demora no diagnóstico, na cicatrização da lesão primária e tratamento inicial inadequado podem estar associados. Assim, a investigação da prevalência e das características da forma mucosa da LTA no estado do Tocantins é importante para montar estratégias que possam evitar que lesões destrutivas, desfigurantes e incapacitantes, com grande repercussão psicossocial do indivíduo continuem acontecendo.

## **2 | MATERIAIS E MÉTODOS**

Trata-se de um estudo retrospectivo e descritivo. Foi realizada uma análise quantitativa dos dados referentes aos casos notificados da forma mucosa de LTA no estado do Tocantins – Brasil no período de 2011 a 2015. Realizou-se ainda uma avaliação das características clínicas, epidemiológicas, laboratoriais, terapêuticas e evolutivas dos pacientes. As informações foram coletadas das fichas epidemiológicas notificadas no Sistema de Informação e Notificação de Agravos (SINAN) durante o período de abrangência do estudo.

## **3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO**

No período de 2011 a 2015 foram notificados 1450 casos de LTA autóctones do estado do Tocantins, dos quais, 79 (5,44%) foram diagnosticados com a forma mucosa

da doença. Foram crescentes os registros de notificação dos casos entre os anos de 2011 (10 casos) e 2014 (22 casos), com redução nas notificações em 2015 (12 casos) (Tabela 1).

ANO DE NOTIFICAÇÃO	TOTAL	
	N	%
2011	10	12,6
2012	14	17,7
2013	21	26,5
2014	22	27,8
2015	12	15,1
TOTAL	79	100

Tabela 1- Distribuição dos casos de LTA com forma mucosa no estado do Tocantins – TO, Brasil, no período de 2011 a 2015.

Estudo realizado no estado do Tocantins verificou redução das notificações de LTA no ano de 2015 no estado. Os autores atribuíram esse achado à intensificação das ações referentes à vigilância epidemiológica a partir do ano de 2014, com implementação de capacitações técnicas realizadas nos municípios com maior número de casos notificados e a realização do II fórum de leishmanioses no estado (GOSCH et al., 2017). Essas ações foram fatores que contribuíram para redução do risco de exposição e infecção ao agente etiológico da leishmaniose, que, secundariamente, também poderiam ter gerado impacto positivo resultando em uma menor evolução dos casos de LC para LM em 2015.

Em relação às características sócio-demográficas (Tabela 2), verificou-se que a maior parte dos pacientes são homens (78,4%), da raça parda (68,3%), com idade entre 51 e 70 anos (45,5%), baixa escolaridade, residentes na zona urbana, porém com atividade profissional ligada à zona rural.

CARACTERÍSTICAS	TOTAL	
	N	%
<b>Sexo</b>		
Masculino	62	78,4
Feminino	17	21,5
TOTAL	79	100
<b>Raca/Cor</b>		
Branco	12	15,1
Preta	8	10,1
Parda	54	68,3
Indígena	3	3,7
Ignorada	1	1,2

N/D*	1	1,2
TOTAL	79	100
<b>Idade</b>		
1 – 10 anos	1	1,2
11 – 20 anos	5	6,3
21 – 30 anos	12	15,1
31 – 40 anos	10	12,6
41 – 50 anos	5	6,3
51 – 60 anos	16	20,2
61 – 70 anos	20	25,3
71 – 80 anos	7	8,8
81 – 90 anos	2	2,5
> 90 anos	1	1,2
TOTAL	79	100
<b>Escolaridade</b>		
Analfabeto	4	5,0
Ensino Fundamental Incompleto	30	37,9
Ensino Fundamental Completo	5	6,3
Ensino Médio Incompleto	1	1,2
Ensino Médio Completo	10	12,6
Ignorado/Branco	10	12,6
Não se aplica	2	2,5
Vazia	17	21,5
TOTAL	79	100
<b>Ocupação</b>		
Trabalho relacionado à zona rural	17	21,5
Trabalho relacionado à zona urbana	11	13,9
Dona de casa	4	5,0
Estudantes	1	1,2
Aposentados	10	12,6
Ignorado/Branco	36	45,5
TOTAL	79	100
<b>Zona de Residência</b>		
Rural	31	39,2
Urbana	43	54,4
Vazia	5	6,3
TOTAL	79	100

Tabela 2 – Distribuição dos casos notificados de LTA com forma mucosa segundo aspecto sócio-demográfico, no estado do Tocantins - TO, Brasil, no período de 2011 a 2015. \*N/D =Não

determinado.

Existe forte correlação entre o gênero masculino e o aumento no coeficiente de incidência da leishmaniose. Fatores hormonais e àqueles relacionados à exposição vetorial (atividades laborais masculinas) são apontados na literatura como agentes responsáveis por aumentar o risco da doença na população adulta do sexo masculino (GOÉS et al., 2012). Alguns autores complementam ainda que, além dos níveis mais elevados de testosterona na população masculina, há ainda a influência de fatores relacionados ao cromossomo Y, que reforçam a associação entre o gênero masculino e carga parasitária (GIEFING-KROLL et al., 2015).

Os casos notificados no estado do Tocantins predominaram na população não branca, isso pode ser justificado pelo elevado percentual de pessoas de raça parda no norte do Brasil. Além disso, até o momento, não há estudos que demonstrem resistência de alguma raça contra a *Leishmania*, ademais, o vetor não é capaz de diferenciar ou selecionar a etnia a ser contaminada (CARDOSO et al., 2015; VALADAO et al., 2016).

A faixa etária mais acometida pela forma clínica mucosa foi a da população com idade acima de 50 anos. Estudos realizados nos estados do Tocantins (TO), Goiás (GO) e Alagoas (AL) apontam que a população de adultos economicamente ativa (20-59 anos) é a mais acometida pela LTA (GOSCH et al., 2017; GRAZIANI; OLIVEIRA; SILVA, 2013; ROCHA et al., 2015).

O predomínio da forma mucosa nas faixas etárias mais elevadas está atrelado ao caráter de complicação secundário da doença (NUNES et al., 2011). O número elevado de casos na faixa etária acima dos 50 anos é condizente com as evidências que sugerem que, entre os pacientes com LC que evoluem para LM, 90% ocorrem dentro de 10 anos. Pode haver, também, lesão mucosa sem lesão primária na pele, principalmente com a diminuição da resposta imunológica do hospedeiro com o avançar da idade, entretanto, a ausência de lesão primária na pele é descrita em apenas 15% dos casos, nos quais especula-se ainda a existência de lesão primária abortiva (MOTA; MIRANDA, 2011; BRASIL, 2017).

Observou-se maior registro de casos de LM na população com baixa escolaridade, com predomínio naquela com ensino fundamental incompleto (37,9%). Os índices encontrados nessa variável já haviam sido documentados em outros estudos, que apontam ser comum o acometimento da população com baixo poder aquisitivo, cujo nível de escolaridade geralmente é reduzido, estando mais passíveis à aquisição de doenças consideradas negligenciadas (SILVA; MUNIZ, 2009; SANTOS, 2018).

Embora 21,5% dos casos notificados com a forma mucosa da doença tenham atividade profissional relacionada ao ambiente rural, a maioria (54,4%) são pacientes que residem na zona urbana do estado do Tocantins, sugerindo também a possibilidade da infecção ocorrer no ambiente urbano, uma vez que é a adaptação dos vetores da LTA nesse ambiente já foi identificado, fato bastante relacionado a processos migratórios e

desmatamentos (SILVA; CUNHA, 2007; GOSCH et al., 2017).

Esse achado é compatível com dados literários que apontam que, nas últimas décadas, ocorreram mudanças no comportamento epidemiológico da leishmaniose no Brasil. Inicialmente a LTA estava ligada às atividades florestais, aos desmatamentos e queimadas da vegetação nativa primária, tendo animais silvestres como reservatórios e o homem acidentalmente era infectado, no entanto, cada vez mais tem sido observados casos de LTA em zonas rurais praticamente desmatadas, em áreas de colonização antiga, peri-urbana e centros urbanos, estando a doença relacionada à adaptação dos parasitas e vetores às alterações ambientais e aos animais domésticos como novos reservatórios (VALE; FURTADO, 2005; NEGRÃO; FERREIRA, 2014).

Embora tenhamos encontrado uma relação entre a LM e a atividade profissional ligada ao ambiente rural, é preciso levar em consideração que, em 45,5% dos casos o registro da profissão na ficha de notificação foi ignorado, e isso compromete a realidade dos resultados encontrados nessa variável.

Quanto às características clínicas (Tabela 3), o critério de confirmação diagnóstico mais utilizado foi o laboratorial (81%).

CARACTERÍSTICAS	TOTAL	
	n	%
<b>Critério de Confirmação</b>		
Laboratorial	64	81,0
Clínico-epidemiológico	15	18,9
TOTAL	79	100
<b>Exame Parasitológico Direto</b>		
Positivo	32	40,5
Negativo	8	10,1
Não Realizado	39	49,3
TOTAL	79	100
<b>Intradermorreação de Montenegro (IRM)</b>		
Positivo	28	35,4
Negativo	5	6,3
Não realizado	46	58,2
TOTAL	79	100
<b>Histopatologia</b>		
Encontro do parasite	6	7,5
Compatível	12	15,1
Não compatível	4	5,0
Não realizado	57	72,1
TOTAL	79	100

Tabela 3 – Distribuição dos casos notificados de LTA com forma mucosa, segundo características clínico-laboratorial no estado do Tocantins – TO, Brasil, no período de 2011 a 2015.

O diagnóstico clínico de LTA pode ser feito através das características das lesões encontradas na anamnese e exame físico do paciente. Na anamnese, explora-se, por exemplo, o local onde vive o paciente, a profissão, presença de outros indivíduos com lesões similares, presença de animais domésticos ou no ambiente peridomiciliar. O critério clínico-epidemiológico foi utilizado apenas para a classificação de 15 pacientes (18,9%) notificados no Tocantins, provavelmente, pela dificuldade em fazê-lo em razão às divergências quanto às formas de manifestação da LTA, dependendo de fatores ligados à espécie e cepas do parasito, hábitos do vetor, fatores ligados à resposta imune do hospedeiro e de fatores resultantes da interação parasito-hospedeiro, assim, o diagnóstico clínico algumas vezes pode não ser suficiente (HENRICHSEN, 2005; CARVALHO, 2012).

Dentre os exames laboratoriais realizados para confirmação diagnóstica, o parasitológico direto foi o mais empregado, seguido da intradermorreção de Montenegro e histopatológico. O exame parasitológico direto revelou resultado positivo em 32 casos (40,5%). A intradermorreção de Montenegro foi positiva em 34,5% dos pacientes e no exame histopatológico o parasita foi encontrado em 7,5% dos exames. Sabe-se que para um diagnóstico definitivo de leishmaniose é fundamental o encontro do parasito ou seus produtos nos tecidos ou fluidos biológicos do hospedeiro. Aumenta também a veracidade diagnóstica a associação entre dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais (GRIMALDI; TESH, 1993).

Observou-se ainda elevada frequência de não realização dos exames laboratoriais em grande parcela dos casos notificados, isso pode ser resultado da falta de qualificação dos profissionais da saúde e/ou falta de recursos dos laboratórios de saúde pública e particular em determinadas localidades no estado do Tocantins.

O tratamento dos pacientes seguiu as recomendações padronizadas pelo Ministério da Saúde do Brasil, sendo 69,7% dos pacientes tratados com antimoniatto pentavalente, a droga de primeira escolha (Tabela 4).

CARACTERÍSTICAS	TOTAL	
	n	%
<b>Droga inicial</b>		
Antimonial Pentavalente	55	69,7
Anfotericina B	9	11,3
Não utilizado	4	5,0
Outras	4	5,0
N/D*	7	8,8
TOTAL	79	100



	Evolução	
Cura	68	86,0
Mudança de diagnóstico	1	1,2
Óbito	1	1,2
Óbito por outras causas	2	2,5
Transferência	1	1,2
Vazia	6	7,5
TOTAL	79	100

Tabela 4 – Distribuição dos casos notificados de LTA com forma mucosa, segundo terapêutica empregada e evolução do caso, no estado do Tocantins – TO, Brasil, no período de 2011 a 2015. \*N/D =Não determinado.

Para a forma mucosa ou as cutâneas que apresentam resistência ao tratamento e conseqüentemente, maior possibilidade de evolução ou recidiva, é recomendado o uso de uma terapia máxima (20mg/kg/30dias), se não houver cicatrização completa em três meses (12 semanas) após o término do tratamento, o esquema deverá ser repetido apenas uma vez. Nos casos em que o paciente não responde bem a essa droga, opta-se por drogas de segunda escolha como a anfotericina B, que é mais eficaz nas lesões mucosas e foi utilizada por nove pacientes (11,3%) no período analisado (PELISSARI et al., 2011; BRASIL, 2017).

Sabe-se que pacientes que recebem tratamento com antimoniato de N-metilglucamina para LM apresentam elevados índices de recidiva, principalmente no primeiro ano após o tratamento, sendo fundamental um seguimento sistematizado, preferencialmente com acompanhamento especializado (FANTAUZZI et al., 2012).

Verificou-se que 86% dos pacientes evoluíram para cura após o término da terapia medicamentosa, e em apenas um caso (1,2%) houve mudança de diagnóstico. Entretanto o percentual de cura é ainda maior (92,1%) quando desconsiderados os casos com mudança de diagnóstico, transferências e óbitos. A evolução para cura na maioria dos casos notificados também foi observada em estudo realizado no estado do Maranhão (MA) e permite sugerir que o protocolo de tratamento e acompanhamento da LTA está sendo apropriado (SANTOS, 2018).

Embora o acompanhamento para controle de recidivas dos casos de LM seja uma recomendação do Ministério da Saúde, sabe-se que essa não é a realidade na maioria dos municípios brasileiros e não se tem conhecimento se os pacientes que evoluíram para cura tiveram um seguimento adequado para verificar a ocorrência de recidivas (BRASIL, 2017).

Os critérios de cura clínica estabelecidos na atualidade para LTA são falhos, pois as leishmanias podem persistir mesmo nas lesões de pele cicatrizadas. Para LC, a cura clínica consiste na epitelização completa de todas as lesões, com desaparecimento da crosta, descamação e eritema em até 180 dias após o término do primeiro esquema

de tratamento. Já na LM, deve-se verificar a regressão de todos os sinais em até seis meses após o término do tratamento (de PAULA, 2010; BRASIL, 2017).

Cerca de 3 a 5% dos casos de LC desenvolvem lesão mucosa, e destes, 1% pode evoluir para óbito em virtude da cronicidade ou complicações como infecção respiratória (NUNES et al., 2011). Em nosso estudo, o percentual de casos de LM foi de 5,44% e de evolução para óbito de 1,8%, ambos acima da média nacional.

Classicamente, a LM surge de maneira secundária, manifestando-se após cura clínica de doença com lesão cutânea. Estudo realizado no ano de 2011 verificou que a presença de lesão cutânea prévia foi mencionada por 71% dos pacientes, e 37,5% dos acometidos afirmaram história de tratamento anterior contra LC (Nunes et al., 2011).

No Tocantins 79,7% dos pacientes apresentaram LM sem presença de lesão cutânea associada, além disso, em 67% dos casos notificados não havia a presença de cicatriz cutânea referente à ocorrência de LTA no passado (Tabela 5).

CARACTERÍSTICAS	TOTAL	
	n	%
<b>Forma mucosa com presença de lesão cutânea</b>		
Sim	16	20,2
Não	63	79,7
TOTAL	79	100
<b>Forma mucosa com presença de cicatriz cutânea</b>		
Sim	21	26,5
Não	53	67,0
Vazia	5	6,3
TOTAL	79	100

Tabela 5-Associação entre LTA forma mucosa e presença de alterações cutâneas nos casos notificados no estado do Tocantins – TO, Brasil, no período de 2011 a 2015.

Alguns pacientes podem apresentar envolvimento da mucosa nasal sem comprometimento cutâneo prévio. Nesses casos, nem sempre é possível determinar o sítio de penetração da Leishmania, ou estabelecer se o paciente possuía uma forma subclínica da LC antes do desenvolvimento da lesão mucosa. Em situações como essas é possível que a penetração da Leishmania tenha ocorrido ao nível da transição cutâneo mucosa do nariz (LESSA et al., 2007).

Além disso, um estudo realizado verificou que, em áreas endêmicas, a presença de cicatriz cutânea ou história prévia de LC não foram bons marcadores clínicos com intuito de triagem de LM em pacientes com queixas nasais (Fantauzzi et al., 2012).

A mucosa nasal é a localização preferencial para instalação de lesões mucosas da LTA, entretanto os lábios, boca, faringe e laringe são localidades que também

podem ser atingidas. Os sinais e sintomas mais precoces da LM são obstrução nasal, epistaxe e a presença de granuloma no septo nasal anterior (LESSA et al., 2007; MOTA; MIRANDA, 2011).

#### 4 | CONCLUSÃO

Diante do perfil epidemiológico da leishmaniose mucosa no estado do Tocantins, nota-se que essa é uma doença que ainda persiste na população. A parcela de pacientes atingida necessita de melhor assistência à saúde e mobilização constante de recursos para colocar em prática planos de ação e controle, a fim de, evitar o ciclo de transmissão e evolução da doença para formas incapacitantes, deformantes, recidivantes e óbito. Apesar da maioria dos casos terem evoluído para cura no período da pesquisa, é importante ressaltar sempre a necessidade de um diagnóstico oportuno, tratamento adequado e acompanhamento sistematizado como bases fundamentais para o controle da LTA.

#### 5 | AGRADECIMENTOS

Agradecemos Secretaria Municipal de Saúde de Porto Nacional e a Secretaria Estadual de Saúde do Tocantins, por fornecer os dados de notificação necessários ao desenvolvimento do trabalho.

#### REFERÊNCIAS

- ALVAR, J.; VELEZ, I. D.; BERN, C.; et al. **The WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence.** Plos One. v. 7, p e35671, 2012.
- ALVES, W. A. **Estudo epidemiológico da leishmaniose tegumentar na área urbana do município de Viçosa. Viçosa.** 2001. 149f. Dissertação (Mestrado Magister Scientiae) -Universidade Federal de Viçosa. Viçosa. 2001.
- ARONSON, N.; HERWALDT, B. L.; LIBMAN, M.; RICHARD, P.; LOPEZ-VELEZ, R.; WEINA, P.; CARVALHO, E.; EPHROS, M.; JERONIMO, S.; MAGIL, A. **Diagnosis and treatment of leishmaniasis: Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of America (IDSA) and the American society of tropical medicine and hygiene (ASTMH).** American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 96, n. 1, p. 24-45, 2017.
- BLUM, J.; BUFFET, P.; VISSER, L.; HARMS, G.; BAILEY, M. S.; CAUMES, E.; CLERINX, J.; VAN THIEL, P. P.; MORIZOT, G.; HATZ, C.; DORLO, T. P.; LOCKWOOD, D. N. **Leishman recommendations for treatment of cutaneous and mucosal leishmaniasis in travelers, 2014.** Journal of Travel Medicine, v. 21, n. 2, p. 116-129, 2014.
- BRASIL, Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). **Leishmaniose Tegumentar Americana - Boletim Eletrônico Epidemiológico.** 2002. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/periodicos/boletim\\_eletronico\\_epi\\_ano02\\_n05.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/periodicos/boletim_eletronico_epi_ano02_n05.pdf)> Acesso em 28 de dezembro de 2018.
- BRASIL, Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica.** 7ed. Brasília: Ministério da

Saúde, 2009. 813p. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_vigilancia\\_epidemiologica\\_7ed.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_epidemiologica_7ed.pdf)> Acesso em 17 de agosto de 2018.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Indicadores de Morbidade – Taxa de incidência da leishmaniose tegumentar Americana**. 2012. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?idb2012/d0204.def>> Acesso em 13 de setembro de 2018.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Casos de leishmaniose tegumentar – Brasil, grandes regiões e unidades federadas 1990 a 2016**. 2016. Disponível em: <<http://portal.arquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/setembro/14/LT-Casos.pdf>> Acesso em 13 de setembro de 2018.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar**. Brasília: Ministério da Saúde, 2017. 189p. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_leishmaniose\\_tegumentar.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf)> Acesso em 13 de setembro de 2018.

CARDOSO, R. F.; MELO, B. G.; PEREIRA, W. M. M.; PALÁCIOS, V. R. C. M.; BARBOSA, A. V.; GONCALVES, N. V. **Estudo Socioepidemiológico e Espacial de Leishmaniose Tegumentar Americana em Município do Pará**. Revista Paraense de Medicina, v. 29, n.3, p.29-36, 2015.

CARVALHO, E. M. **Parasite, vectors and reservoirs as determinants of tegumentar leishmaniasis**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 45, n. 4, p. 423-424, 2012.

de Paula, C. C. **Investigação da presença de *Leishmania* em lesões cutâneas cicatrizadas e pele sadia de pacientes com leishmaniose tegumentar americana clinicamente curados**. Rio de Janeiro. 2010. 83f. Dissertação (Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas) - Fundação Oswaldo Cruz - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas. Rio de Janeiro. 2010.

DOMINICIS, C.; FERREIRA, F. R.; RABAY, M. O.; MANDELBAUM, S. H. **Leishmaniose tegumentar americana: uma doença polimorfa**. Revista SPDV, v. 76, n. 2 p.177-180, 2018.

FANTAUZZI, R. S.; GONCALVES, D. U.; MELO, F. M.; LIMA, F. V. V.. **Aspectos clínicos e epidemiológicos da leishmaniose mucosa no município de Belo Horizonte, Brasil**. Revista Médica de Minas Gerais, v. 22, n. 4, p. 369-373, 2012.

GIEFING-KROLL, C.; BERGER, P.; LEPPERDINGER, G.; GRUBECK- LOEBENSTEIN, B. **How sex and age affect immune responses, susceptibility to infections, and response to vaccination**. Aging cell, v. 14, n. 3, p. 309-321, 2015.

GOÉS, M. A. O.; MELO, C. M.; GERALDO, V. L. S. **Série temporal da leishmaniose visceral em Aracajú, estado de Sergipe, Brasil, (1999 a 2008): aspectos humanos e caninos**. Revista Brasileira de Epidemiologia, v. 12, n. 2, p. 298-307, 2012.

GOMES, C. M.; PAULA, N. A.; MORAIS, O. O.; SOARES, K. A.; ROSELINO, A. M.; SAMPAIO, R. N. et al. **Complementary exams in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis**. Revista Brasileira de Dermatologia, v. 89, n. 5, p. 701-709, 2014.

GONTIJO, B. A. **Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) no Diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 1997. 91f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 1997.

GOSCH, C. S.; MARQUES, C. P.; RESENDE, B. S.; SOUZA, J. S.; ROCHA, R. A. S.; LOPES, D. S. S.; GOSCH, M. S.; DIAS, F. R.; DORTA, M. L. **American tegumentary leishmaniasis: epidemiological and molecular characterization of prevalent *Leishmania* species in the State of Tocantins, Brazil, 2011-2015**. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 59, p. 1-11, 2017.

- GRAZIANI, D.; OLIVEIRA, V. A. C.; SILVA, R. C. **Estudo das características epidemiológicas da leishmaniose tegumentar americana no estado de Goiás, Brasil, 2007-2009.** Revista da Universidade Federal de Goiás, v. 42, p. 417-424, 2013.
- GRIMALDI, G. J.; TESH, R. B. **Leishmaniasis of the New World: Current Concepts and Implications for future research.** Clinical Microbiology Reviews, v. 6, n. 3, p. 230-250, 1993.
- HENRICHSEN, S. **DIP - Doenças infecciosas e parasitárias.** 1ed. São Paulo: Guanabara Koogan; 2005. 164p.
- KASPER, D. L.; FAUCI, A. S.; LONGO, D. L.; JAMESON, J. L.; LOSCALZO, J. **Medicina interna de Harrison.** 19 ed. Porto Alegre: McGraw-Hill; 2017. 4065p.
- LESSA, M. M.; LESSA, H. A.; CASTRO, T.; OLIVEIRA, A.; SCHERIFER, A.; MACHADO, P.; CARVALHO, E.. **Leishmaniose mucosa: aspectos clínicos e epidemiológicos.** Revista Brasileira de Otorrinolaringologia, v. 73, n. 6, p. 843-847, 2007.
- MOTA, L. A. A.; MIRANDA, R. R. **Manifestações dermatológicas e otorrinolaringológicas na Leishmaniose.** Arquivos Internacionais de Otorrinolaringologia, v.15, n.3, p. 376-381, 2011.
- NASSER, N.; WILL, E. **Perfil epidemiológico da leishmaniose tegumentar Americana no município de Blumenau-SC.** Arquivos Catarinenses de Medicina, v. 46, n. 3, p. 28-38, 2017.
- NEGRÃO, G. N.; FERREIRA, M. E. M. C. **Considerações sobre a Leishmaniose Tegumentar Americana e sua expansão no território brasileiro.** Revista Percurso, v. 6, n. 1, p. 147-168, 2014.
- NEVES, T. S. **Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana no Brasil.** 2017. 22f. Trabalho de Conclusão de Curso: Bacharelado em Biomedicina – Centro Universitário de Brasília – Faculdade de Ciências da Educação e Saúde. Brasília, 2017.
- NUNES, C. S.; YOSHIZAWA, J. K.; OLIVEIRA, R. Z.; LIMA, A. P.; OLIVEIRA, L. Z.; LIMA, M. V. N. **Leishmaniose Mucosa: considerações epidemiológicas e de tratamento.** Revista Brasileira de Medicina de Família e Comunidade, v. 6, n. 18, p. 52-56, 2011.
- OLIVEIRA, L. F.; SCHUBACH, A. O.; MARTINS, M. M.; PASSOS, A. L.; OLIVEIRA, R. V.; MARZOCHI, M. C.; ANDRADE, C. A. **Systematic review of the adverse effects of cutaneous Leishmaniasis treatment in the New World.** Acta Tropica, v. 118, n. 2, p. 87-96, 2011.
- ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). **Informe Epidemiológico das Américas. Informe Leishmanioses.** 2018. Disponível em: [http://www.who.int/leishmaniasis/about\\_disease/en/](http://www.who.int/leishmaniasis/about_disease/en/) Acesso em: 18 de dezembro de 2018.
- PEARSON, R. D.; SOUSA, A. Q. **Clinical spectrum of Leishmaniasis.** Clinical Infectious Diseases, v. 22, n. 1, p. 1-13, 1996.
- PELLISSARI, D. M.; CECHINE, L. M. P.; SOUZA-GOMES, M. L.; LIMA JÚNIOR, F. E. F.; **Tratamento da Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil.** Epidemiologia e Serviços de Saúde, v. 20, n. 1, p. 107-110, 2011.
- PALHETA NETO, F. X.; RODRIGUES, A. C.; SILVA, L. L.; PALHETA, A. C. P.; RODRIGUES, L. G.; SILVA, F. A. **Manifestações otorrinolaringológicas relacionadas à leishmaniose tegumentar americana: revisão de literatura.** Arquivos Internacionais de Otorrinolaringologia, v. 12, n. 4, p. 531-537, 2008.
- ROCHA, T. J. M.; SANTANA, E. P. C.; BARBOSA, A. C. A.; CALHEIROS, C. M. L. **Aspectos epidemiológicos dos casos humanos confirmados de leishmaniose tegumentar americana no Estado de Alagoas, Brasil.** Revista Pan-Amazônica de Saúde, v.6, n. 4, p.49, 2015.

SAMPAIO, S. A.; CASTRO, R. M.; DILLON, N. L.; MARTINS, J. E. **Treatment of cutaneous leishmaniasis with amphotericin B: report of 70 cases.** International Journal of Dermatology, v. 10, n. 3, p. 179-181, 1971.

SANTOS, G. M. **Características epidemiológicas da leishmaniose tegumentar americana em um estado do nordeste brasileiro.** Archives of Health Investigation, v. 7, n. 3, p. 103-107, 2018.

SILVA, L. M. R.; CUNHA, P. R. **A urbanização da leishmaniose tegumentar americana no município de Campinas - São Paulo (SP) e região: magnitude do problema e desafios.** Anais Brasileiros de Dermatologia, v. 82, n. 6, p. 515-519, 2007.

SILVA, N. S.; MUNIZ, V. D. **Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana no Estado do Acre, Amazônia brasileira.** Cadernos de Saúde Pública, v. 25, n. 6, p. 1325-1336, 2009.

SILVEIRA, F. T.; MÜLLER, S. R.; SOUZA, A. A. A.; LAINSON, R.; GOMES, C. M. C.; LAURENTI, M. D.; CORBETT, C. E. P.; **Revisão sobre a patogenia da leishmaniose tegumentar americana na Amazônia, com ênfase à doença causada por *Leishmania (V.) brasiliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis*.** Revista Paraense de Medicina, v. 22, n. 1, p. 9-19, 2008

VALADÃO, C. D. S.; BARCELOS, B. I.; GOES, R. V.; ALVES, H. N. S.; PEREIRA, G. C. A. **Estudo da ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no município de Ji-Paraná, 2005-2015.** Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research, v. 16, n. 3, p.62-66, 2016.

VALE, E. C. S.; FURTADO, T. **Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia.** Anais Brasileiros de Dermatologia, v. 80, n. 4, p. 421-428, 2005.

World Health Organization (WHO). **Leishmaniasis. About Leishmaniasis** 2015. Disponível em: <[http://www.who.int/leishmaniasis/about\\_disease/en/](http://www.who.int/leishmaniasis/about_disease/en/)> Acesso em: 22 de fevereiro de 2015.

## MICROBIOLOGICAL AND HUMIDITY ASSESSMENT OF BEANS GRAINS MARKETED IN THE MARKET OF PORTO, CUIABÁ - MT

### **Gabriela Campos Caxeiro**

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso (IFMT), Campus Cuiabá – Bela Vista, Curso de Bacharelado em Engenharia de Alimentos  
Cuiabá - Mato Grosso

### **James Moraes de Moura**

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso (IFMT), Campus Cuiabá – Bela Vista, Docente do Curso de Bacharelado em Engenharia de Alimentos  
Cuiabá - Mato Grosso

### **Daniela Fernanda Lima de Carvalho Cavenaghi**

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso (IFMT), Campus Cuiabá – Bela Vista, Docente do Curso de Bacharelado em Engenharia de Alimentos  
Cuiabá - Mato Grosso

### **Alan Tocantins Fernandes**

Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Campus Cuiabá, Docente do Curso de Letras – Português/Inglês  
Cuiabá - Mato Grosso

**RESUMO:** O armazenamento do feijão em condições inadequadas pode ocasionar infestações de pragas e contaminações que causam perdas quali-quantitativas, reduzindo os valores nutritivos, comerciais e tempo de vida do produto. Por estes motivos, objetivou-

se avaliar o teor de umidade (%) e a qualidade microbiológica (determinação de *Salmonella* spp., *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Aspergillus niger* em placas prontas Compact Dry) de grãos de feijão comercializados em um estabelecimento no Mercado do Porto em Cuiabá - MT. Selecionou-se 300g amostral de três tipos de feijão (feijão-de-corda - A1, feijão rajado - A2, feijão-bolinha - A3) que foram acondicionados em sacos plásticos e encaminhados para os Laboratórios de Bromatologia e Microbiologia do IFMT Cuiabá - Bela Vista para análise. Obteve-se valores satisfatórios para a umidade, com resultados inferiores ao teor máximo recomendado pela legislação para armazenagem do feijão. As análises microbiológicas apresentaram a incidência de contaminação em duas amostras de feijão analisadas, considerando que, para *Salmonella*, todas as amostras foram consideradas impróprias para o consumo humano. Concluiu-se que há uma grande necessidade de conhecimento dos feirantes sobre a armazenagem destes grãos, eliminando riscos de contaminação para os consumidores e mantendo a qualidade por longos períodos.

**PALAVRAS-CHAVE:** feiras livres, qualidade microbiológica, *Phaseolus*.

**ABSTRACT:** Storing beans in inadequate

conditions can lead to infestations of pests and contaminations that cause qualitative and quantitative losses and reduce the nutritional, commercial and lifespan values of the product. For these reasons, the objective of this study was to evaluate the moisture content (%) and the microbiological quality (determination of *Salmonella* spp., *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* and *Aspergillus niger* on ready-made Compact Dry plates) in a commercial establishment of Porto Market in Cuiabá - MT. 300g samples of three types of bean (Cowpea - A1, Common bean - A2, Kidney bean - A3) were selected and stored in plastic bags and sent to the Bromatology and Microbiology Laboratories of the IFMT Cuiabá - Bela Vista for analysis. Satisfactory values were obtained for moisture, with results lower than the maximum recommended by the legislation for bean storage. Microbiological analyzes showed the incidence of contamination in two bean samples analyzed, considering that, for *Salmonella*, all the samples were considered unfit for human consumption. It's concluded that there is a great need of knowledge from the market sellers about the storage of these grains, which could eliminate risks of contamination for the consumers and maintain the quality of products for long periods.

**KEYWORDS:** Markets, microbiological quality, *Phaseolus*.

## 1 | INTRODUCTION

Beans are a traditional product in the food of the Brazilian population, especially for the lower income classes. It is food of extreme economic, social, nutritional and functional importance. The beans consumed in Brazil belong to the class *Dicotyledoneae*, family *Fabaceae* (*Leguminosae*), genus *Phaseolus* and species *Phaseolus vulgaris* L. (RIOS et al., 2003). Due to its climatic conditions, Brazil produces beans practically throughout the year.

This grain is rich in essential nutrients such as: protein, water soluble vitamins (most of B complex), fibers and minerals. According to Sgarbieri (1996 apud TOLEDO; CANNIATTI-BRAZACA, 2008), the grains have 20 to 35% of protein, depending on the cultural treatments and the cultivar. The protein content and the production are high. However, the nutritive value of the protein is not satisfactory because it has low levels of some essential limiting amino acids. They are the sulfur amino acids, methionine, cysteine, and cystine, in addition to tryptophan. They also present low digestibility when compared to animal proteins.

There are some parameters to evaluate the quality of the common bean, namely: grain weight, dry bark weight, water absorption, volume, raw and cooked sample density, cooking time with and without maceration, fiber content, minerals, proteins and vitamins.

In the Normative Instruction No.12 of 2008 of the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA), serious defects of the beans are considered, such as those whose presence in the sample or incidence on the grain seriously compromises the



appearance, conservation and quality of the product, making its use restrictive or unfeasible. They are burned or rotten grains, but also those attacked by caterpillars, germinated, impure and moldy. Mild defects are those whose incidence on the grain does not compromise its quality of the same – crushed, damaged, immature, broken and split (BRASIL, 2008).

Bean storage is most often carried out in conditions that are unsuitable for the preservation of its qualities, which can lead to pest infestations that can cause qualitative and quantitative losses and reduce the nutritional and commercial values of the product (RESENDE, 2006).

The long storage time can contribute to the deterioration and contamination of the grain. During the storage of beans, quality losses can be caused by physical, chemical and microbiological changes that may occur, depending on the interaction between these factors and the environment. Markets are places with specific characteristics and conditions that are favorable for the growth and proliferation of microorganisms (ANDRADE et al., 2006).

It is known that the main sources of food contamination are: raw material (including water), the environment (air, equipment, packaging and other materials), and personnel (food handling). The problems found in markets are often related to poor hygienic-sanitary conditions of the stands (moldy, broken, wet, dirty, cracked), producers (from improper clothing to food handling) and products being sold (incorrect hygiene) (XAVIER, 2009).

However, because of the way beans are exposed and stored, this work aimed to evaluate the moisture content as well as the bacterial and fungal microbiological quality (*Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Bacillus cereus*, *Candida albicans* and *Aspergillus niger*) of three types of bean grains, traded in the Porto Market in Cuiabá – MT, and compare with current legislation for moisture and microbiological content.

## 2 | MATERIAL E METHODS

### 2.1 Sample collections

Samples containing 300g of three (03) types of beans were collected at a single establishment in the Port of Cuiabá - MT market in October, 2017. The most commercialized types were considered: Cowpea - A1; Common bean - A2; Kidney bean - A3. The samples were then placed in plastic containers, identified and transported immediately to the Microbiology and Bromatology Laboratories of the IFMT – Cuiabá – Bela Vista, where the microbiological and moisture content analysis procedures were conducted.

## 2.2 Sample analysis

### 2.2.1 Moisture content (%)

Ground and whole beans were evaluated for moisture. The samples were weighed in porcelain capsules and placed in an oven at 105°C (*Nova Ética* model) for 24 hours, as described in the methodology of the Adolfo Lutz Institute. Next, the samples were cooled in a desiccator for later weighing.

### 2.2.2 Microbiological analysis

Microbiological analyzes were performed in the laboratory of Microbiology of IFMT – Campus Bela Vista; the samples were identified in A1, A2 and A3 crushed and weighed; 25g of each sample were weighted in a pre-sterilized petri dish. The plates containing the samples were transported to the laminar flow hood for continuation of the procedure.

In the laminar flow, an aliquot of each sample was transferred to an Erlenmeyer flask containing 225 mL of 0.15% sterile peptone water (KASVI Brand 500g/LOT: 101814203). The dilution considered was  $10^{-1}$ . The contents of the flask were homogenized manually for 2 minutes; then, serial dilutions were prepared in test tubes containing 9mL of peptone water. By transferring 1 mL of Erlenmeyer with  $10^{-1}$  dilution to the  $10^{-2}$  dilution, 1 mL was removed from the  $10^{-2}$  tube and added to the tube containing 9mL of peptone water to carry out the  $10^{-3}$  dilution.

Samples of the test tubes were homogenized in advance for 1 minute as they were used for inoculation in the petri dishes.

For the inoculation of samples  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  and  $10^{-3}$ , rapid tests of the Idexx Compact Dry® Petri dishes were used for *Staphylococcus aureus* (Compact Dry XSA), fecal and total coliforms (Compact Dry EC), *Bacillus cereus* (Compact Dry XBC), *Salmonella* (Compact Dry SL), and molds and yeasts (Compact Dry YM). The Compact Dry plates are ready-to-use acrylic plates containing selective culture medium and dehydrated differential, in which the colonies of microorganisms acquire differentiated staining, specific for each group of microorganisms researched.

For the colimetry tests, 1 mL of the dilutions ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  and  $10^{-3}$ ) were inoculated onto duplicate Compact Dry EC plates, and next, they were incubated at  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  for 24 hours in position inverted in the regulated greenhouse. For *Staphylococcus aureus* analysis, 1 mL of the dilution ( $10^{-2}$ ) was inoculated into the duplicate Compact Dry XSA plates, then incubated at  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  for 24 hours in inverted position; for *Bacillus cereus* 1 mL of the selected dilutions ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ) on duplicate Compact Dry plates were then incubated at  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  for 24 hrs. For yeast and mold analysis, 1 mL of the dilutions ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  and  $10^{-3}$ ) were inoculated into the ready-made Compact Dry YM plates and then incubated at  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  for 5 days in regulated oven.

As for the analysis of *Salmonella sp.*, dilution  $10^{-1}$  (sample solution in Erlenmeyer flask) was used for the procedure; dilution was pre-enriched and the dilution was

incubated in a growth oven at 41°C for 24 hours.

After this period, 0,1 mL of the pre-enriched culture was transferred to a region 1 cm from the border of the petri dish Compact Dry SL, and in the opposite region of the same plate, 1 mL of sterile distilled water was applied.

After this process, the plates were transferred to the bacteriological oven for 24 hours in inverted position at a temperature of 42°C ± 2°C. The center of the plates contains chromogenic substrate and novobiocin, which in contact with the sample after 24 hours under regulated temperature may – through color changes – identify the presence or absence of *Salmonella* spp. in the samples.

### 3 | RESULTS AND DISCUSSION

The moisture content is an important information of food composition and is among the parameters routinely used. It can be used as an indicator of product quality, since it has a direct influence on storage (VALENTINI et al., 1998; AMOEDO; MURADIAN, 2002). When stored under certain environmental conditions of humidity and temperature, grains may favor the propagation of fungi and the production of mycotoxins, which are detrimental to health (D'MELLO; MACDONALD, 1997; ATALLA et al., 2003; MILLER, 2005). In addition, the water content directly interferes with the economic value of the products, since the grains are usually marketed by weight.

Samples	Mean (%)	Standard Deviation
A1	10.38	0016.0±
A2	10.90	0011.0±
A3	10.49	0029.0±
Legislation (VMP)*	Max.14	-

Table 1. Results obtained in the analysis of moisture content (%) of bean samples traded at Porto Market – Cuiabá – MT

\*VMP: Maximum value allowed by legislation (BRASIL, 2008).

Satisfactory values were obtained, as show in Table 1. All the analyzed samples presented results lower than the recommended maximum content – the legislation recommends a maximum moisture content for storage of beans of 14% (BRASIL, 2008).

On the other hand, the exposure of these grains to unsatisfactory environmental conditions – e.g. their storage in the markets – will create opportunities for physical, chemical and biological factors to contribute to the loss of quality and deterioration (BRASIL, 2007). For this reason, food quality control cannot be done exclusively from the point of view of health hazard, but must also include the maintenance of good presentation, nutritional value and other characteristics of a healthy food (RIEDEL,

1992).

Considering that the grains are exposed mostly to the air for long periods of time, it will eventually take its toll, and grains will often be damaged. Other factors will include inadequate storage, exposure to touch, and even saliva, of the market seller/consumers and the presence of insects; it is essential to monitor and control the markets. This type of trade can be an important source of contamination, since infrastructure conditions are precarious and facilitate frequent occurrences of food outbreaks.

The presence of coliforms in food is used as an indicator of sanitary quality but also contamination during the manufacturing process or even post-processing. The results of the microbiological analyzes are shown in Table 2.

According to the Collegiate Board Resolution (RDC) N°. 12, the National Health Surveillance Agency (ANVISA) of the Ministry of Health (BRAZIL, 2001) establishes the microbiological sanitary standards for food intended for human consumption. With regard to the food analyzed in the present study and the microbiological standards of the resolution, established for fresh (*in natura*) roots, tubers and the like for maximum direct consumption of  $10^3/g$  for fecal coliform, it was identified *E. coli* contamination in sample A3, with  $1.50 \times 10^4$  UFC/g. When present in food, this microorganism can provide information on the occurrence of fecal contamination, the likely presence of pathogens or the potential deterioration of the food. It may also indicate inadequate sanitary conditions during processing, production or storage. (FRANCO, 1996).

Microorganisms studied	A1 (UFC/g)*	A2 (UFC/g)	A3 (UFC/g)
<i>Escherichia coli</i>	0	0	$1.50 \times 10^4$
<i>Klebsiella oxytoca</i>	$1.14 \times 10^4$	0	$1.12 \times 10^5$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	$2.80 \times 10^3$	$2.50 \times 10^3$
<i>Bacillus cereus</i>	$3.50 \times 10^2$	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	$1.00 \times 10^2$	$5.00 \times 10^1$	$3.50 \times 10^2$
<i>Candida albicans</i>	$4.30 \times 10^2$	0	0
<i>Aspergillus niger</i>	$1.25 \times 10^3$	$2.80 \times 10^2$	$5.10 \times 10^2$
<i>Salmonella</i> spp.	(-)	(+)	(+)

Table 2. Results obtained in the microbiological analysis of the bean samples commercialized at the Porto Market – Cuiabá – MT.

\* Colony forming units (CFU) per sample gram

The results obtained by the *Klebsiella oxytoca* analysis showed the incidence of contamination in two of the three analyzed samples (A1 and A3), with  $1.14 \times 10^4$  for A1 and  $1.12 \times 10^5$  for A3. This is a microorganism that acts normally in the enteric tract, in clinical isolations, in water, soil, gastrointestinal tract, vegetables, fruits and cereals (ALMEIDA, 2005).

It was possible to identify the presence of the microorganism *Pseudomonas*

*aeruginosa* in samples A2 and A3, according to Table 2. It is an opportunistic pathogen that can take advantage of people with low immunity, mainly children and elderly. This microorganism stimulates great interest in studies by the scientific community due to its extreme metabolic versatility, adaptive power and resistance to various environments and antibiotics (ALMEIDA, 2010).

*Bacillus cereus* is widely found in nature and the soil is its natural reservoir. For this reason, it easily contaminates vegetables, cereals and tubers (FRANCO, 1996). The amount of *Bacillus cereus* found in the sample is higher than that of the Resolution RDC N°. 12 of ANVISA (BRASIL, 2001), which is  $10^3$  CFU/g. Food contamination by *Bacillus cereus* is not only an important cause of deterioration but is also associated with the occurrence of two types of syndrome. This occurs due to the ingestion of food contaminated with pathogenic toxin-producing strains – one is emetic and the other is diarrheal (MINNAARD, 2001). Such contamination in establishments where food is processed may contribute to the potential risk of contamination and spread of the micro-organism and its toxins through food. Current harvesting and storage techniques are excellent barriers to the proliferation of microbial contamination, which is present during production (COLAK et al., 2012).

Results regarding *Staphylococcus aureus* contamination were identified in the three bean samples analyzed (Table 2). However, the values were within the limits allowed by ANVISA, which established as microbiological standard for fresh (*in natura*) roots, tubers and the like, the maximum of  $10^3$  CFU/g for coagulase positive *Staphylococcus aureus*. (BRAZIL, 2001). Observing the results of the analysis, among the three bean samples, sample A3, with  $3.50 \times 10^2$  CFU/g, was the sample with the highest incidence of *Staphylococcus aureus* colonies. Therefore, products are considered suitable for consumption. But due to the presence of *Staphylococcus aureus*, the samples are contaminated, indicating inadequate sanitary conditions of handling, processing and storage.

The multiplication of this microorganism might have been due to inadequate storage and temperature and could cause human diseases due to a highly thermostable protein toxin produced by this bacterium (SANCHEZ, 2015). Due to the nutritional variety and the possibility of developing in different environmental conditions, *Staphylococcus aureus* grows easily in several foods, and is one of the main vehicles that cause food toxoinfection.

There are no parameters within legislation for *Candida albicans* microorganism in foods. However, the fungal microorganism of *Candida albicans* is one of the main responsible for food contamination, and consequently, infections. It lives in the mucosa and, in favorable conditions, can cause illnesses. Results show that the presence of this microorganism in one of the bean samples (A1) and, within the food sanitary inspection, anyone who is in direct or indirect contact with food – thus, causing contamination of this product – is considered to be a manipulator (NOTERMANS; VERDEGAAL, 1992).

Table 2 shows the incidence of *Aspergillus niger* in all bean samples (A1, A2 and

A3). This fact can be associated to the presence of cracks in the product, which facilitated the penetration of the fungus into the grain. The Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO, 2006) reports that damaged grain is more prone to fungal invasion and, consequently, to contamination of mycotoxins. This situation is also probably due to the inadequate conditions of storage and stocking observed in the establishments. APHA (2001) cites the genera *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. and *Fusarium* spp. as the most commonly associated with naturally occurring mycotoxins in cereals, grains, and seeds at levels that make food unfit for human consumption, as well as causing great economic losses.

One of the main causes of foodborne infections is *Salmonella* spp. – a microorganism of great importance for food safety. Salmonellosis is a zoonosis caused by the ingestion of water, foods or fomites contaminated by animal feces or infected people. It is bacteria that act as agents causing serious infections. (BARANCELLI et al., 2012).

RDC N°. 12 predicates the absence of the microorganism in 25g of food as being expressed as presence or absence (BRASIL, 2001). Taking into account the Federal microbiological standard, only one sample (A1) analyzed was considered appropriate for human consumption, without the presence of the pathogenic *Salmonella* spp.

Regarding the microorganism, Elias (2003) observed that fungi are among the main causes of the deterioration of stored grains. They need a minimum and a great amount of relative humidity and temperature to develop.

#### 4 | CONCLUSIONS

Considering positive results for the moisture content of the three bean samples analyzed, the microbiological analyzes showed intense contamination. The action of these microorganisms affects seed germination, organoleptic qualities, nutritional value and industrial use of grains. Some of their by-products can also produce extremely toxic (mycotoxins) health hazardous substances.

The levels of contamination can be controlled and the microbiota can be kept in a number acceptable by current legislation by the means of appropriate handling, knowledge and the use of factors that influence the growth of microorganisms in food, among other actions. However, there is a clear need for market keepers to be aware of grain storage (mainly) and food inspection in order to improve quality, to keep the product in proper standards for the consumer, and to maintain the quality for long periods of time, because there is no point in having a strict control of the crops to avoid losses if this control has no follow-up in storage.

## REFERENCES

- ALMEIDA, M. C. L. **Sepse de origem hospitalar por *Klebsiella spp.* Em unidades neonatais: evolução clínica.** Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-graduação em Ciências, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2005. 61p.
- ALMEIDA, R. G. ***Pseudomonas aeruginosa* como indicador de qualidade de água.** Monografia (Graduação) – Departamento de Ciências Biológicas, Centro Universitário Metodista Izabela Hendrix, Belo Horizonte. 2010. 14p.
- ANDRADE, E. T.; CORREA, P. C.; TEIXEIRA, L. P.; PEREIRA, R. G.; CALOMENI, J. F. **Cinética de secagem e qualidade de sementes de feijão.** *Engevista*, v.8, n. 2, 2006, p.83-95.
- AMOEDO, L.H.G.; MURADIAN, L.B.A. **Comparação de metodologias para a determinação de umidade em geléia real.** *Química Nova*, v.25, 2002, p.676-679.
- APHA - American Public Health Association. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods.** 4ed. Washington, 676p. 2001.
- ATALLA, M.M.; HASSANEIN, N.M.; EL-BEIH, A.A.; YOUSSEF, Y.A. **Mycotoxin production in wheat grains by different *Aspergilli* in relation to different relative humidities and storage periods.** *Nahrung/Food*. v.47, 2003. p.6-10.
- BARACELLI, G. C.; MARTIN, J. G. P.; PORTO, E. **Salmonella em ovos: relação entre produção e consumo seguro.** *Rev. Segurança Alimentar e Nutricional*, Campinas, vol.19, n.2, 2012. p.73-82.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Cadeia Produtiva de Produtos Orgânicos. Secretaria de Política Agrícola – SPA;** Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura – IICA, V.5. 108p. 2007.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 12 de 28 de março de 2008.** Estabelece o Regulamento Técnico do Feijão, definindo o seu padrão oficial de classificação, com os requisitos de identidade e qualidade, a amostragem, o modo de apresentação e a marcação ou rotulagem. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 28 mar. 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001.** Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 02 jan. 2001.
- D’MELLO, J.P.F.; MACDONALD, A.M.C. **Mycotoxins.** *Animal Feed Science Technology*, v.69, 1997, p.155-166.
- ELIAS, M. C. **Armazenamento e Conservação dos Grãos.** Pólo de Inovação Tecnológica em Alimentos da Região Sul Conselho Regional de Desenvolvimento da Região Sul. Pelotas, 2003. 83p.
- FAO - Food and Agriculture Organization. **Rice around the world.** 2006. Disponível em: <<http://www.fao.org/rice2004/>>. Acesso em: 20 jan. 2017.
- FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos.** São Paulo: Atheneu. 1996,182p.
- IAL - Instituto Adolfo Lutz. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos.** 4ed., v.1, São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008, p.122-124.
- MINNAARD, J.; HUMEN, M.; PÉREZ, P. F. **Effect of *Bacillus cereus* Exocellular Factors on Human Intestinal Epithelial Cells.** *Journal Food Protec*, v. 64, n. 10, 2001, p. 1535-1541.

NOTERMANS, S.; VERDEGAAL, A. H. **Existing and emerging foodborne diseases.** *International Journal of Food Microbiology*. Amsterdam, v. 15, 1992, p. 197-205.

RESENDE, O. **Varição das propriedades físicas e mecânicas e da qualidade do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) durante a secagem e o armazenamento.** Tese (Doutorado) – Departamento de Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006, 180f.

RIEDEL, G. **Controle Sanitário dos Alimentos.** São Paulo: Atheneu, 1992,

RIOS, A. O.; ABREU, C. M. P.; CORRÊA, A. D. **Efeito da estocagem e das condições de colheita sobre algumas propriedades físicas, químicas e nutricionais de três cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.).** *Rev.Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v. 23 (Supl), 2003. p. 39-45.

SANCHEZ, P. S. **Atualização em Análises Microbiológicas em Águas Minerais.** São Paulo, Apostila. 2015, 62p.

TOLEDO, T. C. F.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. **Avaliação química e nutricional do feijão carioca (*Phaseolus vulgaris* L.) cozido por diferentes métodos.** *Rev. Ciênc. Tecnol. Aliment.* Campinas, 28(2), 2008, p.355-360.

VALENTINI, S.R.; MORETZHON DE CASTRO, M.F.P.; ALMEIDA, F.H. **Determinação do teor de umidade de milho utilizando aparelho de microondas.** *Rev. Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v.18, n.2, 1998, p.237-240.

XAVIER, A. Z. P.; VIEIRA, G. D. G.; RODRIGUES, L. O. M.; VALVERDE, L. O.; PEREIRA, V. S. **Condições higiênico-sanitárias das feiras-livres do município de Governador Valadares.** Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade Vale do Rio Doce - MG. 2009, 94f.



## OPTIMIZATION OF HYDROALCOHOLIC EXTRACTION OF CRUDE GUARANA SEEDS: PHENOLIC CONSTITUENTS, METHYLXANTHINES AND ANTIOXIDANT CAPACITY

### Ádina Lima de Santana

Bioprocesses Laboratory. School of Food Engineering. University of Campinas (Unicamp). Campinas, São Paulo, Brazil.

### Gabriela Alves Macedo

Bioprocesses Laboratory. School of Food Engineering. University of Campinas (Unicamp). Campinas, São Paulo, Brazil.

Corresponding authors: adina.santana@gmail.com and macedoga@gmail.com

**ABSTRACT:** The obtaining of substances responsible to enhance health with the use of plant extracts is proven to be healthier than those formulated with the synthesized ones. Selective conditions on the obtaining of natural extracts with enhanced profile of phenolic constituents, methylxanthines and antioxidant capacity was investigated in this work using cold (CHE) and hot hydroalcoholic extraction (HHE) of crude guarana seeds. The solid waste seeds, obtained from each extraction condition were evaluated in terms of total phenolic content and antioxidant capacity. Results indicate that highest recovery of bioactive constituents in CHE was attributed to the hydroalcoholic solution composed of 50% ethanol and to the seeds with 1.6 8mm. Thin-layer chromatography detected positive presence of phenolic constituents and caffeine, which were confirmed quantitatively with HPLC.

Establishing comparison between CHM and HHE, the highest profile of bioactive constituents in the was obtained in HHE at 60°C. The use of temperatures higher than 60°C resulted in thermal degradation of phenolic constituents and methylxanthines.

**KEYWORDS:** *Paullinia cupana*; phenolic compounds; hydroalcoholic extraction; thin-layer chromatography; antioxidant capacity

### 1 | INTRODUCTION

Medicinal plants, herbal drugs, and individual natural products comprise a market worth billions of dollars, in both developed and developing countries (BRAZ et al., 2012). Latin American plants are usually rich in phenolic constituents, which are important molecules in human health (LAJOLO, 2007).

Guarana (*Paullinia cupana*), or Brazilian cocoa, is known for its stimulatory properties, improvement in cognitive function and energy-expenditure increasing, which are attributed to the pharmacological action of methylxanthines, particularly caffeine (DA SILVA et al., 2017). Besides the caffeine guarana seeds contain other methylxanthines, such as theobromine and theophylline, but in smaller proportion (SANTANA e MACEDO, 2018b). In addition to methylxanthines, guarana contain catechins,

which are phenolic constituents associated with antioxidant capacity of this plant (YONEKURA et al., 2016).

The decreasing of hot flashes in breast cancer survivors (OLIVEIRA et al., 2013), and in LDL oxidation in elderly people (PORTELLA et al., 2013), besides weight stabilization (PALMA et al., 2016) were health aspects associated with catechins present in guarana.

The obtaining of extracts from guarana is traditionally performed with the use of a hydroalcoholic solution, during 24 h, followed by subsequent separation of extract from waste seeds (NAZARÉ, 1997).

Studies usually perform extraction of guarana seeds using solvents like acetone, methanol, ethyl acetate and dimethylsulfoxide (MAJHENIČ et al., 2007, MARQUES et al., 2016, ANTONELLI-USHIROBIRA et al., 2010, DALONSO e PETKOWICZ, 2012). However, these solvents may cause toxicity and the risk of low purity extracts because of the presence of residual fractions of the solvent. Residual fractions of undesirable solvents require further solvent removal processes, which may increase production costs.

Besides, recent demands for the reduction and reutilization of waste have motivated scientific research on the development of clean technologies and optimization of process parameters to achieve sustainable production (SANTANA et al., 2019).

To the best of our knowledge, detailed studies on the effect of process parameters to enhance the extraction of caffeine and catechins in guarana extracts are scarce. In this context, we investigate selective process conditions of 24h-cold and 6h-hot hydroalcoholic extractions of crude guarana for the obtaining of extracts with enhanced content of bioactive constituents. The composition of waste fraction of extractions was also evaluated in this work.

## **2 | MATERIAL AND METHODS**

### **2.1 Raw material**

Roasted guarana seeds were purchased from Guarana de Maués Corporation (Maués, Brazil).

The raw material was milled in a commercial blender (BL.2.201/202, Marchesoni, São Paulo, Brazil) and sieved (W.S. Tyler, Wheeling, EUA), resulting on fractions consisted of three particle diameters (1.68 mm, 125  $\mu$ m and 25  $\mu$ m). In the first part of this work, we investigated the performance of cold hydroalcoholic extraction for 24 h using five hydroalcoholic solvent formulations and three particle diameters of crude guarana seeds (CG). Afterwards, hot hydroalcoholic extraction (HHE) assays were carried out for 6 h using the optimized solvent formulation and particle diameter from CHE (Figure 1).

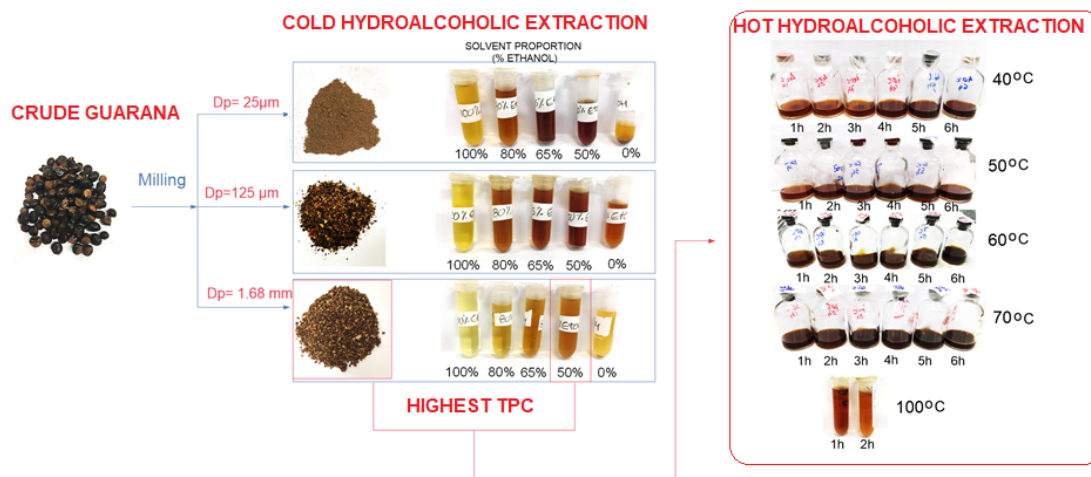


Figure 1. Selective conditions of cold hydroalcoholic extraction parameters, and subsequent hot hydroalcoholic solvent extraction.

### 2.1.1 Reagents

Milli-Q water (EMD Millipore Corporation, Merck, Darmstadt, Germany), gallic acid, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH),  $\beta$ -carotene, vanillin, linoleic acid and trolox were purchased from Sigma–Aldrich (Darmstadt, Germany). The standards (+)(-) catechin (99% pure), (-)-epicatechin ( $\geq 97\%$ ), (-)-epicatechin gallate ( $\geq 98\%$ ), caffeine and theobromine ( $\geq 98\%$ ) were purchased from Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany). Theophylline (anhydrous, 97.50% pure) was purchased from Abbott (São Paulo, Brazil). Methanol (99.9%, HPLC grade) was obtained from JT Baker (Bridgewater, USA). Folin–Ciocalteu reagent and ethanol (99.5%), were purchased from Dinâmica (São Paulo, Brazil). Ethyl acetate, sulphuric acid and glacial acetic acid were purchased from Synth (Sao Paulo, Brazil).

## 2.2 Cold hydroalcoholic extraction

Extracts from guarana seeds were obtained from the respective particle diameters 1.68 mm, 125  $\mu\text{m}$  and 25  $\mu\text{m}$ . Hydroalcoholic solutions were obtained using five solvent formulations inserted in polyethylene tubes, according to the ratio ethanol:water (weight/weight), i.e., 100:0, 80:20, 65:35, 50:50 and 0:100. Extractions at laboratory scale were carried out using a seeds:solvent proportion of 1:3 (weight/weight), established by previous assays, with subsequent vortex agitation (Model 251, Fanem, São Paulo, Brazil) of tubes for 1 minute. Afterwards, the samples were stored immobilized at 25 °C for 24 h, in the dark.

In the next day the samples were centrifuged (Heraeus, Megafuge 16 R, Thermo Scientific, Massachusetts, USA) at 2500 rpm and 25 °C for 10 min. The supernatant (extract) was separated from the solid fraction. The particle diameter and solvent formulation that resulted in the optimal extract, in terms of total phenolic content (TPC), and catechins, were selected for further hot hydroalcoholic extraction using 5

temperature levels (40, 50, 60, 70 and 100°C).

### 2.3 Hot hydroalcoholic extraction

Approximately 3 g of milled seeds were inserted into glass Erlenmeyer flasks using a seeds:solvent proportion of 1:3 (weight/weight). Extractions were performed in a stackable shaker (MaxQ 8000, Thermo Scientific, Massachusetts, USA) at 48 rpm for 6 h. Extractions at 70°C and 100°C were performed in a Dubnoff heating bath (Tecnal, TE-053, São Paulo, Brazil). Aliquots were taken during 1h interval for further analysis.

### 2.4 Yield

For the obtaining of yield of dried extract, the extracts were dried using a rotary evaporator (Marconi, Sao Paulo, Brazil), as showed in Figure 2. The calculation procedure was performed according to Eq.1:

$$X_0 = \frac{m_{EXT}}{F_0} \quad (1)$$

Where  $X_0$  is the yield in extracts(%),  $m_{EXT}$  is the mass of dried extract obtained (g) and  $F_0$  is the mass of raw material (g).



Figure 2. Drying of guarana extracts, obtained with HHE.

### 2.5 Characterization of guarana products

#### 2.5.1 Sample preparing

Approximately 0.18 g of extract was diluted in 1 mL of deionized water for the analysis of total phenolic content (TPC) and antioxidant capacity with the  $\beta$ -carotene approach. Approximately 0.05 g of extract was diluted in 0.5 mL of an 70% methanolic solution for the analysis of antioxidant capacity with the DPPH approach.

From the solid waste seeds, approximately 0.2 g was extracted with 1 mL of ethanol. The dilutions of this products for the TPC and antioxidant capacity assays were similar to the extracts obtained directly from CHE and HHE

#### 2.5.2 Determination of total phenolic content (TPC assay)

Total phenolic content of the extracts were measured using the Folin–Ciocalteu reagent (SINGLETON e ROSSI, 1965). A calibration curve using gallic acid was plotted in a concentration range of 16 – 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The results quantified at each extraction

time were expressed as  $\mu\text{g}$  of gallic acid equivalent (GAE)/ mL of extract.

### 2.5.3 Antioxidant capacity: DPPH radical-scavenging capacity (DPPH assay)

Free radical scavenging capacity of the extracts was evaluated using the stable DPPH radical and NovoStarMicroplate reader (BMG LABTECH, Germany) at 520 nm, according to the method established (PESCHEL et al., 2006) with adaptations (MACEDO et al., 2011). Results were calculated using the linear regression equation from the plotting concentration solutions of Trolox (15 - 300  $\mu\text{mol/mL}$ ). The results quantified at each extraction time were expressed as  $\mu\text{mol}$  of Trolox equivalent/mL extract.

### 2.5.4 Antioxidant capacity: $\beta$ -carotene-linoleic acid assay

The capacity of extracts on the inhibition of heat-oxidation of an aqueous system of  $\beta$ -carotene and linoleic acid was evaluated using the method of MARCO (1968), adapted by MILLER (1971) and LEAL et al. (2006). Antioxidant capacity, measured as % of inhibition of oxidation, was calculated using Eq. (2), as proposed elsewhere (ŠKERGET et al., 2005).

$$A (\%) = 100 \left[ \frac{ABS_{SAMPLE}^{t=0} - ABS_{SAMPLE}^{t=120}}{ABS_{CONTROL}^{t=0} - ABS_{CONTROL}^{t=120}} \right] \quad (2)$$

Where AA is antioxidant capacity,  $ABS_{SAMPLE}^{t=0}$  is the absorbance of the sample at  $t=0\text{h}$ ,  $ABS_{CONTROL}^{t=0}$  is the absorbance of control sample at  $t=0\text{min}$ ,  $ABS_{SAMPLE}^t$  is the absorbance of the sample at  $t=120\text{ min}$  and  $ABS_{CONTROL}^t$  is the absorbance of control sample at  $t=120\text{ min}$ .

### 2.5.5 Thin Layer Chromatography (TLC)

Ultraviolet light-sensible Silica gel plates with aluminum backs were used as the stationary phase. (UV<sub>254</sub>, Alugram®, Xtra SIL G, Macherey-Nagel, Germany). on dimension 10 cm  $\times$  10 cm were used as stationary phase. The TLC plates were prepared by establishing 1 cm distance from the origin, 8 cm distance for the solvent to travel, and 1cm from the solvent front.

The liquid product of extractions and an ethanolic solution from the solid waste fraction of these procedures were spotted in TLC plates with the aid of capillary glass tubes with approximately 1 cm distance from each band. Afterwards, the plates were developed into glass chambers by elution in mobile phase constituted by ethyl acetate, glacial acetic acid, methanol and water (60:15:15:10, v/v/v/v).

The bands of compounds generated by constituents that could not be detected in the visible region were visualized with the aid of the equipment an UV (Multiband UV – 254-366 nm, UVGL-58, Mineralight® Lamp, Upland, CA, EUA) equipped with cabinet (UVP-Chromato-VUE, CC-10, Upland, CA, EUA) with short wavelength, 254 nm, and long wavelength, 366 nm.

In order to detect bioactive constituents, a sulfuric vanillin (SV) spray reagent was applied using the formulation suggested elsewhere (KRISHNASWAMY, 2003), in which 0.5 g of vanillin was diluted in 20 mL of ethanol and 80 mL of sulfuric acid, in this sequence. Before spraying with SV reagents, the plates were inserted into UV chamber to visualize the bands of compounds that could not been seen at the visible zone. The retardation factor ( $R_f$ ), which is the standard measurement of substance retention, was calculated using the software ImageJ, according to the procedures described elsewhere (JOHNER e MEIRELES, 2016).

### *2.5.6 High Performance Liquid Chromatography*

The methylxanthines (caffeine, theobromine and theophylline) and catechins (catechin, epicatechin and epicatechin gallate) in selected guarana extracts obtained in the last hour of CHE and HHE were determined by high-performance liquid chromatography coupled with diode array detector (HPLC-DAD) according to procedures determined previously (SANTANA e MACEDO, 2018a).

A Dionex UltiMate 3000 (Germany) liquid chromatographer equipped with a C-18 Acclaim® column (Dionex, 3  $\mu\text{m}$ , 120  $\text{\AA}$ , 4.6  $\times$  150 mm) maintained at 30°C was used, and the detection was performed using a UV/VIS diode array detector.

Approximately 0.09g of extracts (100  $\mu\text{L}$ ) were solubilized in 900  $\mu\text{L}$  of a 50% methanolic solution (HPLC grade) and filtered using a 0.45  $\mu\text{m}$  polyvinylidene difluoride membrane (HV PVDF, Millipore, Massachusetts, USA) before injection. The mobile phase solutions were formulated as follows: 100% water (A), 100% methanol (B), water/formic acid at 99.9:0.1, v/v (C) and methanol/formic acid at 99.9:0.1, v/v (D) .

## **3 | RESULTS AND DISCUSSION**

The yield in dried extracts obtained in both CHE and HHE is showed in Figure 3. In CHE, high yield in extracts was attributed to the seeds with particle diameter ( $D_p$ ) of 25  $\mu\text{m}$  (Figure 3A). The CHE in seeds with  $D_p=1.68$  mm using a 50% hydroalcoholic solution contributed to the obtaining of liquid extracts with the highest TPC (Figure 4B), catechins and methylxanthines (Table 2).

The yield extracts, or the global yield of an extraction, may indicate the magnitude of obtaining the compounds of interest or the possibility of obtaining other substances previously solubilized in the solvent. Besides the type of solvent, the temperature is a factor that contributes strongly to the modification of the yield of an extraction (Figure 3B).

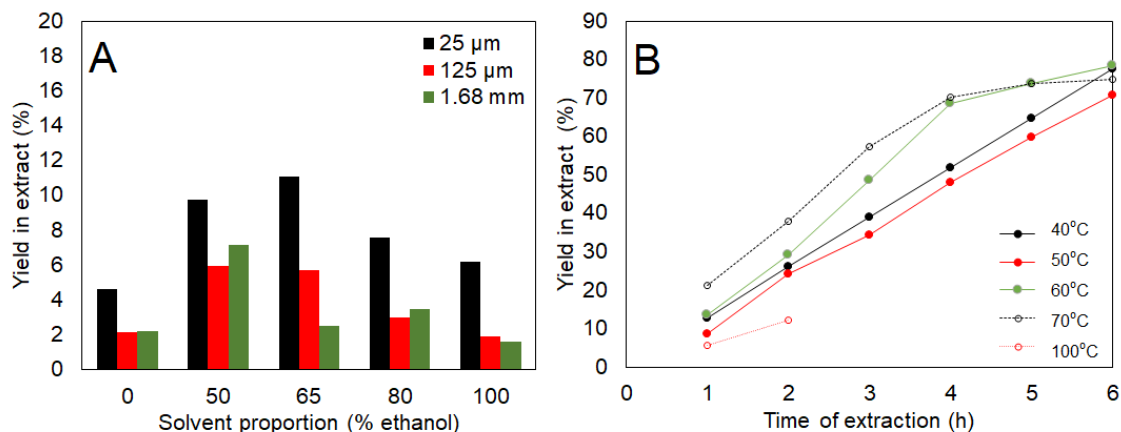


Figure 3. Yield in extracts obtained in CHE (A) and HHE (B).

The highest TPC quantified from solid waste fraction was attributed to the conditions of  $D_p=125\ \mu\text{m}$ , and a 50% hydroalcoholic solution (Figure 4A). Calculated  $R_F$  values of guarana products eluted in TLC plates are available in Table 1. The highest TPC values in HHE were attributed in the first hour of extraction for all temperatures evaluated (Figure 5A). At  $100^\circ\text{C}$  was not possible to perform extractions above 2h because of fast evaporation of solution with subsequent burning of the seeds in the equipment used.

The antioxidant capacity of CHE extracts considering  $\beta$ -carotene assay show that highest inhibition of  $\beta$ -carotene oxidation were attributed to the liquid fraction from seeds with  $D_p=25\ \mu\text{m}$  (Figure 4C), while in HHE the inhibition of liquid fraction decreased at  $70^\circ\text{C}$  and  $100^\circ\text{C}$  (Figure 5C). The values obtained using the method were comparable to the volatile oils and curcuminoids extracts from turmeric (SANTANA e MEIRELES, 2017) and higher than those report to guarana methanolic extracts (MAJHENIĆ et al., 2007). The DPPH radical scavenging values were comparable with the extracts obtained from citrus (NAKAJIMA et al., 2016), grape (MARTINS et al., 2016) and tea (MACEDO et al., 2011), and were higher than that obtained with guarana aqueous extracts (YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007).

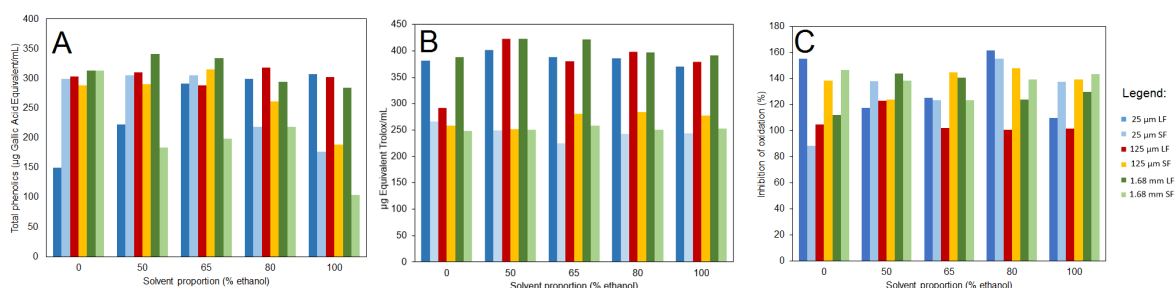


Figure 4. TPC (A), and antioxidant capacities of DPPH (B) and  $\beta$ -carotene (C) assays for hydroalcoholic extraction of guarana. Acronyms: LF: liquid fraction and SF: solid fraction.

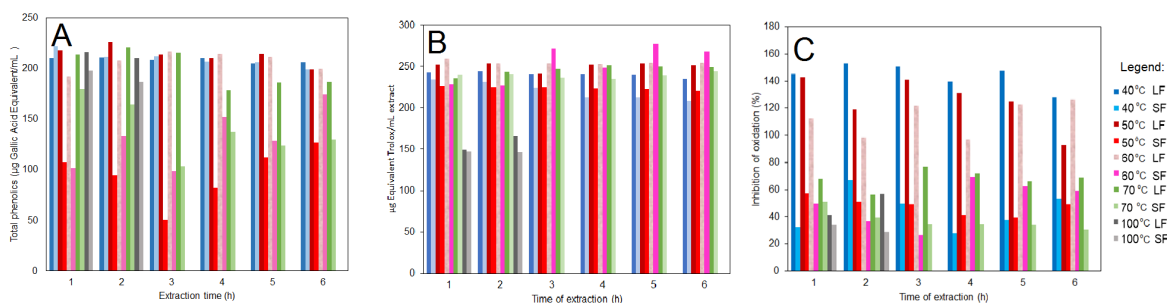


Figure 5. TPC (A), and antioxidant capacities of DPPH (B) and  $\beta$ -carotene (C) assays for hot hydroalcoholic extraction of guarana. Acronyms: LF: liquid fraction and SF: solid fraction.

Methods and tools used for measuring antioxidants activity or capacity have advanced remarkably during the last few decades (SHAHIDI e ZHONG, 2015). However, there is not one method that can provide unequivocal results and the best solution is to use various methods instead of a one-dimension approach (Carocho & Ferreira, 2013).

Fingerprints of guarana extracts and solid waste are characterized by a thin band surrounded by a circular spots visualized clearly at 254 nm (Figures 6-8). The circular spots indicate probable presence of caffeine, as indicated previously in the TLC plates with caffeine standard (EL SEOUD et al., 2018).

Aspects of fingerprints from CHE and HHE products were comparable to those from the extracts of aroeira and green tea (BRAZ et al., 2012) and guarana powder (EL SEOUD et al., 2018).

The spotted TLC plates prior to spraying with sulfuric vanillin reagent could be visualized only in UV. The best resolution was obtained in 254 nm (Figures 6-8) with  $R_F$  values between 0.75-0.96 for the liquid fraction and 0.84-0.96 for the solid waste fraction (Table 1) indicating the strong presence of the following phenolics catechin ( $R_F=0.81$ ) and epicatechin ( $R_F=0.88$ ) and weak presence of epicatechin gallate, with  $R_F=0.66$  (BRAZ et al., 2012).

The fingerprints obtained at 366 nm showed weak visualization of developed substances (Figure 6). In this context, the TLC plates with the HHE extracts were investigated only at 254 nm and after detection with spray reagent (Figures 7 and 8). The spraying with sulfuric-vanillin resulted in appearance of dark-red spots in the thin bands of the extracts.

Sulfuric acid is an oxidant, and its reaction with phenolics with the presence of vanillin results in the formation of pink or dark red coloration bands against a purple background (SANTANA e MEIRELES, 2016, SANTANA et al., 2017). The reaction with sulphuric vanillin in TLC plates indicated also the absence of volatile constituents in guarana extracts, such as terpenes, which would result in appearance of purple coloration (JOHNER et al., 2017).



<b>Cold hydroalcoholic extraction</b>					
	Dp= 25µm	Dp= 125µm	Dp= 1.68 mm		
Liquid fraction	0.77-0.86	0.73-0.84	0.78-0.87		
Solid fraction	0.95	0.87	0.84		
<b>Hot hydroalcoholic extraction</b>					
	40 °C	50 °C	60 °C	70 °C	100 °C
Liquid fraction	0.75-0.96	0.8-0.96	0.79-0.96	0.77-0.88	0.77
Solid fraction	0.84-0.96	0.84	0.87	0.85	0.82

Table 1. R<sub>F</sub> values of guarana products obtained with CHE and HHE.

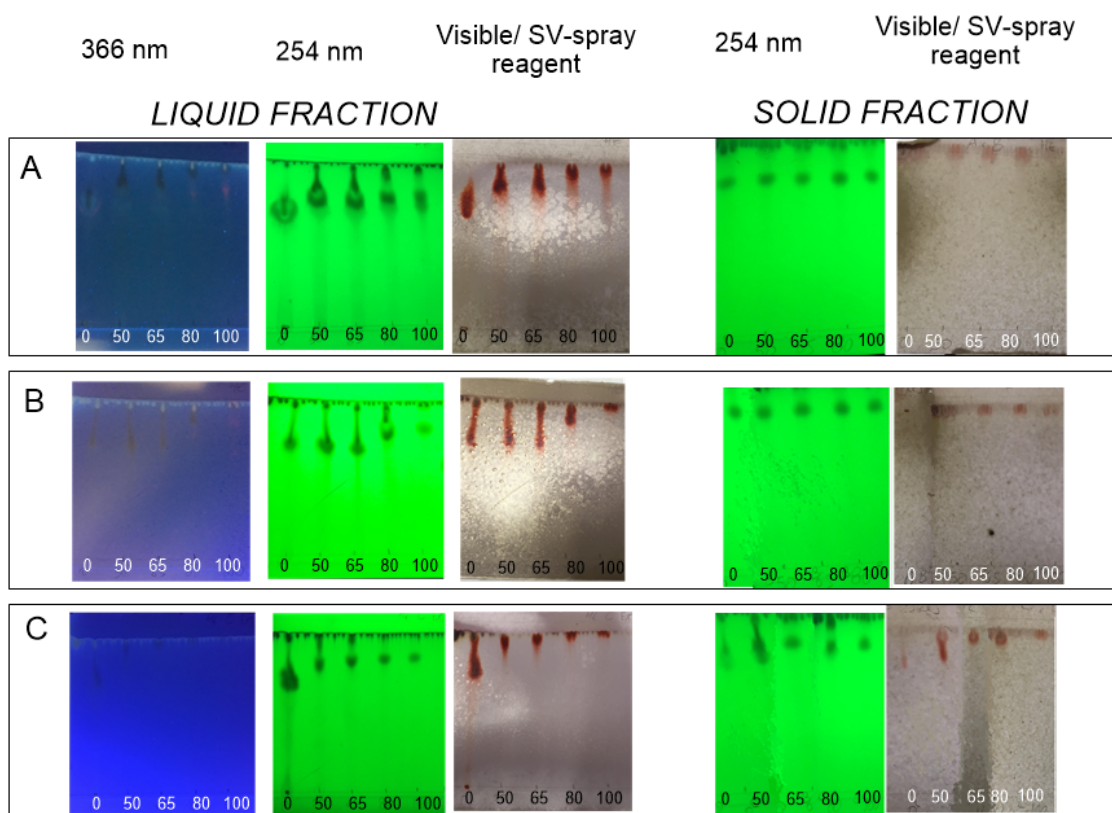


Figure 6. Thin-layer chromatography profile of guarana extracts obtained with cold hydroalcoholic extraction process using the particle diameters of 25 µm (A), 125 µm (B), and 1.68 mm (C).

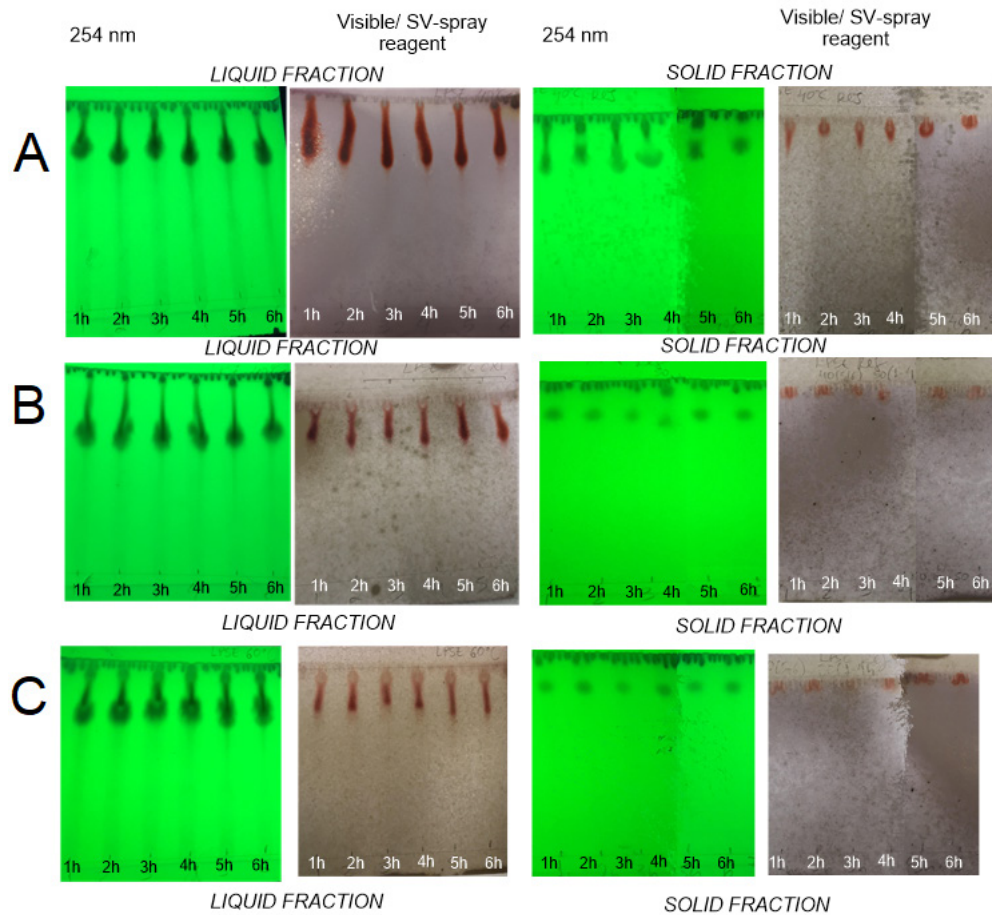


Figure 7. Thin-layer chromatography profile of guarana extracts obtained with hot hydroalcoholic extraction at 40 °C (A), 50 °C (B) and 60 °C (C).

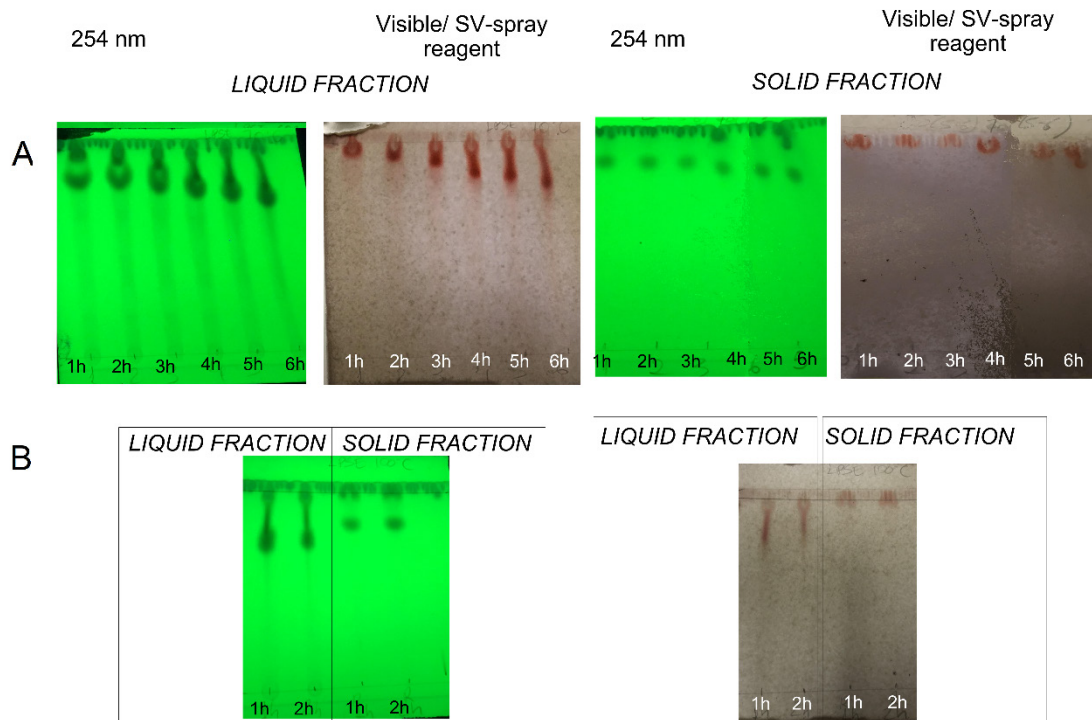


Figure 8. Thin-layer chromatography profile of guarana extracts obtained with hot hydroalcoholic extraction at 70 °C (A) and 100 °C (B).

The presence of catechins detected by TLC is confirmed by HPLC (Table 2). Extracts obtained with CHE using a 50% hydroalcoholic solution and the HHE extracts obtained in the last round of process were evaluated.

Highest concentrations of catechin and epicatechin were detected in extracts. Lowest proportion was attributed to epicatechin gallate. These information are in accordance with previous studies (MAJHENIČ et al., 2007, BAUMANN et al., 1995).

Considering the methylxanthines, caffeine occupies the highest proportion in guarana. Theobromine and theophylline are usually applied for the treatment of cardiac (PINHO et al., 2018), and respiratory diseases (ALGIERI et al., 2018), respectively.

In HHE it was possible to reach high concentration of catechins and methylxanthines at 60°C. It is observed that at 70 °C and 100 °C the concentration of these molecules decreased because of thermal degradation (Table 2).

Process	Particle diameter	Temperature	CAT	EC	ECG	CAF	TBr	TPh
CHE	Dp=1.68 mm	25°C	6.95±0.14	4.04±0.16	0.02±0.01	4.70±0.02	0.04±0	0.14±0.03
	Dp=25 µm		6.39±0.03	4.04±0.04	0.03±0.01	4.70±0.03	0.04±0	0.12±0.04
	Dp=125 µm		3.99±0.01	2.48±0.10	0.02±0	3.22±0	0.03±0	0.15±0.02
HHE	Dp=1.68 mm	40°C	6.65±0.14	3.77±0.07	0.02±0.01	4.75±0.01	0.02±0	0.19±0.01
		50 °C	7.85±0.05	4.66±0.21	0.08±0.05	5.28±0.02	0.04±0	0.15±0.03
		60 °C	8.90±0.08	5.44±0.24	0.18±0.02	5.84±0.02	0.04±0	0.12±0.03
		70 °C	6.46±0.07	3.76±0.08	0.04±0	4.60±0.01	0.05±0	0.08±0.02
		100 °C	2.78±0.11	1.52±0.01	0.01±0	2.21±0.07	0.02±0	0.09±0

Table 2. The catechin and methylxanthine concentrations (mg/mL) in guarana extracts in the last hour of extraction.

CAT- catechin, EC – epicatechin, ECG – epicatechin gallate, CAF – caffeine, TBr – theobromine, TPh – theophylline.

#### 4 | CONCLUSIONS

The effects of hydroalcoholic extraction of guarana seeds on the recovery of bioactive constituents were evaluated in this work using quantitative and qualitative approaches. In CHE, highest content of polyphenols and methylxanthines was detected in the extracts obtained from seeds with 1.68mm diameter and solvent formulation constituted of 50% ethanol. The solid wastes showed relevant antioxidant capacity in terms of inhibition of oxidation of  $\beta$ -carotene and the scavenging of DPPH free radical. Positive presence of phenolic compounds was detected in TLC plates with sulfuric-vanillin spray reagent, which was confirmed by quantitative evaluation with HPLC. The highest concentration of caffeine, theobromine, theophylline, catechin, epicatechin and epicatechin gallate was found in HHE extracts obtained at 60°C. The results obtained showed the potential of this ecofriendly approach, in contrast to common methods that

make use of potentially toxic organic solvents

## ACKNOWLEDGEMENTS

Part of the information available in this chapter was presented in the Brazilian Congress on Food Science and Technology - CBCTA 2018 (<http://cbcta2018.com.br/>). Ádina L. Santana thanks CAPES (process 1764130) for her postdoctoral financial support.

## REFERENCES

- ALGIERI, C.; PARISI, O. I.; GULLO, M. R.; PUOCI, F.; DRIOLI, E.; DONATO, L. Development of novel hybrid imprinted membranes for selective recovery of theophylline. **Separation and Purification Technology**, v. 192, n. p. 513-519, 2018.
- ANTONELLI-USHIROBIRA, T. M.; KANESHIMA, E. N.; GABRIEL, M.; AUDI, E. A.; MARQUES, L. C.; MELLO, J. C. P. Acute and subchronic toxicological evaluation of the semipurified extract of seeds of guaraná (Paullinia cupana) in rodents. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 7, p. 1817-1820, 2010.
- BAUMANN, T. W.; SCHULTHESS, B. H.; HÄNNI, K. Guaraná (Paullinia cupana) rewards seed dispersers without intoxicating them by caffeine. **Phytochemistry**, v. 39, n. 5, p. 1063-1070, 1995.
- BRAZ, R.; WOLF, L. G.; LOPES, G. C.; MELLO, J. C. P. D. Quality control and TLC profile data on selected plant species commonly found in the Brazilian market. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. p. 1111-1118, 2012.
- DA SILVA, G. S.; CANUTO, K. M.; RIBEIRO, P. R. V.; DE BRITO, E. S.; NASCIMENTO, M. M.; ZOCOLO, G. J.; COUTINHO, J. P.; DE JESUS, R. M. Chemical profiling of guarana seeds (Paullinia cupana) from different geographical origins using UPLC-QTOF-MS combined with chemometrics. **Food Research International**, v. 102, n. p. 700-709, 2017.
- DALONSO, N.; PETKOWICZ, C. L. D. O. Guarana powder polysaccharides: Characterisation and evaluation of the antioxidant activity of a pectic fraction. **Food Chemistry**, v. 134, n. 4, p. 1804-1812, 2012.
- EL SEOUD, O. A.; NOVAKI, L. P.; POSSIDONIO, S.; CHINELATTO, A. M.; E SILVA, M. J. D. A.; BROTERO, P. P. The Chemistry of Beverages for High School Students: A Project on Extraction and Analysis of Caffeine from Guaraná Powder. **Journal of Laboratory Chemical Education**, v. 6, n. 1, p. 12-17, 2018.
- JOHNER, J. C. F.; MEIRELES, M. A. A. Construction of a supercritical fluid extraction (SFE) equipment: validation using annatto and fennel and extract analysis by thin layer chromatography coupled to image. **Food Science & Technology (Campinas)**, v. 36, n. 2, p. 1-38, 2016.
- JOHNER, J. C. F.; SANTANA, Á. L.; MEIRELES, M. A. A. Fractionation of annatto extracts with carbon dioxide using a home-made equipment. **Food and Public Health**, v. 7, n. 3, p. 69-74, 2017.
- KRISHNASWAMY, N. R. **Chemistry of natural products: a laboratory handbook**, Hyderabad, Universities Press, 2003.
- LAJOLO, F. M. Functional foods: Latin American perspectives. **British Journal of Nutrition**, v. 88, n. S2, p. S145-S150, 2007.

- LEAL, P. F.; CHAVES, F. C. M.; MING, L. C.; PETENATE, A. J. ; MEIRELES, M. A. A. Global yields, chemical compositions and antioxidant activities of clove basil (*Ocimum gratissimum* L.) extracts obtained by supercritical fluid extraction. **Journal of Food Process Engineering**, v. 29, n. 5, p. 547-559, 2006.
- MACEDO, J. A.; BATTESTIN, V.; RIBEIRO, M. L. ; MACEDO, G. A. Increasing the antioxidant power of tea extracts by biotransformation of polyphenols. **Food Chemistry**, v. 126, n. 2, p. 491-497, 2011.
- MAJHENIČ, L.; ŠKERGET, M. ; KNEZ, Ž. Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p. 1258-1268, 2007.
- MARCO, G. J. A rapid method for evaluation of antioxidants. **Journal American Oil Chemists Society**, v. 45, n. 9, p. 594-598, 1968.
- MARQUES, L. L. M.; PANIZZON, G. P.; AGUIAR, B. A. A.; SIMIONATO, A. S.; CARDOZO-FILHO, L.; ANDRADE, G.; DE OLIVEIRA, A. G.; GUEDES, T. A. ; MELLO, J. C. P. D. Guaraná (*Paullinia cupana*) seeds: Selective supercritical extraction of phenolic compounds. **Food Chemistry**, v. 212, n. p. 703-711, 2016.
- MARTINS, I. M.; ROBERTO, B. S.; BLUMBERG, J. B.; CHEN, C. Y. O. ; MACEDO, G. A. Enzymatic biotransformation of polyphenolics increases antioxidant activity of red and white grape pomace. **Food Research International**, v. 89, n. p. 533-539, 2016.
- MILLER, H. E. A simplified method for the evaluation of antioxidants. **Journal American Oil Chemists Society**, v. 48, n. 2, p. 91, 1971.
- NAKAJIMA, V. M.; MADEIRA JR, J. V.; MACEDO, G. A. ; MACEDO, J. A. Biotransformation effects on anti lipogenic activity of citrus extracts. **Food Chemistry**, v. 197, Part B, n. p. 1046-1053, 2016.
- NAZARÉ, R. F. R. **Processamento do Guaraná em Pó Solúvel**, Embrapa - CPATU, 1997.
- OLIVEIRA, S. S.; DEL GIGLIO, A. B.; LERNER, T. G.; ZANELATO, R. M.; TIEMI, L.; REIFUR, L.; SANTI, P. X. ; DEL GIGLIO, A. *Paullinia cupana* para o controle de fogachos em pacientes com câncer de mama: um estudo piloto. **Einstein (São Paulo)**, v. 11, n. p. 435-438, 2013.
- PALMA, C. G. L.; LERA, A. T.; LERNER, T.; DE OLIVEIRA, M. M.; DE BORTA, T. M.; BARBOSA, R. P.; BRITO, G. M.; GUAZZELLI, C. A.; CRUZ, F. J. M. ; DEL GIGLIO, A. Guarana (*Paullinia cupana*) Improves Anorexia in Patients with Advanced Cancer. **Journal of Dietary Supplements**, v. 13, n. 2, p. 221-231, 2016.
- PESCHEL, W.; SÁNCHEZ-RABANEDA, F.; DIEKMANN, W.; PLESCHER, A.; GARTZÍA, I.; JIMÉNEZ, D.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.; BUXADERAS, S. ; CODINA, C. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. **Food Chemistry**, v. 97, n. 1, p. 137-150, 2006.
- PINHO, L. A. G.; LIMA, S. G. B.; MALAQUIAS, L. F. B.; PIRES, F. D. Q.; SÁ-BARRETO, L. L.; CARDOZO-FILHO, L.; GRATIERI, T.; GELFUSO, G. M. ; CUNHA-FILHO, M. Improvements of theobromine pharmaceutical properties using solid dispersions prepared with newfound technologies. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 132, n. p. 1193-1201, 2018.
- PORTELLA, R. D. L.; BARCELOS, R. P.; DA ROSA, E. J. F.; RIBEIRO, E. E.; DA CRUZ, I. B. M.; SULEIMAN, L. ; SOARES, F. A. A. Guaraná (*Paullinia cupana* Kunth) effects on LDL oxidation in elderly people: an in vitro and in vivo study. **Lipids in Health and Disease**, v. 12, n. 1, p. 12, 2013.
- SANTANA, Á. L. ; MACEDO, G. A. Effects of hydroalcoholic and enzyme-assisted extraction processes on the recovery of catechins and methylxanthines from crude and waste seeds of guarana (*Paullinia cupana*). **Unpublished work**, 2018a.

SANTANA, Á. L. ; MACEDO, G. A. Health and technological aspects of methylxanthines and polyphenols from guarana: A review. **J Funct Food**, v. 47, n. p. 457-468, 2018b.

SANTANA, Á. L. ; MEIRELES, M. A. A. Thin-layer chromatography profiles of non-commercial turmeric (*Curcuma longa* L.) products obtained via partial hydrothermal hydrolysis. **Food and Public Health**, v. 6, n. 1, p. 15-25, 2016.

SANTANA, Á. L. ; MEIRELES, M. A. A. Coprecipitation of turmeric extracts and polyethylene glycol with compressed carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 125, n. p. 31-41, 2017.

SANTANA, Á. L.; SANTOS, D. T. ; MEIRELES, M. A. A. Perspectives on small-scale integrated biorefineries using supercritical CO<sub>2</sub> as a green solvent. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 18, n. p. 1-12, 2019.

SANTANA, Á. L.; ZABOT, G. L.; OSORIO-TOBÓN, J. F.; JOHNER, J. C. F.; COELHO, A. S.; SCHMIELE, M.; STEEL, C. J. ; MEIRELES, M. A. A. Starch recovery from turmeric wastes using supercritical technology. **Journal of Food Engineering**, v. 214, n. p. 266-276, 2017.

SHAHIDI, F. ; ZHONG, Y. Measurement of antioxidant activity. **Journal of Functional Foods**, v. 18, n. p. 757-781, 2015.

SINGLETON, V. L. ; ROSSI, J. A. J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic–phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. p. 144-158, 1965.

ŠKERGET, M.; KOTNIK, P.; HADOLIN, M.; HRAŠ, A. R.; SIMONIČ, M. ; KNEZ, Ž. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. **Food Chem.**, v. 89, n. 2, p. 191-198, 2005.

YAMAGUTI-SASAKI, E.; ITO, A. L.; CANTELI, C. V.; USHIROBIRA, M. T.; UEDA-NAKAMURA, T.; FILHO, P. B.; NAKAMURA, V. C. ; PALAZZO DE MELLO, C. J. Antioxidant Capacity and In Vitro Prevention of Dental Plaque Formation by Extracts and Condensed Tannins of *Paullinia cupana*. **Molecules**, v. 12, n. 8, 2007.

YONEKURA, L.; MARTINS, C. A.; SAMPAIO, G. R.; MONTEIRO, M. P.; CESAR, L. A. M.; MIOTO, B. M.; MORI, C. S.; MENDES, T. M. N.; RIBEIRO, M. L.; ARCARI, D. P. ; TORRES, E. A. F. D. S. Bioavailability of catechins from guarana (*Paullinia cupana*) and its effect on antioxidant enzymes and other oxidative stress markers in healthy human subjects. **Food & Function**, v. 7, n. 7, p. 2970-2978, 2016.

## PERFIL DE SENSIBILIDADE DE *Staphylococcus* spp. *Enterococcus* spp. E *Escherichia coli* ISOLADOS DE MUÇARELA A ANTIBIÓTICOS DE USO FARMACÊUTICO

### **Juliana dos Santos Loria de Melo**

Universidade Federal Fluminense (UFF) –  
Faculdade de Veterinária – Departamento de  
Tecnologia de Alimentos, Niterói, Rio de Janeiro,  
Brasil

### **Carolina Riscado Pombo**

Universidade Federal Fluminense (UFF) –  
Faculdade de Veterinária – Departamento de  
Tecnologia de Alimentos, Niterói, Rio de Janeiro,  
Brasil

**RESUMO:** Muitos microrganismos patogênicos podem ser veiculados ao homem através do consumo de leite e seus derivados. O desenvolvimento de antimicrobianos levou ao surgimento de diversas drogas com espectro de ação cada vez mais amplo e a exposição desencadeou resistência bacteriana, restringindo as opções terapêuticas dos processos infecciosos tornando fundamental a reavaliações periódicas no perfil de susceptibilidade. Das 48 amostras coletadas, 50% apresentaram resultado dentro dos padrões para coliformes termotolerantes e estafilococos coagulase positiva e negativos para a presença de *Enterococcus* spp. Os resultados obtidos de coliformes termotolerantes foram 10,4% e duas delas foram identificadas a presença de *Escherichia coli*. Os resultados relacionados com a identificação de *Enterococcus* spp.

foram de 22,9% amostras positivas. Nos testes de sensibilidade das cepas isoladas foram observados resistência a antimicrobianos diferentes em todas as cepas analisadas. Apresenta-se como justificativa deste trabalho a investigação de possíveis agentes patogênicos contaminantes presentes em muçarela a fim de monitorar a qualidade dos produtos oferecidos para consumo. Foi possível também obter informações quanto às condições de armazenamento e distribuição para o consumo, além de traçar um perfil de sensibilidade a antibióticos de uso farmacêutico e quanto ao risco à saúde da população.

**PALAVRAS-CHAVE:** Perfil de sensibilidade; muçarela; contaminação.

**ABSTRACT:** Many pathogenic microorganisms can be transmitted to humans through the consumption of milk and its derivatives. The development of antimicrobials led to the emergence of several drugs with an increasingly broad spectrum of action and the exposure triggered bacterial resistance, restricting the therapeutic options of the infectious processes making fundamental to periodic reevaluations in the Sensitivity profile. Of the 48 samples collected, 50% presented results within the standards for thermotolerant coliforms and coagulase positive staphylococci and negative for the presence of *Enterococcus* spp. The

results obtained from thermotolerant coliforms were 10.4% and two of them were identified the presence of *Escherichia coli*. The results related to the identification of *Enterococcus* spp. were 22.9% positive samples. In the susceptibility tests of the isolated strains resistance to different antimicrobials was observed in all strains analyzed. It is presented as justification of this work the investigation of possible contaminating pathogens present in muçarela in order to monitor the quality of the products offered for consumption. It was also possible to obtain information on the conditions of storage and distribution for consumption, as well as to establish a sensitivity profile for antibiotics for pharmaceutical use and for the health risk of the population.

**KEYWORDS:** Sensitivity profile; muçarela; contamination.

## 1 | INTRODUÇÃO

O queijo é um alimento bastante comum na dieta humana, compondo, geralmente, a alimentação de todas as classes sociais. Dentre as bactérias que podem se desenvolver em queijos destacam principalmente, os coliformes, indicando a qualidade do produto através do número e a presença destes microrganismos. Para a fabricação industrial do queijo, o leite deve ser pasteurizado com o objetivo de eliminar os microrganismos patogênicos em atendimento a legislação vigente. No entanto, é observado falhas no processo de obtenção da matéria-prima, na fabricação, na conservação ou na distribuição podendo acarretar contaminação do produto, com possibilidade de ocasionar toxinfecções de origem alimentar. Queijos em condições inadequadas para consumo humano podem desencadear graves consequências para a população, se tornando um grave problema de saúde pública (SILVA et al., 2011).

Do ponto de vista de saúde pública, Correia e Roncada (1997) já descreviam que a população deve ter ao seu alcance alimentos de boa qualidade, dentro de padrões pré-estabelecidos, não só em valores nutritivos, como, também, quanto às condições higiênicas, que propiciem segurança para a saúde do consumidor. Segundo o discriminado no Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos, a Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 12 de 2 de janeiro de 2001 da ANVISA, as doenças de origem alimentar são causadas pela ingestão de um alimento contaminado por um agente infeccioso específico ou pela toxina por ele produzida, por meio da transmissão desse agente ou de seu produto tóxico (BRASIL, 2001). E para um melhor controle desta contaminação, Castro et al (2012) relatam que é estabelecido padrões microbiológicos sanitários para queijos do tipo muçarela, considerados de média umidade (36%), determinando limites de tolerância para amostras representativas e indicativas.

Entretanto, Franco e Landgraf (2008), além de Franco (2012), relatam que a contaminação será sempre um reflexo das condições higiênicas e sanitárias deficientes ao longo das diversas etapas do processo pelos quais os alimentos passam e tem as bactérias como os microrganismos de maior atuação nos processos de contaminação



de alimentos, devido à capacidade de utilização dos diversos substratos, nas diversas faixas de temperatura, pH e sobrevivência em diversas condições ambientais. Os microrganismos que contaminam os alimentos são provenientes de diferentes fontes: solo, água, plantas, utensílios, animais, manipuladores de alimentos, ar, pó, ração animal, trato intestinal do homem, superfícies, entre outras.

Martins et al (2009) destacam pesquisas envolvendo o perfil de resistência a antibióticos de *S. aureus*, isolados de portadores humanos, comprovando que o uso indiscriminado desses agentes antimicrobianos representa um problema crescente. O autor ainda destaca que o potencial patogênico desse microrganismo está relacionado com sua grande capacidade de mutação para formas mais resistentes frente aos antibióticos mais largamente utilizados.

Dentre os microrganismos pesquisados, o *Staphylococcus* spp. é uma bactéria que habita com frequência a nasofaringe do ser humano, a partir da qual pode facilmente contaminar as mãos do homem e penetrar no alimento, causando a intoxicação alimentar estafilocócica. É uma bactéria que possui a capacidade de produzir enterotoxinas, que podem causar cefaleia, náuseas, vômitos, dores abdominais, hipotermia e até alterações de pressão sanguínea. A intoxicação alimentar causada pela bactéria se dá pela ingestão de alimentos contaminados pela toxina pré-formada. (MARTINS et al., 2009; VIEIRA, 2003). André et al. (2006) citam que o homem e os animais são os principais reservatórios de *S. aureus*.

A *Escherichia coli* é uma importante bactéria indicadora de contaminação fecal nos alimentos, por fazer parte da microbiota normal do intestino dos seres humanos e dos animais de sangue quente sugerindo condições higiênicas inadequadas no preparo e manipulação de alimentos. A contaminação dos alimentos por esta bactéria pode causar diarreia ou síndromes disentéricas, conforme os patótipos dos agentes etiológicos infectantes (FRANCO e LANDGRANF, 2008; FRANCO, 2012).

O *Enterococcus* spp apresenta grande importância em segurança alimentar, uma vez que pode determinar o aparecimento de aminas biogênicas, dentre elas a histamina podendo ocasionar intoxicação alimentar aos consumidores (MANTILLA et al., 2007). Franco (2012) relata que a identificação de *Enterococcus* spp é significativa também como indicadora das condições higiênicas, particularmente em alimentos refrigerados ou congelados, pasteurizados, ou submetidos a outros tratamentos capazes de destruir ou injuriar os indicadores mais sensíveis, caso de coliformes termotolerantes. Entretanto, os autores citam que este gênero como indicador de contaminação fecal dos alimentos oferece restrições, uma vez que, os *Enterococos* são encontrados em outros “habitats” que não o trato gastrointestinal de mamíferos e evidenciam maior persistência e sobrevivência no solo, vegetais e alimentos. São mais resistentes à desidratação, ação de desinfetantes e às flutuações de temperatura, comparativamente às enterobactérias patogênicas. Apesar das restrições, sua presença em números elevados em alimentos indica práticas sanitárias inadequadas ou exposição do alimento às condições que permitam a multiplicação de microrganismos indesejáveis

(FRANCO e LANDGRAF, 2008).

André et al. (2006) destacam que o uso indiscriminado de antibióticos em alimentos, seja para fins terapêuticos, profilaticamente, ou ainda, incorporados à alimentação como suplemento dietético, facilita a disseminação de microrganismos designados MDR (multidroga resistentes). Relatam que entre os problemas ocasionados por estes resíduos, a seleção de cepas resistentes, assim como, a possibilidade de transferência de resistência entre espécies, através de mecanismos genéticos. Dificultando assim, o tratamento quando necessário. Sob condições favoráveis, estas bactérias podem proliferar e constituir risco à Saúde Pública podendo algumas produzir enterotoxinas. A ingestão de alimentos contendo enterotoxinas pré-formadas é responsável pela intoxicação alimentar, dentre elas, a estafilocócica é uma das doenças de origem alimentar mais comuns em vários países do mundo.

Martins et al (2010) ainda citam que o surgimento de cepas resistentes aos antibióticos torna fundamental o desenvolvimento de novas drogas com atividade antimicrobiana e reavaliações periódicas no perfil de susceptibilidade.

O trabalho teve como objetivo a investigação de possíveis agentes patogênicos contaminantes presentes em muçarela a fim de monitorar a qualidade dos produtos oferecidos para consumo, uma vez que, este é um alimento que pode ser consumido sem nenhum tratamento térmico após a compra. E além disso, obter informações que permitem avaliá-lo quanto às condições de processamento, armazenamento e distribuição para o consumo, além de traçar um perfil de sensibilidade a antibióticos de uso farmacêutico e quanto ao risco à saúde da população.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

O objeto do estudo é constituído de amostras de muçarela de forma embalada no estabelecimento e fatiada na hora adquiridas no comércio formal – supermercados e padarias dos bairros Jardim Icaraí e Icaraí no município de Niterói (RJ).

### 2.1 Obtenção das amostras

Foram visitados nove estabelecimentos comerciais (supermercados e padarias) nos bairros Jardim Icaraí e Icaraí, da cidade de Niterói-RJ, e adquiridas 48 amostras de muçarela de diferentes marcas pela compra direta nos diferentes estabelecimentos – supermercados e padarias. As amostras foram adquiridas simulando uma situação real de compra pelo consumidor. Dessas amostras, 24 haviam sido previamente embaladas no estabelecimento e de escolha aleatória nas gôndolas de exposição à venda e 24 amostras adquiridas fatiadas na hora pelo responsável do setor no estabelecimento de venda. As amostras foram acondicionadas, após a compra, nas embalagens fornecidas pelos estabelecimentos e encaminhadas diretamente ao Laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal da Faculdade de Medicina Veterinária

da Universidade Federal Fluminense-UFF onde foram realizadas as análises.

## 2.2 Preparo da amostra

O preparo da amostra teve início com a pesagem de  $25 \pm 0,2$  gramas de amostra, transferida para 225 mL de solução salina peptonada 0,1% e imediatamente procedeu-se a homogeneização em *Stomacher* por 60 segundos.

## 2.3 Análises Microbiológicas

As análises foram realizadas através da técnica de semeadura em superfície, sendo as amostras semeadas em agar EMB (*Eosin Methylene Blue*) para a pesquisa de *Escherichia coli* e ágar BP (Baird-Parker) para pesquisa de Estafilococos. As bactérias crescidas em ágar Baird-Parker sugestivas de *Staphylococcus* spp. e as sugestivas de *Escherichia coli* em ágar Eosina Azul de Metileno, respectivamente, foram transferidas para caldo BHI e incubadas a 36°C por 48 horas.

Para a Identificação de *Enterococcus* spp. foram semeados 1 mL da solução salina peptonada 0,1% inicial (diluição  $10^{-1}$ ) em tubo contendo 10 mL do meio “Chromocult Enterococci broth”. A incubação ocorreu a 35-37°C durante 24h a 48h até obter-se a mudança de coloração do tubo para verde azulado.

Os tubos que apresentaram cor verde azulada, indicaram a presença de *Enterococcus* spp. e a partir deste resultado positivo foi encaminhado para a realização do teste de sensibilidade.

Após o crescimento em caldo BHI, foi realizado o teste de coagulase para pesquisa de *S. aureus* (Estafilococos coagulase positiva) e as provas bioquímicas IMViC (Indol, Vermelho de Metila e Citrato de Simmons) para identificação de *E. coli*. Sendo esses testes confirmatórios para o microrganismo pesquisado, seguiu-se para o teste antimicrobiano pela técnica de difusão em disco, em Agar Mueller-Hinton, com os seguintes antibióticos para *Staphylococcus* spp: Penicilina G, Cloranfenicol, Cefalexina, Eritromicina, Ampicilina e Rifampicina; para *Escherichia coli*: Amoxicilina, Polimixina B, Nitrofurantoína, Ciprofloxacina, Gentamicina e Amicacina e para *Enterococcus* spp: Clornfenicol, Nitrofurantoína, Eritromicina, Ciprofloxacina, Ampicilina, Rifampicina e Vancomicina.

A metodologia de leitura foi realizada medindo os halos de inibição formados ao redor dos discos, medidos com paquímetro após 24h de incubação a 37°C. O teste de susceptibilidade a antimicrobianos foi realizado segundo a técnica de disco-difusão em ágar, preconizado pelo CLSI (2011).

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 48 amostras coletadas, 30 (62,5%) delas apresentaram resultados negativos para a presença dos microrganismos pesquisados. Entretanto, dois (4,17%) apresentaram contagem de Estafilococos coagulase positiva entre  $1,1 \times 10^2$  e  $1,4 \times 10^3$  UFC/g e cinco (10,4%) foram identificadas a presença de *E. coli*. Os resultados relacionados com a identificação de *Enterococcus* spp foram de 11 (22,9%) amostras positivas.

Peixoto et al (2009) relatam que coliformes termotolerantes são indicadores de más condições higiênico-sanitárias dos alimentos e dos locais de preparação e/ou armazenamento, e são problemas frequentes na manipulação de alimentos preparados e manipulados.

Os resultados para estafilococos coagulase positivo foram considerados abaixo dos obtidos por ANDRÉ et al (2006) que descrevem 13 (54,2%) amostras com população acima do limite estabelecido pela legislação brasileira ( $10^3$  UFC/g). Os resultados obtidos no presente trabalho apresentaram melhores que os relatados por Castro et al (2012), que verificaram para contagem de *Staphylococcus* spp 91,66% das amostras apresentaram-se acima de  $10^3$  UFC/g.

Com relação ao teste de sensibilidade das cepas isoladas foram obtidos os seguintes resultados: das cepas de *Staphylococcus* spp, 50% apresentaram resistência para Rifampicina e Cloranfenicol; das cepas de *Escherichia coli*, 50% apresentaram resistência para Amoxicilina, e Nitrofurantoína e das cepas de *Enterococcus* spp. isoladas, 45,4% apresentaram resistência para Rifampicina, Eritromicina e Cloranfenicol, 27,3% apresentaram resistência para Nitrofurantoína. Este resultado também foi relatado por Furlaneto-Maia et al. (2014) que detectou isolados de *Enterococcus* multirresistentes, a partir de amostras de alimentos, sendo resistente à vancomicina e outros a antibióticos de importância clínica. Fracalanza et al. (2007) e Rizzotti et al (2009) descrevem que, assim como para microrganismos mais patogênicos, a resistência a antimicrobianos associados com os alimentos indica que há forte evidencia epidemiológica de um *link* entre o uso de antimicrobianos na medicina humana e na produção animal com o surgimento, disseminação e persistência de cepas resistentes em produtos de origem animal. Os resultados são semelhantes aos obtidos por Melo (2010) que relata em diversos países o aparecimento de cepas de *E. coli* multirresistentes aos antibióticos e constitui uma séria preocupação para a saúde pública, pois dificulta ou mesmo inviabiliza o tratamento de doenças causadas por estas cepas resistentes. Bandeira et al (2014) obtiveram resultados mais graves ao descrever a resistência de 100% das cepas de *Staphylococcus* spp. em alimentos a ampicilina e penicilina G. Os autores ainda relatam que, com relação aos antimicrobianos Amicacina, Cefalexina, Gentamicina e Oxacilina houve resistência em 8%, 8%, 13% e 87% das cepas, respectivamente e destacam que a elevada incidência de *Staphylococcus* spp. resistentes aos antimicrobianos testados é preocupante, pois

trata-se de bactérias de origem alimentar.

André et al (2006) obtiveram resultados mais sérios, uma vez que, todos os *S. aureus* isolados foram susceptíveis à ciprofloxacina e gentamicina. Os autores descrevem que foi observada resistência em 6,5% isolados para eritromicina, 24,7% para tetraciclina, 1,3% para vancomicina, 5,2% para oxacilina e 68,8% para penicilina. Foram susceptíveis a todos os antibióticos testados 14,3% dos isolados e 23,4% foram resistentes a mais de um antibiótico.

## 4 | CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstram a relevância deste estudo a fim de garantir a segurança alimentar, uma vez que, a presença das bactérias como *E. coli*, estafilococos coagulase positiva e do gênero *Enterococcus* em alimentos de origem animal os tornam potenciais veículos desses patógenos para o homem.

O *Staphylococcus* spp. e *Escherichia coli* são consideradas bactérias de origem alimentar de elevada incidência e a resistência aos antimicrobianos testados é preocupante tendo como consequência um importante risco potencial para a saúde pública podendo dificultar o tratamento de doenças humanas e de animais.

Desta forma, pode ser observado que os estabelecimentos devem investir na aplicação adequada de Boas Práticas de Fabricação (BPF). Além disso, devem se preocupar com treinamento dos manipuladores dando atenção para o preparo e embalagem dos produtos, uma vez que, dos nove estabelecimentos, apenas quatro obtiveram resultados satisfatórios das muçarelas adquiridas para análise.

## REFERÊNCIAS

ANDRÉ, M. C. D. P. B.; SANTOS, P. P.; CAMPOS, M. R. H.; BORGES, L. J.; SERAFINI, A. B. (2006) **Utilização do Antibiograma como Ferramenta de Tipagem Fenotípica de *Staphylococcus aureus***. Braz. J. vet. Res. anim. Sci. v. 43, suplemento, p. 102-108.

BANDEIRA, M. G. L.; SANTOS, A. S.; ABRANTES, M. R.; REBOUÇAS, G. G.; SILVA, M. E. T.; PAIVA, W. S.; MAIA, M. O.; LIMA, L. S. C. I. (2014) **Perfil de sensibilidade de *Staphylococcus* spp. isolados de alimentos a antibióticos de uso farmacêutico**. In: Anais do 12º Congresso Latinoamericano de Microbiologia e Higiene de Alimentos - MICROAL 2014, São Paulo.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. (2001) **Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. (Resolução RDC n. 12, de 2 de janeiro de 2001). Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília.

CASTRO, A. C. S.; PINTO JÚNIOR, W. R.; TAPIA, D. M. T.; CARDOSO, L. G. V. (2012) **Qualidade de queijos do tipo Mussarela**. Alim. Nutr. v. 23, n. 3, p. 407-413.

CORREIA, M.; RONCADA, M, J. (1997) **Características microscópicas de queijos prato, mussarela e mineiro comercializados em feiras livres da Cidade de São Paulo**. Rev. Saúde Pública, v. 31, n. 3, p. 296-301.

CLSI-CLINICAL AND LABORATORY. **Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing;** (2011). Twenty-First Informational Supplement Approved standard M100-S21, 31.

FRACALANZZA, S. A.P. (2007) **Antimicrobial resistance profiles of enterococci isolated from poultry meat and pasteurized milk in Rio de Janeiro, Brazil.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 12, n. 7, p. 853-859.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. (2008). **Microbiologia dos alimentos.** São Paulo: Atheneu.

FRANCO, R.M. (2012) **Agentes etiológicos de doenças alimentares.** Niterói: Editora da UFF.

FURLANETO-MAIA, L., ROCHA, K.R., HENRIQUE, F.C., GIAZZI, A., FURLANETO, M.C. (2014) **Antimicrobial resistance in *Enterococcus* sp isolated from soft chesse in Southern Brazil,** Advances in Microbiology. v.4, 175-181.

MANTILLA, S. P. S; GOUVEA, R.; FRANCO, R. M.; MANO, S. B. (2007) ***Enterococcus* em corte de carne bovina: Enumeração, identificação bioquímica e análises físico-químicas.** Higiene Alimentar, v. 21, p. 67-72.

MARTINS, S. C. S.; MARTINS, C. M.; ALBUQUERQUE, L. M. B.; FONTELES, T. V.; REGO, S. L.; JUNIOR, G. S. F.; B. CEPPA. (2009) **Perfil de resistência de cepas de *staphylococcus coagulase* positiva isoladas de manipuladores de alimentos.,** Curitiba, v. 27, n. 1, p. 43-52.

MARTINS, W.F., RODRIGUES, M.S.A; PEREIRA, K.D.; ALMEIDA, M.C.B.M; BEZERRA, R.R.A.; ARAUJO, A.S. (2010) **Avaliação microbiológica de queijos tipo manteiga fabricados artesanalmente no município de Pombal - PB.** IV Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite, Florianópolis-SC.

MELO, D. B. (2010) **Padrão clonal e perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* isoladas de alimentos e de espécimes clínicas.** (Dissertação de mestrado). Universidade Federal da Bahia, Salvador.

MOSSEL, D. A. A.; HARREWIJN, G. A.; VANSPRANG, F. J. (1973) In: **The Microbiological Safety of Food.** Academic Press, Londres, 77-88.

PEIXOTO, D.; WECKWEH, P. H.; SIMIONATO, E. M. R. S. (2009) **Avaliação da qualidade microbiológica de produtos de confeitaria comercializados na cidade de Ribeirão Preto / SP.** Alim. Nutr., Araraquara v.20, n.4, p. 611-615.

RIZZOTTI, L. (2009) **Molecular diversity and transferability of the tetracycline resistance gene tet (M), carried on Tn916-1545 family transposons, in enterococci from total food chain.** Antonie van Leeuwenhoek v.96, p.43-52.

SILVA, J. F. Q., FILIZOLA, L. R. S., MAIA, M. M. D.; SENA, M. J. (2011). **Utilização de coliformes termotolerantes como indicadores higiênico-sanitários de queijo Prato comercializado em supermercados e feiras livres de Recife-PE.** Revista de Medicina Veterinária, v.1, 21-25.

VIEIRA, R.H.S.F. (2003) **Microbiologia higiene e qualidade do pescado – Teoria e Prática.** São Paulo: Varela.

## PERFIL DE SENSIBILIDADE DE *Staphylococcus* SPP. *Enterococcus* SPP. E *ESCHERICHIA COLI* ISOLADOS DE SALSICHA A ANTIBIÓTICOS DE USO FARMACÊUTICO

### **Juliana dos Santos Loria de Melo**

Universidade Federal Fluminense (UFF) –  
Faculdade de Veterinária – Departamento de  
Tecnologia de Alimentos, Niterói, Rio de Janeiro,  
Brasil

### **Carolina Riscado Pombo**

Universidade Federal Fluminense (UFF) –  
Faculdade de Veterinária – Departamento de  
Tecnologia de Alimentos, Niterói, Rio de Janeiro,  
Brasil

**RESUMO:** Os microrganismos apresentam grande importância em segurança alimentar. Entretanto as más condições na elaboração, fracionamento e armazenamento, podem torná-lo um alimento transmissor de microrganismos patogênicos. O desenvolvimento de antimicrobianos nas últimas décadas levou ao surgimento de diversas drogas com espectro de ação cada vez mais amplo e a exposição desencadeou resistência bacteriana, restringindo as opções terapêuticas dos processos infecciosos tornando fundamental a reavaliações periódicas no perfil de susceptibilidade. Das 36 amostras de salsichas adquiridas, 44,5% delas apresentaram resultado negativo para os microrganismos pesquisados. Entretanto, 8,4% apresentaram *Estafilococos* coagulase positiva, 13,9% foram identificadas a presença de *Escherichia coli*. Os

resultados relacionados com a identificação de *Enterococcus* spp. foram de 44,5% amostras positivas. Nos testes de sensibilidade das cepas isoladas foram observados resistência a pelo menos três antimicrobianos diferentes em todas as cepas analisadas. O trabalho teve como objetivo avaliar a presença de *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp. e *Escherichia coli* oriundos de salsichas a fim de monitorar a qualidade dos produtos oferecidos para consumo, bem como, obter informações que permitem avaliá-lo quanto às condições de armazenamento e distribuição para o consumo, além de traçar um perfil de sensibilidade a antibióticos de uso farmacêutico e quanto ao risco à saúde da população.

**PALAVRAS-CHAVE:** perfil de sensibilidade; salsicha; contaminação.

**ABSTRACT:** Microorganisms are of great importance for food safety. However, the poor conditions in the elaboration, fractionation and storage, can make it a transmitting food of pathogenic microorganisms. The development of antimicrobials in recent decades has led to the emergence of several drugs with an increasingly broad spectrum of action and the exposure has triggered bacterial resistance, restricting the therapeutic options of the infectious processes making fundamental to periodic reevaluations in the susceptibility profile. Of the 36 samples of

sausages purchased, 44.5% presented negative results for the microorganisms studied. However, 8.4% presented coagulase positive staphylococci, 13.9% were identified as *Escherichia coli*. The results related to the identification of *Enterococcus* spp were 44.5% positive samples. In the susceptibility tests of the isolated strains, resistance to at least three different antimicrobials was observed in all strains analyzed. The objective of this study was to evaluate the presence of *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp. and *E. coli* from sausages in order to monitor the quality of the products offered for consumption, as well as to obtain information to evaluate the conditions of storage and distribution for consumption, as well as to establish a sensitivity profile to antibiotics of pharmaceutical use and the health risk of the population.

**KEYWORDS:** Sensitivity profile; sausage; contamination

## 1 | INTRODUÇÃO

Os alimentos possuem condições que possibilitam o desenvolvimento de microrganismos que, devido à capacidade de utilização dos diversos substratos, nas diversas faixas de temperatura, pH e sobrevivência em diversas condições ambientais, atuam nos processos de contaminação de alimentos. Os microrganismos que contaminam os alimentos são provenientes de diferentes fontes: solo, água, plantas, utensílios, animais, manipuladores de alimentos, ar, pó, ração animal, trato intestinal do homem, superfícies, entre outras. Destacando que a contaminação será sempre um reflexo das condições higiênicas e sanitárias deficientes ao longo das diversas etapas do processo pelos quais os alimentos passam (FRANCO e LANDGRAF, 2008; FRANCO, 2012).

André et al. (2006) relatam que a disseminação de microrganismos designados MDR (multidroga resistentes) é facilitado pelo uso indiscriminado de antibióticos em alimentos, seja para fins terapêuticos, profilaticamente, ou ainda, incorporados à alimentação como suplemento dietético. Destacam ainda que entre os problemas ocasionados por estes resíduos, ocorre a seleção de cepas resistentes, assim como, a possibilidade de transferência de resistência entre espécies, através de mecanismos genéticos. Sendo assim, o tratamento dificultado quando necessário. Estas bactérias, sob condições favoráveis, podem proliferar e constituir risco à Saúde Pública podendo algumas produzir enterotoxinas. A ingestão de alimentos contendo enterotoxinas pré-formadas é responsável pela intoxicação alimentar, dentre elas, a estafilocócica é uma das doenças de origem alimentar mais comuns em vários países do mundo.

Martins et al (2010) ainda destacam que o surgimento de cepas resistentes aos antibióticos torna fundamental o desenvolvimento de novas drogas com atividade antimicrobiana e reavaliações periódicas no perfil de susceptibilidade.

Dentre os microrganismos pesquisados, o *Staphylococcus* spp. é uma bactéria que habita com frequência a nasofaringe do ser humano, a partir da qual pode facilmente



contaminar as mãos do homem e penetrar no alimento, causando a intoxicação alimentar estafilocócica. É uma bactéria que possui a capacidade de produzir enterotoxinas, que podem causar cefaleia, náuseas, vômitos, dores abdominais, hipotermia e até alterações de pressão sanguínea. A intoxicação alimentar causada pela bactéria se dá pela ingestão de alimentos contaminados pela toxina pré-formada. Os humanos podem se tornar um importante hospedeiro assintomático desta bactéria (VIEIRA, 2003; ANDRÉ et al., 2006; MARTINS et al., 2010).

Martins et al. (2009) destacam que, desde o início do surgimento dos antibióticos, o tratamento das infecções estafilocócicas tem evoluído como consequência da emergência da resistência e desenvolvimento de novas drogas antibacterianas. O uso indiscriminado desses agentes antimicrobianos representa problema crescente e pesquisas envolvendo o perfil de resistência a antibióticos de *S. aureus*, isolados de portadores humanos, comprovam esse evento. O potencial patogênico desse microrganismo está relacionado com sua grande capacidade de mutação para formas mais resistentes frente aos antibióticos mais largamente utilizados.

A presença de coliformes indica condições insatisfatórias quanto à limpeza, sanitização de equipamentos e embalagens, além de hábitos higiênicos inadequados (JAY, 2005; SILVA JUNIOR, 2005). Os coliformes termotolerantes ou coliformes a 45°C, pertencem a família das *Enterobacteriaceae*, tendo a *Escherichia coli* um dos principais representantes. A *Escherichia coli* é uma importante bactéria indicadora de contaminação fecal nos alimentos, por fazer parte da microbiota normal do intestino dos seres humanos e dos animais de sangue quente. A contaminação dos alimentos por esta bactéria pode causar diarreia ou síndromes disentéricas, conforme os patótipos dos agentes etiológicos infectantes (FRANCO e LANDGRANF, 2008; FRANCO, 2012).

Franco (2012) destaca que a contagem de *Enterococcus* spp. é significativa como indicadora das condições higiênicas no preparo e manipulação de alimentos, particularmente em alimentos refrigerados ou congelados, pasteurizados, ou submetidos a outros tratamentos capazes de destruir ou injuriar os indicadores mais sensíveis, caso de coliformes termotolerantes.

Mantilla et al. (2007) relatam que os microrganismos do gênero *Enterococcus* apresentam grande importância em segurança alimentar, uma vez que podem determinar o aparecimento de aminas biogênicas, dentre elas a histamina podendo ocasionar intoxicação alimentar aos consumidores. Sua enumeração torna-se necessária pela natureza das amostras (salsichas em refrigeração), pois esses microrganismos podem permanecer viáveis em temperatura de refrigeração. Mossel et al. (1973) já destacavam que um ponto de crítica frequente é o uso de *Enterobacteriaceae* como organismo indicador, porém nos mais adequados testes nem sempre permite garantir a sanidade do alimento em exame. Franco (2012) relata que para recurso desta deficiência, existe a recomendação do uso de microrganismos indicadores mais resistentes e os *Streptococcus* do grupo D de Lancefield (*Enterococcus*) são as bactérias mais adequadas desta classe. O autor ainda expõe este gênero como

indicador de contaminação fecal dos alimentos oferece restrições, porque, a exemplo dos coliformes, os estreptococos são encontrados em outros “habitats” que não o trato gastrointestinal de mamíferos e evidenciam maior persistência e sobrevivência no solo, vegetais e alimentos. São mais resistentes à desidratação, ação de desinfetantes e às flutuações de temperatura, comparativamente às enterobactérias patogênicas. Apesar das restrições, sua presença em números elevados em alimentos indica práticas sanitárias inadequadas ou exposição do alimento às condições que permitam a multiplicação de microrganismos indesejáveis (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

Este trabalho teve como objetivo a investigação de *Estafilococos* coagulase positiva, *Escherichia coli* e *Enterococcus* ssp. como possíveis agentes patogênicos contaminantes presentes em salsicha. Essa investigação teve a finalidade de monitorar a qualidade dos produtos oferecidos para consumo, bem como, obter informações que permitem avaliá-lo quanto às condições de armazenamento e distribuição para o consumo, além de traçar um perfil de sensibilidade a antibióticos de uso farmacêutico e quanto ao risco à saúde da população.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

O objeto do estudo foi constituído de amostras de salsicha de forma embalada no estabelecimento e à granel adquiridas no comércio formal – supermercados e padarias dos bairros Jardim Icaraí e Icaraí no município de Niterói (RJ).

### 2.1 Obtenção das amostras

Foram visitados oito estabelecimentos comerciais (supermercados e padarias) nos bairros Jardim Icaraí e Icaraí, da cidade de Niterói-RJ, e adquiridas 36 amostras de salsichas de diferentes marcas pela compra direta nos diferentes estabelecimentos – supermercados e padarias. As amostras foram adquiridas simulando uma situação real de compra pelo consumidor. Dessas amostras, 12 haviam sido previamente embaladas no estabelecimento e de escolha aleatória nas gôndolas de exposição à venda e 24 amostras adquiridas à granel que foram escolhidos aleatoriamente pelo responsável do setor no estabelecimento. As amostras foram acondicionadas, após a compra, nas embalagens fornecidas pelos estabelecimentos e encaminhadas diretamente ao Laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense-UFF onde foram realizadas as análises.

### 2.2 Preparo da amostra

O preparo da amostra teve início com a pesagem de  $25 \pm 0,2$  gramas de amostra, transferida para 225 mL de solução salina peptonada 0,1% e imediatamente procedeu-se a homogeneização em *Stomacher* por 60 segundos.

## 2.3 Análises Microbiológicas

As análises foram realizadas através da técnica de semeadura em superfície, sendo as amostras semeadas em ágar EMB (*Eosin Methylene Blue*) para a pesquisa de *Escherichia coli* e ágar BP (Baird-Parker) para pesquisa de Estafilococos. As bactérias crescidas em ágar Baird-Parker sugestivas de *Staphylococcus* spp. e as sugestivas de *E. coli* em ágar Eosina Azul de Metileno, respectivamente, foram transferidas para caldo BHI e incubadas a 36°C por 48 horas.

Para a Identificação de *Enterococcus* spp. foram semeados 1mL da solução salina peptonada 0,1% inicial (diluição 10<sup>-1</sup>) em tubo contendo 10mL do meio “Chromocult Enterococci broth”. A incubação ocorreu a 35-37°C durante 24h a 48h até obter-se a mudança de coloração do tubo para verde azulado.

Os tubos que apresentaram cor verde azulada, indicaram a presença de *Enterococcus* spp. e a partir deste resultado positivo foi encaminhado para a realização do teste de sensibilidade.

Após o crescimento em caldo BHI, foi realizado o teste de coagulase para pesquisa de *S. aureus* (Estafilococos coagulase positiva) e as provas bioquímicas IMViC (Indol, Vermelho de Metila e Citrato de Simmons) para identificação de *E. coli*. Havendo confirmação para o microrganismo pesquisado, seguiu-se para o teste antimicrobiano pela técnica de difusão em disco, em ágar Mueller-Hinton, com os seguintes antibióticos para *Staphylococcus* spp: Penicilina G, Cloranfenicol, Cefalexina, Eritromicina, Ampicilina e Rifampicina; para *Escherichia coli*: Amoxicilina, Polimixina B, Nitrofurantoína, Ciprofloxacina, Gentamicina e Amicacina e para *Enterococcus* spp: Clornfenicol, Nitrofurantoína, Eritromicina, Ciprofloxacina, Ampicilina, Rifampicina e Vancomicina.

A metodologia de leitura foi realizada medindo os halos de inibição formados ao redor dos discos, medidos com paquímetro após 24h de incubação a 37°C. O teste de susceptibilidade a antimicrobianos foi realizado segundo a técnica de disco-difusão em ágar, preconizado pelo CLSI (2011).

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 36 amostras coletadas, 16 (44,5%) delas apresentaram resultado negativos para a presença dos microrganismos pesquisados. Entretanto, três (8,4%) apresentaram Estafilococos coagulase positiva. Os resultados obtidos com relação a presença de *E. coli* foram cinco (13,9%). Os resultados relacionados com a identificação de *Enterococcus* spp foram de 16 (44,5%) amostras positivas. Peixoto et al. (2009) relatam que coliformes termotolerantes são indicadores de más condições higiênico-sanitárias dos alimentos e dos locais de preparação e/ou armazenamento, e são problemas frequentes na manipulação de alimentos preparados e manipulados. A presença de *Enterococcus* spp. está de acordo com o relatado por Mantilla et

al. (2007) ao relacionar amostras de carne bovina (acém) também com problemas relacionados com a higiene e manipulação adquiridas em estabelecimento comercial (supermercados e açougues). Talon et al. (2007) descrevem em sua pesquisa com embutidos que todas as amostras apresentavam contaminação ambiental por microrganismos deteriorantes mesmo após processo de limpeza e desinfecção, e que foi encontrado, entre outros microrganismos, *Staphylococcus aureus* (6,1%). Lebert et al. (2007) observam e destacam a importância das boas práticas de fabricação e cuidados com a higiene dos manipuladores e ambiente.

Com relação ao teste de sensibilidade das cepas isoladas foram obtidos os seguintes resultados: das cepas de *Staphylococcus* spp, 33,4% apresentaram resistência para Eritromicina, 33,4% para Ampicilina e 66,7% para Penicilina G; das cepas de *Escherichia coli*, 20% apresentaram resistência para Amoxicilina, Amicacina, Ciprofloxacina e Nitrofurantoína e 40% apresentaram resistência para Gentamicina e das cepas de *Enterococcus* spp isoladas, 25% apresentaram resistência para Rifampicina, 50% apresentaram resistência para Eritromicina e 6,25% apresentaram resistência para Vancomicina. Este resultado também foi relatado por Furlaneto-Maia et al. (2014) que também detectaram isolados de *Enterococcus* multirresistentes, a partir de amostras de alimentos, sendo resistente à Vancomicina e outros a antibióticos de importância clínica.

Fracalanza et al (2007) e Rizzotti et al (2009) descrevem que, assim como para microrganismos mais patogênicos, a resistência a antimicrobianos associados com os alimentos indica que há forte evidencia epidemiológica de um *link* entre o uso de antimicrobianos na medicina humana e na produção animal com o surgimento, disseminação e persistência de cepas resistentes em produtos de origem animal.

Melo (2010) relata que o aparecimento de cepas de *E. coli*, de origens variadas, multirresistentes aos antibióticos foi relatado em diversos países e constitui uma séria preocupação para a saúde pública, pois dificulta ou mesmo inviabiliza o tratamento de doenças causadas por estas cepas resistentes. Bandeira et al. (2014) descrevem a resistência de 100% das cepas de *Staphylococcus* spp. em alimentos a Ampicilina e Penicilina G. Os autores ainda relatam que, com relação aos antimicrobianos Amicacina, Cefalexina, Gentamicina e Oxacilina houve resistência em 8%, 8%, 13% e 87% das cepas, respectivamente. E destacam que a elevada incidência de *Staphylococcus* spp. resistentes aos antimicrobianos testados é preocupante, pois trata-se de bactérias de origem alimentar.

#### 4 | CONCLUSÕES

Representando um importante risco potencial para a saúde pública e podendo dificultar o tratamento de doenças humanas e de animais, o *Staphylococcus* spp. e *Escherichia coli* são consideradas bactérias de origem alimentar de elevada incidência

e a resistência aos antimicrobianos testados é preocupante.

Com os resultados obtidos, a presença das bactérias *E. coli*, estafilococos coagulase positiva e do gênero *Enterococcus* em alimentos de origem animal os tornam potenciais veículos desses patógenos para o homem. Os resultados obtidos demonstram a relevância destes estudos a fim de garantir a segurança alimentar.

Através dos resultados obtidos, foi observado que os estabelecimentos devem investir na aplicação adequada de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e treinamento dos manipuladores durante a manipulação, conservação e embalagem dos produtos, uma vez que, dos oito estabelecimentos apenas três obtiveram resultados satisfatórios das salsichas adquiridas para análise.

## REFERÊNCIAS

ANDRÉ, M. C. D. P. B.; SANTOS, P. P.; CAMPOS, M. R. H.; BORGES, L. J.; SERAFINI, A. B. (2006) **Utilização do Antibiograma como Ferramenta de Tipagem Fenotípica de *Staphylococcus aureus***. Braz. J. vet. Res. anim. Sci. v. 43, suplemento, p. 102-108.

BANDEIRA, M. G. L.; SANTOS, A. S.; ABRANTES, M. R.; REBOUÇAS, G. G.; SILVA, M. E. T.; PAIVA, W. S.; MAIA, M. O.; LIMA, L. S. C. I. (2014) **Perfil de Sensibilidade de *Staphylococcus spp.* Isolados de Alimentos A Antibióticos de Uso Farmacêutico**. In: Anais do 12º Congresso Latinoamericano de Microbiologia e Higiene de Alimentos - MICROAL 2014, São Paulo.

CLSI-CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**; (2011). Twenty-First Informational Supplement Approved standard M100-S21, 31.

FRACALANZZA, S. A.P. (2007) **Antimicrobial resistance profiles of enterococci isolated from poultry meat and pasteurized milk in Rio de Janeiro, Brazil**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 12, n. 7, p. 853-859.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. (2008). **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu.

FRANCO, R.M. (2012) **Agentes etiológicos de doenças alimentares**. Niterói: Editora da UFF.

FURLANETO-MAIA, L., ROCHA, K.R., HENRIQUE, F.C., GIAZZI, A., FURLANETO, M.C. (2014) **Antimicrobial resistance in *Enterococcus sp* isolated from soft chesse in Southern Brazil**, Advances in Microbiology. v.4, 175-181.

JAY, J. M. (2005) **Intoxicação Alimentar causada por Bactérias Esporuladas Gram positivas**. In: Microbiologia de Alimentos. 6ª ed. (cap.24, p.491-542). Porto Alegre: Artimed.

LEBERT, I., LEROY, S.; GIAMMARINARO, P.; LEBERT, A., CHACORNARC, J. P.; BOVER-CID, S., VIDAL-CAROU, M. C., TALON, R. (2007) **Diversity of microorganisms in the environment and dry fermented sausages of small traditional French processing units**. Meat Science. v. 76, p. 112-122.

MANTILLA, S. P. S; GOUVEA, R.; FRANCO, R. M.; MANO, S. B. (2007) **Enterococcus em corte de carne bovina: Enumeração, identificação bioquímica e análises físico-químicas**. Higiene Alimentar, v. 21, p. 67-72.

MARTINS, S. C. S.; MARTINS, C. M.; ALBUQUERQUE, L. M. B.; FONTELES, T. V.; REGO, S. L.; JUNIOR, G. S. F.; B. CEPPA. (2009) **Perfil de resistência de cepas de *Staphylococcus coagulase positiva* isoladas de manipuladores de alimentos.**, Curitiba, v. 27, n. 1, p. 43-52.

MARTINS, W.F., RODRIGUES, M.S.A; PEREIRA, K.D.; ALMEIDA, M.C.B.M; BEZERRA, R.R.A.; ARAUJO, A.S. (2010) **Avaliação microbiológica de queijos tipo manteiga fabricados artesanalmente no município de Pombal - PB**. IV Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite, Florianópolis-SC.

MELO, D. B. (2010) **Padrão clonal e perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de cepas de Escherichia coli isoladas de alimentos e de espécimes clínicas**. (Dissertação de mestrado). Universidade Federal da Bahia, Salvador.

MOSSEL, D. A. A.; HARREWIJN, G. A.; VANSPRANG, F. J. (1973) In: **The Microbiological Safety of Food**. Academic Press, Londres, 77-88.

PEIXOTO, D.; WECKWEH, P. H.; SIMIONATO, E. M. R. S. (2009) **Avaliação da qualidade microbiológica de produtos de confeitaria comercializados na cidade de Ribeirão Preto/SP**. Alim. Nutr., Araraquara v.20, n.4, p. 611-615.

RIZZOTTI, L. (2009) **Molecular diversity and transferability of the tetracycline resistance gene tet (M), carried on Tn916-1545 family transposons, in enterococci from total food chain**. Antonie van Leeuwenhoek v.96, p.43-52.

SILVA JUNIOR, E.A. (2005) **Manual de controle higiênico sanitário em alimentos**. 5, ed. São Paulo: Varela.

TALON, R.; LEBERT, A.; LEROY, S.; GARRIGA, M.; AYMERRICH, T.; DROSINOS, E.; ZANARDI, E.; IANIERI, A.; FRAQUEZA, M.; PATARATA, L.; LAUKOVA, A. (2007) **Traditional dry fermented sausages produced in small-scale processing units in Mediterranean countries and Slovakia. 1: Microbial ecosystems of processing environments**. Meat Science. (v. 77, p. 570-579).

VIEIRA, R.H.S.F. (2003) **Microbiologia higiene e qualidade do pescado: teoria e prática**. São Paulo: Varela.

## POTENCIAL PRODUÇÃO DE BIOMATERIAL PELA CIANOACTÉRIA AMAZÔNICA *Tolypothrix* sp. CACIAM 22

### **Diana Gomes Gradíssimo**

Laboratório de Biotecnologia de Enzimas e Biotransformações, Instituto de Ciências Biológicas, UFPA  
Belém - Pará

### **Murilo Moraes Mourão**

Laboratório de Biotecnologia de Enzimas e Biotransformações, Instituto de Ciências Biológicas, UFPA  
Belém - Pará

### **Samuel Cavalcante do Amaral**

Laboratório de Biotecnologia de Enzimas e Biotransformações, Instituto de Ciências Biológicas, UFPA  
Belém - Pará

### **Alex Ranieri Jerônimo Lima**

Laboratório de Tecnologia Biomolecular, Instituto de Ciências Biológicas, UFPA  
Belém – Pará

### **Evonnildo Costa Gonçalves**

Laboratório de Tecnologia Biomolecular, Instituto de Ciências Biológicas, UFPA  
Belém - Pará

### **Luciana Pereira Xavier**

Laboratório de Biotecnologia de Enzimas e Biotransformações, Instituto de Ciências Biológicas, UFPA  
Belém - Pará

### **Agenor Valadares Santos**

Laboratório de Biotecnologia de Enzimas e Biotransformações, Instituto de Ciências Biológicas, UFPA  
Belém - Pará

**RESUMO:** Os polihidroxicanoatos (PHAs) são lipídios estocados nas células de alguns organismos como reserva energética. São bioplásticos termoestáveis e elastômeros, que apresentam propriedades físicas semelhantes à de plásticos como polietileno e polipropileno. Este polímero biodegradável é produzido por cianobactérias fotossintetizantes com uso reduzido de substrato, diminuindo os custos de produção. A aplicação de PHAs na área médica já vem sendo desenvolvida, carecendo ainda de maiores estudos a fim de aliar a degradação do polímero in vivo, com o tempo de recuperação e a biocompatibilidade. São uma atraente alternativa aos plásticos petroquímicos e importante foco de pesquisa na busca por biomateriais sustentáveis. O cultivo se deu em meio BG-11 e BG-11 modificado, com gradiente de concentração de fosfato. Observou-se maior produção e biopolímero na cultura controle, utilizando BG-11 com 0,04 g/L de fosfato dipotássico, o que resultou em acúmulo médio de PHA de  $30,55 \pm 2,57$  g/L. Dos quatro tratamentos testados apenas a privação total do nutriente resultou em variação significativa, acumulando apenas  $8,53 \pm 0,75$  g/L de PHA. O estresse provocado pela privação nutricional pode ter prejudicado o crescimento da cianobactéria, não se mostrando interessante para a maior produção de biopolímero. As condições de cultivo serão otimizadas visando

maior produtividade e o bioplástico será posteriormente caracterizado para aplicação como biomaterial.

**PALAVRAS-CHAVE:** Bioplástico, Biopolímero, Polihidroxicanoato, Cianobactéria, Amazônia

**ABSTRACT:** Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are lipids stored in the cells of some organisms as energy reserves. They are thermostable and elastomer bioplastics, which have similar physical properties to plastics such as polyethylene and polypropylene. This biodegradable polymer is produced by photosynthetic cyanobacteria with minimal substrate use, reducing production costs. The application of PHAs in the medical field has already been developed, requiring further studies to ally the degradation of the polymer in vivo, with recovery time and biocompatibility. They are an attractive alternative to petrochemical plastics and an important research focus in the search for sustainable biomaterials. Cultivation was done on modified BG-11 and BG-11 medium, with phosphate concentration gradient. It was observed higher production and biopolymer in the control culture, using BG-11 with 0.04 g / L of dipotassium phosphate, which resulted in a mean PHA accumulation of  $30.55 \pm 2.57$  g / L. Out of the four treatments tested only total nutrient deprivation resulted in significant variation accumulating with  $8.53 \pm 0.75$  g / L of PHA. Stress caused by nutritional deprivation may have decreased the growth of the cyanobacteria, not proving to be advantageous for the higher biopolymer production. The culture conditions will be optimized for higher productivity and the bioplastic will be further characterized for application as biomaterial.

**KEYWORDS:** Bioplastic, Biopolymer, Polyhydroxyalkanoate, Cyanobacteria, Amazon

## 1 | INTRODUÇÃO

As cianobactérias são um dos organismos mais antigos de nosso planeta (OLSON, 2006), de grande importância evolutiva, sendo responsáveis pela oxigenação da atmosfera terrestre e desenvolvendo um papel importante no ciclo do carbono e nitrogênio na terra (KASTING, 2001, KASTING; SIEFERT, 2002). Além disso, originaram os cloroplastos, que foram transferidos horizontalmente a outras linhagens (CAVALIER-SMITH, 2002). Fisiologicamente, são microrganismos fotossintetizantes e muitas espécies podem ainda se manter em ambientes sem oxigênio, sendo comum em várias espécies de bactérias (STAL, 1995). Apresentam alta capacidade adaptativa, sobrevivendo em ambientes com temperaturas, salinidade, pH e níveis de radiação solar extremos (WATERBURY *et. al.*, 1986, STAL, 1995, THAJUDDIN; SUBRAMANIAN, 2005). O metabolismo das cianobactérias se adapta a estas condições hostis através da produção de uma série de compostos bioativos de potencial biotecnológico, e tais metabólitos possuem uma gama de aplicações em diversos setores.

Na indústria farmacêutica temos a potencial aplicação das cianotoxinas, já bem descritas na literatura com ação essencialmente tóxica em mamíferos (DAWSON,



1998; CODD et. al., 2005;). Como alternativa sustentável, pode-se fazer o uso de metabólitos de cianobactérias na produção de biocombustíveis, com grande potencial na síntese de gás hidrogênio (H<sub>2</sub>), e na fabricação de biodiesel a partir dos lipídios armazenados em suas células como possíveis substituintes dos combustíveis de origem fóssil (ARYAL et. al., 2012), e na substituição de materiais derivados de hidrocarbonetos como os polihidroxialcanoatos (PHA), um bioplástico produzido por cianobactérias, que têm ainda importante papel na medicina, podendo ser aplicado no carreamento de fármacos e confecção de próteses biocompatíveis ou *scaffolds* na engenharia tecidual (DOI, 1990, DOI 1992).

Os polihidroxialcanoatos (PHAs) e polihidroxibutiratos (PHBs) são exemplos de lipídios neutros estocados nas células de cianobactérias e outros organismos como reserva energética e fonte de carbono. São bioplásticos termoestáveis e elastômeros que apresentam propriedades físicas semelhantes aos plásticos de origem fóssil como polietileno e o polipropileno (DOI, 1990). São produzidos a partir da fermentação de açúcares, lipídios, alcanos, alcenos e ácidos alcanóicos e armazenados como reserva energética destes microrganismos, sendo acumulados em grânulos citoplasmáticos (REEDY, MOHAN, 2015).

A síntese destes lipídios, especialmente de PHB, o biopolímero mais encontrado em cianobactérias, já é bem descrita em arqueias e bactérias como no bacilo de água doce, o *Cupriavidus metalliduran*. Estes grânulos são resultantes do processo metabólito cíclico, tendo como precursor a enzima acetil coenzima A. O processo ocorre em três reações enzimáticas que são mediadas, respectivamente, pela enzima 3-cetotiolase, que catalisa a condensação reversível de duas moléculas de acetil-CoA, cujo o intermediário gerado é reduzido por ação de uma redutase de acetil-CoA ligada ao NADPH, resultando em D(-)-3- hidroxibutiril-CoA, o qual é então, polimerizado por ação da PHA polimerase, gerando o biopolímero poli(3-hidroxibutirato) (PHB). Estas três enzimas são codificadas pelos genes *phaA*, *phaB*, *phaC* e *phaE*, sendo os dois últimos envolvidos na codificação da PHA sintase, atuando no último passo da biossíntese (HEIN et al., 1998, MATSUSAKI et al., 1998).

Já são descritos na literatura copolímeros de PHB contendo cadeias carbônicas de 3 a 14 átomos, cuja a produção se dá em microrganismos pelo uso de substratos como álcoois, açúcares e alcanos. Sendo assim, as diferentes estruturas químicas conferem aos polímeros propriedades físicas distintas, que podem ser mais adequadas a determinadas aplicações (DOI 1992). Quanto ao rendimento da produção destes biopolímeros por microrganismos, na cianobactéria *Synechocystis* sp. PCC6803 o acúmulo de lipídios neutros pode chegar até a 10% do peso seco da célula, sendo a média de cerca de 6% do peso seco (HEIN et al., 1998).

A linhagem *Tolypothrix* sp. CACIAM 22 possui genoma anotado o que permitiu a busca dos genes relacionados com a biossíntese de PHA. Uma análise preliminar de seu genoma revelou a presença de um gene de biossíntese de PHA em cianobactérias, o gene *phaF*.

A principal característica destes polímeros tão versáteis nas suas composições químicas e aplicações é a capacidade de serem degradados de forma natural. Sendo de origem biológica estes plásticos são biodegradáveis, sendo digeridos por PHA depolimerases. A degradação de biofilmes de PHA a 25°C em solo, lodo ou água marinha é de até 7  $\mu\text{m}$  por semana (DOI, 1992), sendo, portanto, uma atraente alternativa aos plásticos petroquímicos e um importante foco de pesquisa na busca por materiais termoplásticos sustentáveis.

Além do enfoque sustentável, outro aspecto importante que justifica a busca por biopolímeros em cianobactérias e microorganismos é a sua biocompatibilidade (KAEWBAI-NGAM *et al.*, 2016). Polihidroxicanoatos já vêm sendo utilizados na engenharia de materiais, principalmente como *scaffolds* para regeneração tecidual, seja utilizando PHA sozinho ou em blendas com plásticos sintéticos ou ainda associado a minerais como hidroxiapatita e exoesqueletos como a quitosana (ZHAO *et al.*, 2003).

A maioria dos estudos que tratam o uso de PHAs como biomateriais utiliza biopolímeros produzidos por bactérias heterotróficas (CHEN e WU, 2005). O potencial de produção de PHA por cianobactérias autotróficas possibilita uma grande vantagem de uma produção mais barata, já que estes microrganismos necessitam apenas de luz e gás carbônico como fonte de carbono para produzir os biopolímeros (DROGS *et al.*, 2015, ANSARI e FATMA, 2016). Além disso, a produção de bioplástico pode ser associado a outras indústrias, uma vez que as cianobactérias podem capturar o CO<sub>2</sub> emitido pelas usinas e indústrias, possibilitando uma produção com zero emissão de carbono (SAYRE, 2010).

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Cultivo

A linhagem *Tolypothrix* sp. CACIAM 22, pertencente à Coleção Amazônica de Cianobactérias e Microalgas (CACIAM), foi coletada no Lago Bolonha (Fig. 1), 1°25'00"S, 48°25'58"W, situado dentro do Parque Ambiental do Utinga, uma área de Proteção Ambiental (APA) da região metropolitana de Belém-PA. O Lago Bolonha tem capacidade de armazenamento de 2.000.000 m<sup>3</sup> de água, sendo utilizado como reservatório para abastecimento de água de consumo para a região metropolitana (SECTAM, 1992).



Figura 1. Mapa do Parque Estadual do Utinga e localização do ponto de coleta da CACIAM 22 no Lago Bolonha (Fonte: Google Maps, 2018, Adaptado).

A CACIAM 22 foi identificada por análise morfológica e molecular, através de 16S rRNA, como sendo do gênero *Tolypothrix* (Figura 2), uma cianobactéria filamentosa da ordem *Nostocales*.



Figura 2. *Tolypothrix* sp. CACIAM 22 em microscópio óptico, aumento de 100x e escala de 5 µm (Fonte: Acervo CACIAM, LTB, UFPA).

O cultivo se deu em frascos erlenmeyer de 250 mL, utilizando-se meio de cultivo líquido BG-11 (ALLEN, 1968) – com 0,04 g/L de fosfato -, com fotoperíodo de 14/10 horas claro/escuro, à temperatura de 27 °C (ARYAL *et al.*, 2012), em câmara de germinação BOD (CT-718, CIENTEC). As condições de cultivo foram modificadas, utilizando-se um gradiente de concentração de fosfato, promovendo-se o estresse nutricional pela privação de fosfato dipotássio e sua suplementação em excesso. Foram testadas quatro concentrações deste nutriente, entre 0, 0,2, 0,04 e 0,24 g/L.

## 2.2 Curva de Crescimento

A curva de crescimento da CACIAM 22, em meio de cultivo BG-11 padrão, foi mensurada através da quantificação de clorofila, extraído-se a mesma com metanol, e fazendo-se a leitura em espectrofotômetro a 665 nm, multiplicando-se o resultado

pelo coeficiente do metanol, 12,7 (MEEKS & CASTENHOLZ, 1971).

## 2.3 Extração de Polihidroxialcanoato

Seguindo-se as adaptações propostas por Getachew & Woldesenbet (2016) do protocolo de Slepecky & Law (1960), o PHA foi extraído de 60 mL de cada cultura bacteriana utilizando-se clorofórmio.

Primeiramente retirou-se o meio de cultivo, centrifugando-se as amostras a 5000 RPM por 20 minutos. Ao *pellet* obtido foram adicionados 5 mL de hipoclorito (5%), deixando-se as amostras incubadas a 30°C por 2 horas. Após nova centrifugação a 5000 RPM por 15 minutos, o concentrado foi dissolvido em 5 mL de clorofórmio (PA) à 60°C utilizando vórtex, sendo novamente centrifugado por 10 minutos.

A fase clorofórmica foi transferida para tubos de ensaio de vidro previamente pesados, lavados com etanol e clorofórmio para remover traços de plásticos. As amostras de PHA/Clorofórmio foram mantidas em evaporador com sílica *overnight* para evaporação do clorofórmio, restando apenas o PHA, sendo o mesmo pesado em balança analítica.

## 2.4 Quantificação de Polihidroxialcanoato (PHA)

A produção de PHA pela CACIAM 22 em diferentes concentrações de fosfato, foi quantificada através em espectrofotômetro utilizando-se como padrão ácido crotônico comercial. Após a evaporação do clorofórmio, o PHA foi convertido a ácido crotônico através de reação com ácido sulfúrico (98%), adicionando-se às amostras de PHA 5 mL de ácido, mantendo-se os tubos em banho-maria à 100°C para a reação. A amostras em triplicata foram, então, lidas em espectrofotômetro (Ultraspec 5300 Pro, Amersham) no comprimento de onda de 235 nm, utilizando-se ácido sulfúrico como branco.

A quantidade de ácido crotônico foi calculada com base em uma curva padrão com concentrações conhecidas de ácido crotônico comercial, tendo-se a quantidade de PHA em g/L pelo produto da concentração de ácido crotônico pelo coeficiente de extinção molar do mesmo de valor  $1,55 \times 10^4$  (SPLECKY & LAW, 1960).

## 2.5 Análise Estatística

A produção de biopolímero nas diferentes condições de cultivo foi analisada por ANOVA e Kruskal Wallis, para uma dispersão não paramétrica, utilizando o software GraphPad Prism versão 6.01, considerando-se significativos resultados para  $p < 0.05$ .

# 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 3.1 Curva de Crescimento da *Tolypothrix* sp. CACIAM 22

O crescimento da linhagem foi mensurado a partir da concentração de clorofila

na amostra (Fig. 3). Acompanhou-se o crescimento até o 27º dia, quando a mesma passou a estar na fase estacionária.

A fase exponencial da cultura ocorreu entre o 5º e 17º dia de cultivo, havendo uma queda na concentração de clorofila ao 15º dia. Este declínio e posterior crescimento podem indicar a adaptação da cianobactéria ao estímulo nutricional do meio de cultivo ou ainda a metabólitos por ela produzidos que podem interferir como por exemplo o pH do meio (FOGG, 1978, WATERBURY *et. al.*, 1986).

### Curva de Crescimento *Tolypothrix* sp. CACIAM 22

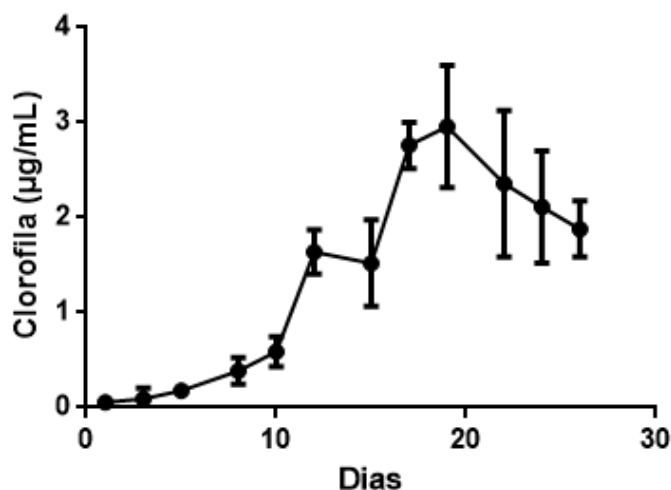


Figura 3. Curva de Crescimento da *Tolypothrix* sp. CACIAM 22, em função da concentração de clorofila, em µg/mL, pelo tempo em dias.

Em comparação ao crescimento de outras linhagens do mesmo gênero, a *Tolypothrix* sp. CACIAM 22 apresentou crescimento mais rápido que cepas *Tolypothrix* sp. PBGA1 e *Tolypothrix* sp. PBGA2, cujo trabalho de Thangave e colaboradores (2018), foi observada uma maior fase de adaptação em seus cultivos, levando oito dias para atingir a fase *log*. A adaptação mais rápida da CACIAM 22 pode ser justificada pela qualidade do inóculo inicial, já que um inóculo retirado de um cultivo em fase *log* garante melhor adaptação ao meio de cultivo (FOGG, 1978).

As culturas utilizadas neste estudo foram mantidas por dois meses para posterior extração do PHA, uma vez que há indícios de maior acúmulo de lipídios por cianobactérias na fase estacionária, além de maior produção e biomassa para os ensaios (MODIRI *et. al.*, 2015).

### 3.2 Quantificação de Polihidroxicanoato (PHA)

A produção e acumulação de bioplástico nas diferentes concentrações de fosfato dipotássico foi medida por espectrofotometria usando o comprimento de onda referente ao ácido crotônico após a conversão do PHA extraído neste ácido. Através da regressão linear da curva padrão de ácido crotônico com oito concentrações e  $R^2$  de 0,9889, obteve-se a concentração de polihidroxicanoato para o gradiente de

concentração de fosfato (Fig. 4).

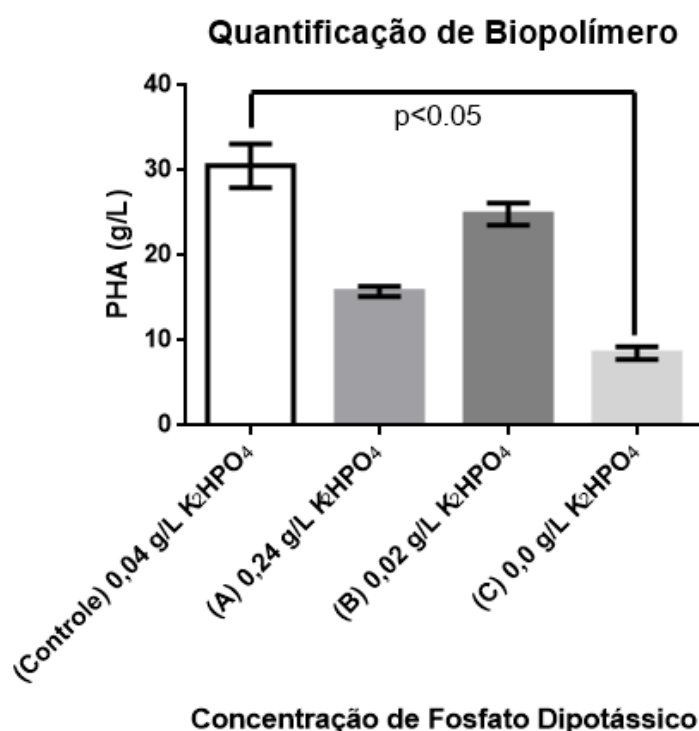


Figura 4. Quantificação de Biopolímero em quatro diferentes concentrações de fosfato dipotássico, em função da concentração de polihidroxialcanoato, em g/L.

A maior produção de PHA foi verificada na condição controle, onde foi utilizado meio de cultivo BG-11 sem alterações na concentração de fosfato dipotássico, com 0,04 g/L do nutriente. Nesta condição foram obtidas  $30,55 \pm 2,57$  g/L de PHA. O tratamento com indução de fosfato, utilizando seis vezes mais nutriente do que no meio padrão, resultou numa produção de  $15,75 \pm 0,58$  g/L, e o meio de cultivo com metade da concentração de fosfato, ou seja, com 0,02 g/L de fosfato, apresentou quantificação de  $24,86 \pm 1,32$  g/L. A análise estatística aplicada, ANOVA univariada, apontou variação entre os tratamentos, no entanto a análise não paramétrica, Kruskal Wallis, utilizada por conta do baixo valor de P value retornado pela ANOVA ( $P < 0,0001$ ), apontou significância apenas para o tratamento (C) com privação de fosfato dipotássico. Nesta condição com privação obteve-se concentração de apenas  $8,53 \pm 0,75$  g/L de PHA.

Na melhor condição testada, em cultivo com BG-11 padrão, a CACIAM 22 apresentou cerca de 3% de produção de PHA em relação a cultura total, o que está de acordo com a produção encontrada por Ansari e Fatma (2016) no mesmo gênero, com produção de 3,15% de PHB em cultivo de *Tolypothrix tenuis* em meio BG-11. A concentração de bioplástico encontrada no presente trabalho foi maior do que o que verificado por Bhanti e colaboradores (2012) com produção máxima de 2,2% de PHB em *Tolypothrix* sp. ao 35º dia de cultivo.

O teste com excesso de fosfato visa mimetizar as condições ambientais que propiciam a floração de cianobactérias, já que o excesso de nutrientes orgânicos em ambientes aquáticos, seja por ação antropogênica ou natural, está diretamente

relacionado a este acúmulo de biomassa (PAERL e OTTEN, 2013).

No entanto, em condições laboratoriais, o excesso de fósforo, na forma de fosfato dipotássico parece interferir negativamente no crescimento celular, representado por uma menor produção e biomassa. Em trabalho de Feng e colaboradores (2012), *Chlorella zofingiensis*, uma microalga eucariótica, apresentou concentrações acima de 0,04 g/L, em meio BG-11 padrão, que resultou em menor biomassa, havendo maior crescimento em meio com apenas 0,01 g/L de fosfato dipotássico. A produção de lipídios também foi beneficiada pela privação de fosfato em comparação com concentrações superiores a 0,04 g/L deste nutriente no meio.

Encontrou-se na literatura indícios de que a privação de fosfato age como estresse direcionando o metabolismo das cianobactérias para uma maior produção e acúmulo de PHA, como verificado por exemplo na maior produção de PHA por *Nostoc muscorum* NCCU- 442, sendo esta cianobactéria filamentosa pertencente a mesma ordem da *Tolypothrix* sp., como Nostocales. Logo, foi detectada uma produção de 15% de PHB em relação à cultura total, no meio com privação de fosfato, contra 4,9% de PHB em BG-11 (ANSARI e FATMA, 2016).

Uma justificativa para a maior produção de polímero frente a este estresse nutricional está no fluxo não-cíclico de elétrons fotossintéticos, que acumulam NADPH pela redução de NADP que se mantêm apesar da queda na produção e ATP proporcionada pela escassez de fósforo. Este acúmulo de NADPH é então utilizado pelo metabolismo da cianobactéria para a produção de PHB (BOTTOMLEY e STEWART, 1976). O acúmulo de PHB é também explicado pela alta concentração de NADP E NADPH, uma vez que estes são inibidores de citrato sintase, interferindo negativamente no ciclo do ácido cítrico, levado a um maior acúmulo de lipídios pela célula (KESSLER e WITHOLT, 2001).

Apesar das alterações provocadas pelo estresse nutricional tendem a direcionar o metabolismo para a produção de lipídios e de PHA, neste trabalho encontrou-se a menor quantidade de PHA no meio com 0,0 g/L de fosfato dipotássio dentre as condições testadas. Isto pode se justificar no tempo prolongado de cultivo, uma vez que o esgotamento dos nutrientes provocados por uma privação prolongada, pode interferir com processos biológicos importantes como síntese de ácido nucléicos e síntese proteica (ANSARI e FATMA, 2016), prejudicando o crescimento saudável da célula, e, como consequência, limitando a produção de metabólitos de interesse.

Outra justificativa está na privação do nutriente potássio, que no tratamento (C) estava também na concentração de 0,0 g/L. Ainda que sais de potássio apresentem certa toxicidade para cianobactérias, sendo propostos inclusive como solução a florações destas microalgas (PARKER et al., 1997), quantidades pequenas de potássio são necessárias ao desenvolvimento celular, sendo interessante, em trabalhos posteriores, o cultivo com privação de fósforo, mantendo ainda o potássio e substituindo-se o fosfato dipotássico ( $K_2HPO_4$ ) do meio BG-11 por cloreto de potássio (KCl) (MONSHUPANEE e INCHAROENSAKDI, 2014).

## 4 | CONCLUSÕES

A linhagem de cianobactéria amazônica *Tolypothrix* sp. CACIAM 22 mostrou-se produtora de polihidroxialcanoatos, sendo um potencial alvo para produção de bioplástico. Das condições testadas verificou-se maior produção de PHA quando cultivada em meio BG-11 com 0,04 g/L de fosfato dipotássico, com produção de 3,05% de PHA, ou 30,05 g/L do polímero. As modificações no cultivo não resultaram em melhorias na produção do lipídio, sendo necessários posteriores cultivos e ensaios para otimização da cultura. O bioplástico extraído será posteriormente caracterizado e passará por ensaios de biocompatibilidade para aplicação como biomaterial.

## 5 | AGRADECIMENTOS

Ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Pará, ao Laboratório de Biotecnologia de Enzimas e Biotransformações e ao Laboratório de Tecnologia Biomolecular, e aos órgãos de fomento CNPq e CAPES.

## REFERÊNCIAS

- ALLEN, M. B. **Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates.** Journal of Phycology, v.4, p. 1-4, 1968.
- ANDERSON, A. J., DAWES, E. A. **Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates.** Microbiology Review, n. 54, p. 450–472, 1990.
- ANSARI, S.; FATMA, T. **Cyanobacterial Polyhydroxybutyrate (PHB): Screening, Optimization and Characterization.** PLOS ONE, v. 11, n. 6, p. e0158168, 2016.
- ARYAL, U. K.; CALLISTER, S. J.; MISHRA, S.; ZHANG, X.; SHUTTHANANDAN, J. I.; ANGEL, T. E.; SHUKDA, A. K.; MONROE, M. E.; MOORE, R. J.; KOPPENAAL, D. W.; SMITH, R. D.; SHERMAN, L. **Proteome analyses of strains ATCC 51142 e PCC 7822 of the diazotrophic Cyanobacterium Cyanothece sp. Under culture conditions resulting in enhanced H<sub>2</sub> Production.** Applied and Environmental Microbiology, p. 1070–1077. 2012.
- BHATI, R.; SAMANTARAY, S.; SHARMA, L. **Poly-β-hydroxybutyrate accumulation in cyanobacteria under photoautotrophy.** Biotechnology Journal, v. 5, n. 11, p. 1181–1185, 2010.
- BOTTOMLEY, P. J.; STEWART, W. D. **ATP pools and transientss in the blue-green alga, Anabaena cylindrica.** Archives of Microbiology, v. 108, n. 3, p. 249–258, 1976.
- CAVALIER-SMITH, T. **Chloroplast evolution: secondary symbiogenesis and multiple losses.** Current Biology, v. 12, n. 2, p. 62-64, 2002.
- CHATSUNGNOEN, T.; CHISTI, Y. **Optimization of oil extraction from Nannochloropsis salina biomass paste.** Algal Research, v. 15, p. 100–109, 2016.
- CHEN, G.; WU, Q.. **The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials.** Biomaterials, v. 26, n. 33, p. 6565–6578, 2005.



- CODD, G. A.; MORRISON, L. F.; METCALF, J. S. **Cyanobacterial toxins: risk management for health protection.** *Toxicology and Applied Pharmacology*, 203: 264–72. 2005.
- DAWSON, R. M. **The toxicology of microcystins.** *Toxicon*, 36: 953–62. 1998.
- DOI, Y. **Microbial Synthesis and Properties of Polyhydroxyalkanoates.** *MRS Bulletin*, p. 39-42, 1992.
- DROSG, B. **Photo-autotrophic Production of Polyhydroxyalkanoates in Cyanobacteria.** *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, v. 29, n. 2, p. 145–156, 2015.
- FENG, P.; DENG, Z.; FAN, L. **Lipid accumulation and growth characteristics of *Chlorella zofingiensis* under different nitrate and phosphate concentrations.** *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 114, n. 4, p. 405–410, 2012.
- FOGG, G. E. **Algal cultures and phytoplankton ecology.** 2d ed. Madison: University of Wisconsin Press, 1975.
- GETACHEW, A.; WOLDESENBET, F. **Production of biodegradable plastic by polyhydroxybutyrate (PHB) accumulating bacteria using low cost agricultural waste material.** *BMC Research Notes*, v. 9, n. 1, 2016.
- HEIN, S., TRAN, H., STEINBÜCHEL, A. ***Synechocystis* sp. PCC6803 possesses a two component polyhydroxyalkanoic acid synthase similar to that of anoxygenic purple sulfur bacteria.** *Archives of Microbiology*, n. 170, p. 162–170, 1998.
- KAEWBAI-NGAM, A.; INCHAROENSAKDI, A.; MONSHUPANEE, T. **Increased accumulation of polyhydroxybutyrate in divergent cyanobacteria under nutrient-deprived photoautotrophy: An efficient conversion of solar energy and carbon dioxide to polyhydroxybutyrate by *Calothrix scytonemica* TISTR 8095.** *Bioresource Technology*, v. 212, p. 342–347, 2016.
- KESSLER, B.; WITHOLT, B. **Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism.** *Journal of Biotechnology*, v. 86, n. 2, p. 97–104, 2001.
- KASTING, J. F. **Earth history. The rise of atmospheric oxygen.** *Science*, v. 293, p. 819-820, 2001.
- KASTING, J. F., SIEFERT, J. L. **Life and the evolution of Earth's atmosphere.** *Science*, v. 296, p. 1066-1068, 2002.
- KARR, D.B., WATERS, J. K., EMERICH, D. W. **Analysis of Poly-beta-Hydroxybutyrate in *Rhizobium japonicum* Bacteroids by Ion-Exclusion High-Pressure Liquid Chromatography and UV Detection.** *Applied Environmental Microbiology*, n. 46, p. 1339-1344, 1983.
- LAW, J. H.; SLEPECKY, R. A. **Assay of poly-beta-hydroxybutyric acid.** *Journal of Bacteriology*, v. 82, p. 33–36, 1961.
- MATSUSAKI, H., MANJI, S., TAGUCHI, K., KATO, M., FUKUI, T., DOI, Y. **Cloning and Molecular Analysis of the Poly(3-hydroxybutyrate) and Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoate) Biosynthesis Genes in *Pseudomonas* sp. Strain 61-3.** *Journal of Bacteriology*, n. 24, v. 108, p. 6459–6467, 1998.
- Meeks, J.C., Castenholz, R.W., **Growth and photosynthesis in an extreme thermophile, *Synechococcus lividus* (Cyanophyta).** *Archives Mikrobiologie*. 78, 25–41. 1971.
- MODIRI, S.; HAJFARAJOLLAH, H.; ZAHIRI, H. S. **Lipid production and mixotrophic growth features of cyanobacterial strains isolated from various aquatic sites.** *Microbiology*, v. 161, n. 3,

p. 662–673, 2015.

MONSHUPANEE, T.; INCHAROENSAKDI, A. **Enhanced accumulation of glycogen, lipids and polyhydroxybutyrate under optimal nutrients and light intensities in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803.** *Journal of Applied Microbiology*, v. 116, n. 4, p. 830–838, 2014.

PAERL, H. W.; OTTEN, T. G. **Harmful Cyanobacterial Blooms: Causes, Consequences, and Controls.** *Microbial Ecology*, v. 65, n. 4, p. 995–1010, 2013.

OLSON, J. M. **Photosynthesis in the Archean Era.** *Photosynthesis Research*, v. 88, p. 109–117, 2006.

REEDY, M. V., MOHAN, S. V. **Polyhydroxyalkanoates Production by Newly Isolated Bacteria *Serratia ureilytica* Using Volatile Fatty Acids as Substrate: Bio-Electro Kinetic Analysis.** *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, n 7, p. 026-032, 2015.

SANTOS, L. Q. **Bioprospecção De Polihidroxialcanoatos em cinco linhagens de Cianobactérias da Região Amazônica.** Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Pará, Belém, 2016.

SAYRE, R. **Microalgae: The Potential for Carbon Capture.** *BioScience*, v. 60, n. 9, p. 722–727, 2010.

SECTAM. **Parque Estadual do Utinga: estudo ambiental.** Belém: Secretaria de Estado de Ciência Tecnologia e Meio Ambiente. 107 p. 1992.

STAL, L. J. **Physiological ecology of cyanobacteria in microbial mats and other communities.** *New Phytology*, v. 31, p. 1–32. 1995.

SCHLEBUSCH, M.; FORCHHAMMER, K. **Requirement of the Nitrogen Starvation-Induced Protein SII0783 for Polyhydroxybutyrate Accumulation in *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803.** *Appl. Environ. Microbiol.* vol. 76, p. 6101-6107, 2010.

SPIEKERMANN, P.; REHM, B. H. A.; KALSCHUEER, R.; BAUMEISTER, D.; STEINBÜCHEL, A. **A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct Screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage Compounds.** *Archives of Microbiology*, v. 171, p. 73–80, 1999.

THAJUDDIN, N.; SUBRAMANIAN, G. **Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology.** *Current Science*, v. 89, p. 47–57. 2005.

THANGAVEL, K.; RADHA-KRISHNAN, P.; NAGAIAH, S. **Growth and metabolic characteristics of oleaginous microalgal isolates from Nilgiri biosphere Reserve of India.** *BMC Microbiology*, v. 18, n. 1, 2018. Disponível em: <<https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-017-1144-x>>. Acesso em: 17 jul. 2018.

VILLÉN, J., GYGI, S. P. **The SCX/IMAC enrichment approach for global phosphorylation analysis by mass spectrometry.** *Nature Protocols*, v. 3, n. 10, p. 1630 – 1638, 2008.

WATERBURY, J. B., WATSON, S. W., VALOIS, F. W., FRANKS, D. G. **Biological and ecological characterization of the marine unicellular cyanobacterium *Synechococcus*.** *Canadian Bulletin of Fisheries and Aquatic Sciences*, v. 214, p.71-120, 1986.

ZHAO, K.; DENG, Y.; CHUN CHEN, J. **Polyhydroxyalkanoate (PHA) scaffolds with good mechanical properties and biocompatibility.** *Biomaterials*, v. 24, n. 6, p. 1041–1045, 2003.

## PRODUÇÃO DE LIPASE POR *Yarrowia lipolytica* PARA APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

### Jully Lacerda Fraga

Universidade Federal do Rio de Janeiro –  
Departamento de Engenharia Bioquímica, Escola  
de Química – CEP: 21941-909 – Rio de Janeiro,  
RJ.

### Adejanildo da Silva Pereira

Universidade Federal do Rio de Janeiro –  
Departamento de Engenharia Bioquímica, Escola  
de Química – CEP: 21941-909 – Rio de Janeiro,  
RJ.

### Fabiane Ferreira dos Santos

Universidade Federal do Rio de Janeiro –  
Departamento de Engenharia Bioquímica, Escola  
de Química – CEP: 21941-909 – Rio de Janeiro,  
RJ.

### Kelly Alencar Silva

Universidade Federal Fluminense, Centro de  
Ciências Médicas, Faculdade de Farmácia. Rua  
Doutor Mário Viana 523, Santa Rosa, Niterói, RJ.

### Priscilla Filomena Fonseca Amaral

Universidade Federal do Rio de Janeiro –  
Departamento de Engenharia Bioquímica, Escola  
de Química – CEP: 21941-909 – Rio de Janeiro,  
RJ.

**RESUMO:** A produção de lipase utilizando microorganismos é um processo biotecnológico bem estabelecido sendo comumente realizada pelo processo fermentativo submerso. Entre muitas aplicações, as lipases microbianas podem ser utilizadas como aditivos em alimentos

para modificar e realçar as propriedades organolépticas, e têm sido utilizadas na indústria queijeira a fim de conferir melhoramento no sabor e odor de produtos lácteos. Outra questão de igual importância é a preocupação com o despejo inadequado de óleo de fritura residual nas redes de esgoto gerando prejuízos ambientais e socioeconômicos. Desta forma, este estudo também visa o uso adequado do óleo de fritura residual de uma rede de *fast food*, sendo utilizado como indutor no meio de cultivo para a produção de lipase. Sendo assim, nesse trabalho foi produzida lipase extracelular por *Yarrowia lipolytica* com pico de atividade enzimática em 24h (3039,4 U/L), para futura aplicação em produtos alimentícios.

**PALAVRAS-CHAVE:** lipase extracelular; *Yarrowia lipolytica*; óleo de fritura residual; atividade enzimática.

**ABSTRACT:** Lipase's production using microorganisms is a well established biotechnological process being commonly performed by the submerged fermentative process. Among many applications, microbial lipases can be used as food additives to modify and enhance organoleptic properties, and have been used in the cheese industry to confer improvement on the taste and odor of dairy products. Another issue of equal importance is the concern with the inadequate disposal of

residual frying oil in the sewerage system generating environmental and socioeconomic losses. Thus, this study also aims at the proper use of the residual frying oil of a fast food chain, being used as an inducer in the culture medium for the production of lipase. Thus, in this work, extracellular lipase was produced by *Yarrowia lipolytica* with a peak of enzymatic activity in 24h (3039.4 U / L), for future application in food products.

**KEYWORDS:** extracelular lipase; *Yarrowia lipolytica*; residual frying oil; enzymatic activity.

## 1 | INTRODUÇÃO

Micro-organismos, como fungos e bactérias, têm apresentado um grande potencial de produção de lipase (TREICHEL et al., 2010), que são hidrolases que catalisam a conversão de triacilgliceróis a ácidos graxos livres e glicerol. Além disso, possuem significativo potencial biotecnológico como catalisadores em reações de síntese orgânica em meio não aquoso utilizando processos simplificados com altos rendimentos (MESSIAS et al., 2011).

A espécie de levedura *Yarrowia lipolytica*, tem recebido grande destaque devido ao seu desempenho em processos fermentativos, sendo capaz de degradar substratos hidrofóbicos de uma forma muito eficiente, além de secretar proteínas de interesse industrial (RUIZ-HERRERA & SENTRANDEU, 2002, COELHO et al., 2010).

As lipases extracelulares já são extensivamente utilizadas industrialmente. Os ácidos graxos livres podem ser obtidos através da hidrólise enzimática parcial ou seletiva de óleos e gorduras conferindo sabor e aroma peculiares aos alimentos de acordo com o tamanho da cadeia carbônica e grau de insaturação. As lipases também têm sido empregadas na obtenção de ácidos graxos essenciais como o ácido linoléico e o ácido  $\alpha$ -linolênico, (MALCATA et al., 1990; CARVALHO et al., 2003).

Sendo assim, o objetivo deste estudo é produzir lipase extracelular utilizando a levedura *Yarrowia lipolytica* em cultivo contendo uma emulsão de óleo de fritura residual de uma rede de *fast food*, para futura aplicação em produtos alimentícios.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

**Materiais** – O óleo de fritura utilizado foi gentilmente cedido pela empresa Brazil Fast Food Corporation. Esse óleo é originário de óleo de algodão, sendo utilizado para fritar batatas na rede de fast food Bob's.

**Micro-organismo** - A levedura empregada foi a cepa selvagem de *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ 50682) selecionada de um estuário da Baía de Guanabara no Rio de Janeiro, Brasil (HAGLER e MENDONÇA-HAGLER, 1981). As células foram conservadas a 4°C após 24 horas de crescimento em tubos de ensaio com meio YPD (Yeast Extract, Peptone, Dextrose) contendo (em p/v): extrato de lêvedo 1%, peptona

2%, glicose 2% e Agar-agar 2% (AMARAL, 2007).

**Produção de lipase** – A partir dos tubos de ensaio com YPD contendo as células de *Yarrowia lipolytica* inoculou-se, de forma estéril com uma alça de platina, 200 mL de meio de cultivo YPD em erlenmeyers de 500 mL. Após cerca de 70 horas em um incubador rotatório a 29°C, 160 rpm, a absorvância (570 nm) de uma amostra deste cultivo foi determinada e, em seguida as células foram centrifugadas a 3.000 g por 10 minutos e ressuspensas em 1 mL de meio de cultivo servindo de inóculo.

Durante o período de cultivo foram coletadas 8 alíquotas correspondentes ao tempo de 0, 6, 12, 18, 24, 30 e 48 horas para medição do pH em pHmetro Digimed (DM-32) e determinação da atividade enzimática.

**Emulsão de óleo de fritura residual e Meio de cultivo** – Os componentes oleosos foram adicionados ao meio de cultivo através de uma emulsão a 20% contendo 5mL de óleo de fritura residual; 20 mL de água destilada estéril e 125  $\mu$ L de antifloam. Esta emulsão foi submetida à vórtex por 10 segundos e sonicada por 60 segundos a 80% de potência acústica, em sonicador com potência nominal máxima de 130 W. Em seguida foram adicionados 10 mL da emulsão ao meio de cultura. O meio de cultivo foi constituído por peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10g/L, acrescido da emulsão (NUNES, 2015).

As células de *Y. lipolytica* foram incubadas em erlenmeyers de 1L contendo 400mL de meio de cultivo, em agitador rotatório a 250 rpm, 28°C e sua cinética de produção de lipase foi acompanhada durante 48 h.

**Atividade Enzimática Pelo Método Espectrofotométrico** – Para a determinação da atividade hidrolítica foi realizada a variação de absorvância a 410 nm em espectrofotômetro (Shimadzu modelo UV-1800) devido à oxidação do p-nitrofenil laurato (p-NFL). O substrato (p-NFL) foi preparado solubilizando 0,018g deste em 1 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO) e, em seguida, diluído em 100 mL de tampão fosfato de potássio (50mM) pH 7,0. Para determinação da atividade enzimática tubos de ensaio contendo 1,90 mL do substrato foram previamente aclimatados a 37°C por, aproximadamente, 15 minutos. Após esse tempo, adicionou-se 0,10 mL da fração enzimática a ser analisada e a absorvância foi acompanhada em espectrofotômetro de 410 nm contra o branco da reação (1,90 mL do substrato e 0,10 mL do tampão), por 100 segundos (AMARAL, 2007).

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

O cultivo de *Y. lipolytica* foi realizado utilizando como indutor o óleo de fritura residual de uma rede de fast food, não sendo observado efeito de inibição de crescimento (Figura 1). A curva de crescimento para a produção de lipase por *Y. lipolytica* apresentou um crescimento diáuxico (19 a 24 h), sendo, provavelmente decorrente da assimilação de forma ordenada dos produtos da hidrólise do óleo de

fritura (glicerol e ácidos graxos). Na segunda fase exponencial ocorreu o aumento da atividade lipásica (Figura 2) que deve estar relacionada à presença dos ácidos graxos decorrentes da assimilação do óleo de fritura (Figuras 1 e 2).

Ao longo das 48 h de cultivo de *Y. lipolytica* foi possível observar o aumento do pH (6,55 - 8,32), principalmente após a segunda fase exponencial. Isto pode ter ocorrido principalmente devido à formação de amônia decorrente da degradação da peptona por hidrolases tornando o meio mais básico. A atividade lipásica máxima ocorreu em pH em torno de 7,5 favorecendo, o melhor desempenho para uma faixa de pH próxima a neutralidade.

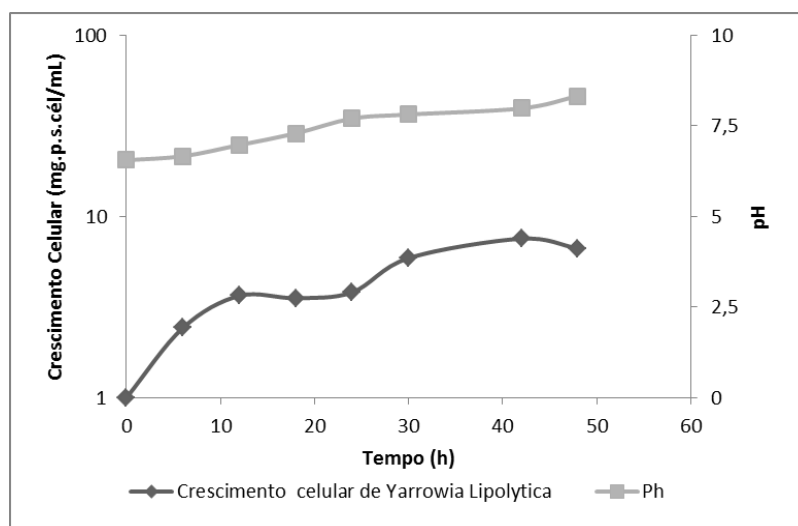


Figura 1. Perfil de crescimento de *Yarrowia lipolytica* para produção de lipase e pH.

A atividade lipásica máxima foi observada no tempo de 24 h (3039,4 U/L) durante a fase estacionária do crescimento conforme observado no estudo de Amaral (2007), que utilizou como fonte de carbono o azeite de oliva. Em torno de 30 h a atividade enzimática decresceu chegando ao valor de 1093,9 U/L coincidindo com o início da segunda fase exponencial (figura 2).

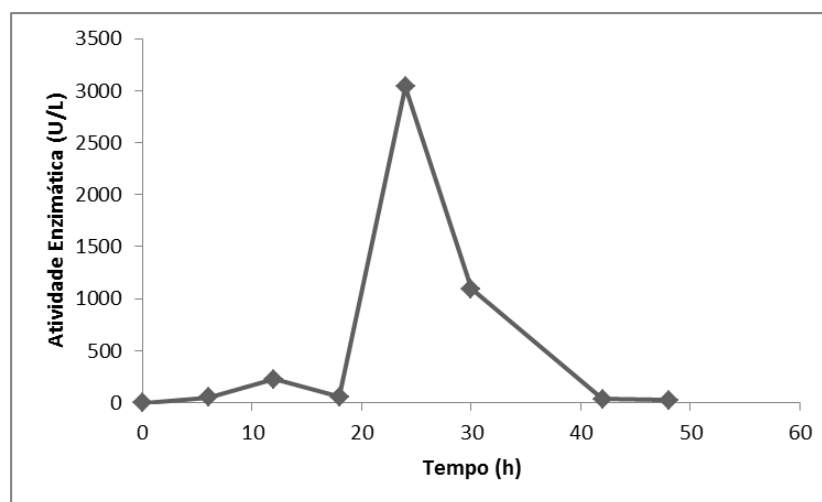


Figura 2. Cinética de produção de lipase extracelular durante o cultivo de *Y. lipolytica* em óleo de fritura residual.

## 4 | CONCLUSÕES

Através do presente estudo foi possível utilizar um óleo de fritura residual como indutor na produção de lipase extracelular de *Y. lipolytica* avaliando o perfil de crescimento da levedura sem efeito de inibição. O pico de atividade enzimática máxima foi observado em 24 h.

## 5 | AGRADECIMENTO AS AGÊNCIAS DE FOMENTO

Este presente estudo recebeu o suporte financeiro das agências de fomento CAPES & FAPERJ.

## REFERÊNCIAS

AMARAL, P.F.F. Produção de lipase de *Yarrowia lipolytica* em biorreator multifásico. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, BRASIL, 2007.

COELHO M.A.Z.; AMARAL P.F.F.; BELO, I. *Y.lipolytica*: “an industrial workhorse”. Technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology. 930-944, 2010.

HAEGLER, A.N. E MENDONÇA-HAEGLER, L.C. Yeast from marine and stuarine waters with different levels of pollution in the state of Rio de Janeiro, Brazil. Appl. Environ. Microbiol., V.41, N.1, PP.173-178, 1981.

MALCATA, F. X. ET AL. Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils-a review. Journal of the American Oil Chemists Society, v. 67, n. 12, 890-910, 1990.

MESSIAS, J. M., COSTA, B. Z., LIMA, V. M. G., G. E. C., DEKKER, R. F. H., BARBOSA. Lipases microbianas: produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina, v. 32, n. 2, p. 213-234, 2011.

NUNES, P.M.B. Produção de lipase por óleo de fritura residual. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, BRASIL, 2015.

RUIZ-HERRERA, J. & SENTANDREU, R. Different effectors of dimorphism in *Yarrowia lipolytica*, ARCH MICROBIAL, V. 178, P.477–483, 2002.

TREICHEL H., OLIVEIRA D., MAZUTTI M. A., LUCCIO M., OLIVEIRA J. V. A. Review on microbial lipases. Production Food Bioprocess Technology, 3, 182–196, 2010.

## QUALIDADE DA FARINHA DE MANDIOCA (*Manihot esculenta Crantz*) EM COMUNIDADE TRADICIONAL DO MUNICÍPIO DE MACAPÁ-AP

### **Lia Carla de Souza Rodrigues**

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amapá (IFAP), Macapá – Amapá

### **Roberto Quaresma Santana**

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amapá (IFAP), Macapá – Amapá

### **Jorge Emílio Henriques Gomes**

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amapá (IFAP), Macapá – Amapá

### **Marília de Almeida Cavalcante**

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amapá (IFAP), Macapá – Amapá

**RESUMO:** A mandioca é um dos principais produtos comercializados no estado do Amapá, in natura ou beneficiada, sua qualidade físico-química é de grande importância para a certificação que seus processos de extração e produção são adequados. O objetivo deste artigo foi avaliar a composição e qualidade físico-química da farinha de mandioca produzida em comunidade tradicional do município de Macapá-AP. Para a realização desta pesquisa coletou-se 30L de farinha de mandioca em uma Feira Municipal, que foram levados ao Laboratório de Alimentos de Origem Vegetal do Instituto Federal do Amapá, onde se realizaram posteriores análises físico-químicas e de classificação, segundo legislações vigentes. Foi observado, em todas as análises, que a farinha

coletada está dentro da legislação vigente, se tornando própria para o consumo.

**PALAVRAS-CHAVE:** Farinha de mandioca; Municípios; Qualidade.

## 1 | INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta Crantz*) desempenha um importante papel na dieta alimentar dos brasileiros, por seu alto teor energético. O Brasil figura como um dos maiores produtores dessa cultura e também como grande consumidor, apresentando em 1999 um consumo de raízes per capita de 42,9Kg/hab/ano, enquanto o consumo per capita mundial foi de apenas 16,4Kg/hab/ano (FAO, 2003).

Seu cultivo exerce importante papel no cenário agrícola nacional e internacional, tanto como fonte de energia para a alimentação humana e animal, quanto geradora de emprego e de renda, principalmente nas regiões Norte e Nordeste do Brasil (MARINI, 2015 apud CARDOSO; SOUZA, 2000, p.14).

Segundo Marini, 2015. Existem basicamente dois grandes grupos de variedades de mandioca:

- a. Mandioca industrial (brava ou amarga), também chamada de amargosa, assu, manipeta, mulatinha,



maria-mole, puri.

Os agricultores têm conhecimento que essa divisão é feita em função do sabor amargo da mandioca-brava, que contém maior quantidade do chamado “veneno” da mandioca, capaz de levar até a morte se consumido em altas doses. Esse “veneno” na verdade corresponde a compostos cianogênicos que existem na mandioca e são liberados durante a mastigação (MODESTO JUNIOR; ALVES 2016, P.70).

**b. Mandioca de mesa (mansa ou doce)** também conhecida como aipim ou macaxeira, mandi, morandi, mata-fome, vassourinha, branca, guaxupé, cuvelinha e outras.

A Mandioca de mesa, mandioca mansa, aipim ou macaxeira são denominações de variedades de mandioca com baixos teores de compostos cianogênicos, na polpa das raízes. Pela classificação utilizada pelo Instituto Agrônomo de Campinas - IAC, as variedades de mesa devem conter menos de 100ppm de HCN na polpa crua das raízes (MARINI, 2015, p.15).

A Instrução Normativa nº 52/2011 diz:

Na classificação da farinha de mandioca importada e na classificação de fiscalização, o detentor da mercadoria fiscalizada, seu representante legal, seu transportador seu armazenador, devem propiciar as condições necessárias aos trabalhos de amostragem exigidos pela autoridade fiscalizadora. A amostragem em meios de transporte rodoviário, ferroviário e hidroviário deve ser feita em pontos do veículo, uniformemente distribuídos, em profundidades atinjam o terço superior, o meio e o terço inferior da carga a ser amostrada, em uma quantidade mínima de 2 kg (dois quilogramas) por coleta.

São vários os produtos que podem ser feitos a partir das raízes de mandioca e do aipim ou macaxeira, destacando-se as farinhas (FILHO *et al*, 2013, p.23). Como demonstra, Tabela 1.

<b>Produtos</b>	<b>Subprodutos</b>
Farinha Seca	-
Fécula ou goma	A partir da fécula podem ser fabricados diversos outros produtos, como o polvilho azedo, tapioca, sagu, cremes, pudins, alimentos infantis, molhos, sopas, caldos etc.
Polvilho Azedo	Obtido por meio da fermentação da fécula ou goma, o que modifica as suas propriedades, permitindo a produção de pão de queijo.
Mandioca cozida	A partir do aipim cozido fazem-se sopas, mingaus, caldos e muitos outros produtos.
Mandioca frita	
Carimã ou massa puba	É utilizada no preparo de bolos, mingaus, cuscuz e outros pratos.
Bijus	-

Tabela 1 - Produtos e Subprodutos da mandioca.

Fonte: Filho et al, 2013.

Os produtos devem ser obtidos, processados, embalados, armazenados, transportados e conservados em condições que não produzam, desenvolvam ou agreguem substâncias físicas, químicas ou biológicas que coloquem em risco a saúde do consumidor (IN 52/2011).

A colheita de amostras constitui a primeira fase da análise do produto. As amostras de produtos alimentícios destinadas à análise poderão ser colhidas nos locais de fabricação, preparo, depósito, acondicionamento, transporte e exposição à venda. A colheita adequada da amostra, cercada de todas as precauções, viabilizará as condições corretas para o processo de análise; caso contrário, este processo será comprometido ou impossibilitado (Instituto Adolfo Lutz, 2008).

O objetivo deste artigo foi avaliar a composição e qualidade físico-química da farinha de mandioca produzida em comunidade tradicional do município de Macapá-AP.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

As amostras foram coletadas segundo a metodologia de Álvares (2014), em uma das Feiras Município de Macapá, localizada no bairro do Buritizal. Foi feita a amostragem de 30L de farinha, coletadas de apenas um produtor e acondicionada em um saco de polietileno juntamente com ao de fibra.

Para classificação, foram pesadas 200g de farinha e peneiradas por 1 minuto em peneiras Bertel nº10 e nº18, com abertura de malha nominal de 1 mm e 2 mm, respectivamente.

### 2.1 Análises Físico-químicas

As análises foram realizadas de acordo com metodologia do Instituto Adolfo Lutz, 2008 e Álvarez, 2014.

Para acidez titulável, foram pesadas 100g de farinha em balança analítica, modelo Bel Engineering M214A, diluídas em 100mL de água destilada em Erlenmeyer de 250mL, adicionadas 3 gotas de solução de fenolftaleína a 1% e titulada com solução de NaOH 0,1N, a análise foi realizada em triplicata.

O pH das amostras foi analisado em pHmetro de Bancada Digital Microprocessado MPA-210 – TECNOPON, onde foram analisadas amostras em triplicata de 100g de farinha, diluídas em 100mL de água destilada em erlenmeyers de 250mL.

O teor de umidade foi medido de acordo com metodologia do Instituto Adolfo Lutz (2008), onde foram pesadas 5g da amostra em cadinhos de porcelana previamente secos, e mantidos em estufa a 105°C por 24 horas. O Resíduo Mineral Fixo foi analisado posteriormente em mufla por 2,5 horas.

A Atividade de Água (aw), foi avaliada em Analisador de Atividade de Água Portátil Labswift - Novasina, previamente calibrado com o sal de 11% de umidade, onde foi

inserida uma quantidade da amostra em uma cápsula plástica e analisada por 20 min.

A cor foi analisada com o Chroma Meter Cr400+Cr410 - Konika Minolta, nos parâmetros de L\* a\* b\*

## 2.2 Tratamento dos dados

Os resultados foram tratados em média e desvio padrão foram avaliados segundo metodologia de Álvarez (2014).

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo a IN 52/2011. A farinha é considerada grossa: quando o produto fica retido em mais de 10% (dez por cento) na peneira com abertura de malha de 2 mm (dois milímetros); A quantidade de farinha coletada que ficou retida na peneira foi de 53%, mostrando que a mesma se enquadra na classe grossa. Para a identificação de classe foi utilizada a Tabela 2.

Peso retido na peneira (g)		Classe
2 mm	0 (zero)	Fina
1 mm	≥10	
2 mm	≥10	Grossa
1 mm	-	
Quando não se enquadrar nas classes anteriores		Média

Tabela 2 - Identificação de classe de farinha de mandioca do grupo seca.

Fonte: Adaptada de Álvarez, 2014.

De acordo com a Instrução Normativa nº 52/2011, a acidez é o teor dos ácidos orgânicos, solúveis em água, encontrados no produto, sendo expresso em miliequivalentes de solução de NaOH (0,1 N) por cem gramas de produto (meq NaOH (0,1N) /100 g). Ela deve variar de menor que 3,0 a maior que 3,0 para farinha seca e bijusada. Onde, na análise, se encontrou uma acidez de 3,75, mostrando que a amostra é de alta acidez titulável. Segundo Miqueloni, *et al* (2009), isso ocorre devido à influência da umidade no processo de fermentação da massa, aumentando a acidez da farinha.

O pH é um fator de grande importância na limitação da capacidade de desenvolvimento de microrganismos no alimento. Em função deste parâmetro, os alimentos podem ser classificados em: pouco ácidos (pH > 4,5), ácidos (4,5 a 4,0) e muito ácidos (<4,0) (SOUZA *et al* 2008, *apud* SOARES *et al*. 1992). O pH analisado obteve o resultado de 4,85, entrando na faixa dos alimentos pouco ácidos.

Segundo IN 52/2011. O teor de umidade é o teor de água livre encontrado no produto, sendo a sua medida expressa em gramas por cem gramas do produto, devendo ser inferior que 13%. A umidade encontrada do produto foi de 8,83%.

O teor de cinzas ou Resíduo Mineral Fixo (RMF) é o total de material mineral presente no produto, sendo a sua medida expressa em gramas de cinzas por cem gramas do produto (%) devendo ser menor ou igual a 1,4 para todos os tipos de farinha (IN nº 52/2011). A análise expressou que o RMF da amostra foi de 0,43.

Segundo Chisté, Cohen (2006), quando a atividade de água baixar entre 0,4 e 0,8, haverá possibilidade de reações químicas e enzimáticas rápidas pelo aumento das concentrações dos reagentes, enquanto, com  $A_w$  próxima de 0,6, tem-se pequeno ou nenhum crescimento de microrganismos. O resultado encontrado na amostra foi de 0,517.

A cor de diversos alimentos pode ser medida através dos parâmetros  $L^*$  Luminosidade;  $a^*$  coordenada vermelho / verde;  $b^*$  coordenada amarelo / azul. No caso da farinha de mandioca, segundo a IN 52/2011, a cor predominante do produto, decorrente da variedade da mandioca utilizada ou da tecnologia de fabricação (torração) ou do uso de corantes naturais, quando autorizados para a farinha de mandioca, conforme legislação específica. No caso do produto analisado os resultados obtidos foram  $L^*$  81,67;  $a^*$  0,49 e  $b^*$  27,28.

Foi observado, em todas as análises, que a farinha coletada está dentro da legislação vigente, se tornando própria para o consumo, como mostra, Tabela 3.

Análise Realizada	Resultados encontrados	Parâmetros	Legislação / Normas
Acidez Titulável	3,75±0,07	<3,0 a >3,0	Instrução Normativa nº 52/2011
pH	4,85±0,04	Pouco ácidos > 4,5; Ácidos 4,5 a 4,0; Muito ácidos < 4,0.	Não há especificações para farinha
Umidade	8,83%	<13%	Instrução Normativa nº 52/2011
Cinzas	0,43±0,01	<1,4%	Instrução Normativa nº 52/2011
Atividade de Água ( $A_w$ )	0,517±0,01	± 0,6	Não há especificações para farinha
Cálcio	0,2%	Não há	Não há especificações para farinha
Fósforo	-0,2%	Não há	Não há especificações para farinha

Tabela 3 – Resultados Análises Físico-químicas.

## 4 | CONCLUSÕES

Considerando os resultados apresentados, a qualidade da farinha produzida

nas comunidades tradicionais está em níveis e condições aceitáveis para o consumo, mesmo que, sendo produzidas em ambientes rústicos e/ou com poucos recursos tecnológicos a qualidade esta garantida observando os parâmetros de análises e as instruções normativas que norteiam os índices de qualidade para a farinha de mandioca.

## 5 | AGRADECIMENTOS

Agradecemos a parceria com os Laboratórios de Análise de Alimentos da EMBRAPA Amapá e à Leandro Fernandes Damasceno Supervisor do Setor de Gestão de Laboratórios (SGL), que auxiliou as análises físico-químicas para suporte deste projeto.

## REFERÊNCIAS

ÁLVARES, Virgínia de Souza. **Manual de Classificação de Farinha de Mandioca**. Brasília, DF: Embrapa, 2014.

CHISTÉ, Renan Campos; COHEN, Kelly de Oliveira. **Estudo do Processo de Fabricação da Farinha de Mandioca**. Embrapa Amazônia Oriental. Belém, PA. 2006.

FAO - *Food and Agriculture Organization*. **Statistical datas**. Disponível em: <http://apps.fao.org/cgi-bin/nph-db.pl>

FILHO, José, et al. **Cultivo, Processamento e uso da Mandioca**. Embrapa Brasília, DF 2013.

IAL - Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea -- São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa 52/2011 (08/11/2011)**.

MARINI, José Adriano. **Varietades Caboclas de Mandioca para o Cultivo no Amapá**. 2015. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/140165/1/CPAF-AP-2015-DOC-90-Varietades-caboclas-mandioca.pdf>

MODESTO JUNIOR, M. de S.; ALVES, R. N. B. Produção de farinha de mandioca e farinha de tapioca no estado do Para como oportunidades de negócios para empreendedores e agricultores da Amazônia. In: DENARDIN, I. F.; KOMARCHESKI, R. (Org.). **Farinheiras do Brasil: tradição, cultura e perspectivas da produção familiar de farinha de mandioca**. Matinhos: UFPR Litoral, 2015. Cap. 7, p. 147-171.

MIQUELONI, Daniela Popim; ÁLVARES, Virgínia de Souza; SILVA, Silvana Fraga da; FELISBERTO, Francisco Álvaro Viana. **Estudo Físico-Químico Da Farinha De Mandioca Por Análise De Componentes Principais**. Embrapa, Acre – 2009.

SOUZA, J. M. L; NEGREIROS2, J. R. S; ÁLVARES, V. S; LEITE, F. M. N; SOUZA, M. L; REIS, F. S; FELISBERTO, F. A. V. **Variabilidade físico-química da farinha de mandioca**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Dezembro, 2008.

## QUANTIFICAÇÃO DE TMA EM CARANHAS DESCONGELADAS E RECONGELADAS POR RMN DE <sup>1</sup>H

**Vinicius Silva Pinto**

Universidade Federal de Goiás, Instituto de  
Química  
Goiânia-Goiás

**RESUMO:** Os peixes são importantes fontes de ácidos graxos insaturados, aminoácidos essenciais e vitaminas. Porém, são altamente susceptíveis a deterioração e a proliferação de microrganismos, resultando numa vida útil reduzida. Para retardar a extensão dessas reações, é indicado o uso do frio em todas as etapas do processamento. Uma vez interrompido, reações indesejadas são favorecidas, que podem comprometer o consumo. Embora importantes, nem sempre é possível ao consumidor identificar peixes impróprios ao consumo devido ao recongelamento. Nesse contexto, foi avaliado a influência de sucessivos recongelamentos em caranhas por meio da espectroscopia de ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup>H (RMN de <sup>1</sup>H). Os recongelamentos ocorreram em ciclos executados em intervalos de 1, 4, 7, 11, 15, 19 e 24 dias. A cada ciclo, foram realizadas extrações em fase aquosa seguidas de experimentos de RMN de <sup>1</sup>H. Após a caracterização do perfil metabólico, foi identificado que o sinal em 2,90 ppm, referente a trimetilamina (TMA), apresentou aumento de intensidade devido aos recongelamentos. A

variação na concentração entre o primeiro e o último ciclo foi de  $0,09 \pm 0,005$  mmolar para  $0,63 \pm 0,005$  mmolar, respectivamente. Os resultados indicaram que durante os descongelamentos/recongelamentos houve aumento da atividade microbiana, visto que a TMA, metabólito responsável pelo odor do peixe estragado, é formada pela redução enzimática exógena do óxido de trimetilamina (OTMA). Isso reforça a importância da estabilidade da cadeia do frio do peixe.

**PALAVRAS-CHAVE:** RMN de <sup>1</sup>H; perfil metabólico; cadeia do frio do pescado.

**ABSTRACT:** Fish are important sources of unsaturated fatty acids, essential amino acids and vitamins. However, they are highly susceptible to deterioration and proliferation of microorganisms, resulting in a reduced shelf life. To delay the extension of these reactions, the use of cold is indicated at all stages of processing. Once interrupted, unwanted reactions are favored, which can compromise consumption. Although important, it is not always possible for the consumer to identify fish unfit for consumption by refreezing. In this context, the influence of successive freeze-ups on caranhas was evaluated by means of <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy (<sup>1</sup>H NMR). The refreezes occurred in cycles performed at 1, 4, 7, 11, 15, 19 and 24 day

intervals. At each cycle, extractions were performed in aqueous phase followed by  $^1\text{H}$  NMR experiments. After characterization of the metabolic profile, the signal at 2.90 ppm, referring to trimethylamine (TMA), showed an increase in intensity due to re-freezing. The variation in concentration between the first and the last cycle was from  $0.09 \pm 0.005$  mmolar to  $0.63 \pm 0.005$  mmolar, respectively. The results indicated that during the thawing / re-freezing period there was an increase in the microbial activity, since the TMA, the metabolite responsible for the odor of spoiled fish, is formed by the exogenous enzymatic reduction of trimethylamine oxide (OTMA). This reinforces the importance of the stability of the cold chain of the fish.

**KEYWORDS:**  $^1\text{H}$  NMR; metabolic profile; fish cold chain

## 1 | INTRODUÇÃO

O termo pescado caracteriza todos os animais aquáticos destinados à alimentação humana. Dentre os principais produtos oriundos da pesca, destacam-se os peixes, que podem ser obtidos pelo consumidor na forma fresca (*in natura*), caracterizada pelo animal recém-capturado, submetido ou não a refrigeração e no estado cru; e/ou na forma industrializada, que compreende o produto submetido a processos elaborados de manuseio e preservação, como o processamento em postas, salga ou adição de conservantes (OETTERER, D'ARCE, SPOTO, 2006; DIPOA, 2018; FAO, 2018).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica a carne do peixe como fonte proteica de alta qualidade e recomenda o consumo mínimo de 20 kg per capita/ano (OMS, 2018). Segundo levantamento realizado no ano de 2017, o brasileiro apresentou consumo médio de aproximadamente 14 kg per capita/ano, abaixo do recomendado pela OMS, porém acima da recomendação da *Food And Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) de 12 kg per capita/ano (DIPOA, 2018; FAO, 2018).

A crescente demanda no consumo do peixe está ligada ao seu alto valor nutricional, sendo esse decorrente da presença de lipídios com ácidos graxos poliinsaturados, osmorreguladores, vitaminas, aminoácidos essenciais e não essenciais, baixas concentrações de colesterol de baixa densidade além de um tecido de fácil digestibilidade (GHALY *et al.*, 2010; KHAN, ALDOSARI, HUSSAIN, 2018).

A disponibilidade desses componentes é máxima na forma fresca. Porém, devido à grande disponibilidade de nutrientes, pH próximo a neutralidade e a alta umidade (65-85%), os peixes são susceptíveis a proliferação de microrganismos e de reações que levam a sua deterioração, conferindo uma baixa vida útil (VIDAL, 2012; SHUMILINA *et al.*, 2015).

Para aumentar a vida útil do pescado, procedimentos de armazenamento a frio são recomendados até o momento do preparo do alimento. O uso do frio em habitações (frio doméstico), no comércio (frio comercial), na Indústria (frio industrial) e nos transportes, caracteriza a cadeia do frio do pescado. Quanto mais baixa for a temperatura de conservação, menor é a possibilidade de desenvolvimento de microrganismos que

levam à deterioração do produto. O aumento da temperatura de forma acidental ou intencional, pode diminuir o tempo total de conservação inicialmente previsto. Assim, a manutenção da cadeia do frio do pescado apresenta relação direta com a qualidade adquirido pelo consumidor (FAO AND WHO, 2012; TOLSTOREBROV, 2016).

Determinadas classes de substâncias podem ser utilizadas para identificar a ocorrência de práticas inadequadas (ex: quebra da cadeia do frio) no armazenamento do pescado. Um exemplo são as metilaminas, substâncias formadas principalmente pela atividade bacteriana na carne do peixe (CASTEJON, 2016). Durante a deterioração bacteriana do peixe, o óxido de trimetilamina (OTMA), substância que atua como osmorregulador proteico, é reduzido a trimetilamina (TMA), substância que caracteriza o cheiro do peixe estragado e indica que o alimento é impróprio ao consumo. A TMA por sua vez, pode ser reduzida por ação enzimática, ocorrendo a formação de dimetilamina (DMA) e formaldeído. Logo, a detecção de metilaminas apresenta grande relevância nutricional e sanitário (HUSS, 1995; CASTEJON, 2016).

As análises sensoriais e de determinação de bases voláteis totais (N-BVT) são as principais metodologias usadas para identificar as metilaminas (MAPA, 2018). Porém, à natureza subjetiva da análise sensorial e o emprego de substâncias químicas nocivas (ex: ácido bórico p.a.; ácido clorídrico 37% etc.) no método N-BVT, conferem limitações as técnicas (SHUMILINA et al., 2015; DIPOA, 2018). Nesse contexto, a espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), amplamente usada na elucidação estrutural, encontra grande utilidade como ferramenta analítica para a detecção de metilaminas em pescado. Sua natureza não seletiva e sua grande reprodutibilidade, permite a obtenção de espectros que apresentam verdadeiros *fingerprints* metabólicos, sem a necessidade de protocolos rebuscados de separação, em curto período de tempo e com uso de quantidades reduzidas de solventes. Assegurando determinados parâmetros (ex: tempo de relaxação transversal, pulsos calibrados, relação sinal/ruído etc.), a análise por RMN, permite ainda, a obtenção de resultados quantitativos e qualitativos de forma concomitante (TERESA, 2016).

As análises quantitativas por RMN (RMNq) em matrizes complexas como alimentos ou fluídos biológicos, apresentam um desafio no que tange a escolha de um padrão interno para a quantificação. Essa substância deve atender a requisitos como pureza, inércia química, baixa volatilidade e uma solubilidade similar ao analito. Sua estrutura química também deve ser considerada a fim de evitar a sobreposição aos sinais de RMN do analito. Como proposta alternativa para a RMNq, Siege Akoka *et al.* desenvolveram uma série de algoritmos que dispensam o uso de padrões internos inseridos diretamente no tubo de análise. O protocolo denominado *Electronic Reference to access In-vivo Concentration* (ERETIC), permite a inserção de sinais de RMN sintéticos em qualquer região espectro que contém o analito, tornando possível, a quantificação em matrizes complexas sem o risco de interação padrão-analito. O ERETIC depende apenas de uma etapa de calibração com o uso de uma amostra de pureza e concentração conhecidas (BHARTI E ROY, 2012; AKOKA *et al.*, 1999).



O presente trabalho descreve o uso da RMNq como ferramenta analítica usada para a detecção de TMA em amostras de caranhas submetidas a ciclos de descongelamentos e recongelamentos, simulando a quebra da cadeia do frio. Para efeitos de comparação, foram quantificados os teores de TMA em amostras de caranhas apenas armazenadas e não recongeladas após o experimento. Os resultados indicaram forte intensificação na produção de TMA nas amostras que foram progressivamente descongeladas e recongeladas.

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Coleta e Preparo Das Amostras

Vinte e quatro amostras de caranha (*Piaractus brachipomus*) oriundas do mesmo tanque de confinamento foram adquiridas na cidade de Goiânia (Goiás). Logo após o abate, os peixes limpos e eviscerados foram levados em caixas resfriadas até o laboratório de RMN do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, onde foram armazenadas a temperatura de aproximadamente  $-20^{\circ}\text{C}$  até o instante de cada análise. As amostras foram divididas em dois grupos:

- 21 amostras **controles**, sendo 3 peixes para cada instante ( $T_{0-6}$ ) de análise. Foram armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do experimento e não recongeladas;
- 3 amostras **tratamento**, descongeladas em cada instante ( $T_{0-6}$ ) de análise e após o experimento, recongeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . A figura 1 apresenta o fluxograma de instantes de descongelamento, análise e recongelamentos.

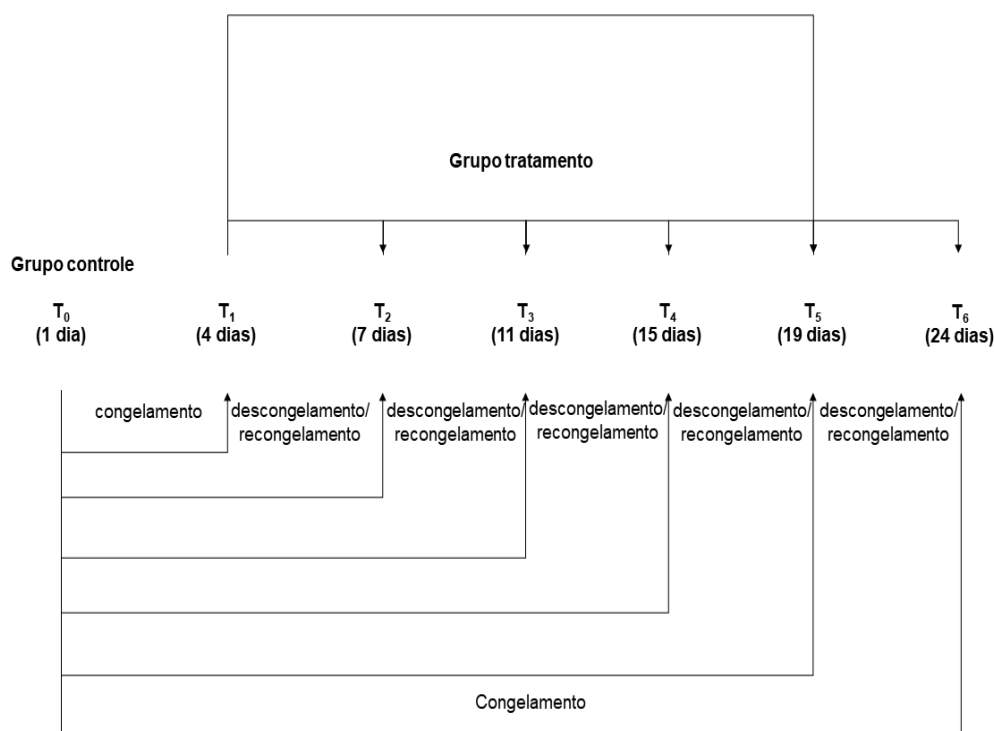


Figura 1. Protocolo experimental de armazenamento e ciclos de descongelamentos e

recongelamentos.

## 2.2 Extração dos Metabólitos Polares

Alíquotas da carne interna da caranha, removidas das áreas próximas a cauda, dorso e cabeça, com massa total de 2,0g foram transferidas para um moinho analítico para a trituração. 100,0mg do triturado foram submetidos a extração com 1000,0  $\mu\text{L}$  de  $\text{D}_2\text{O}$  (óxido de deutério) em banho ultrassônico por 30 minutos e centrifugação por 30 minutos. O homogeneizado foi filtrado e transferidos 600,0 $\mu\text{L}$  do extrato para tubo de análise de RMN (figura 2).

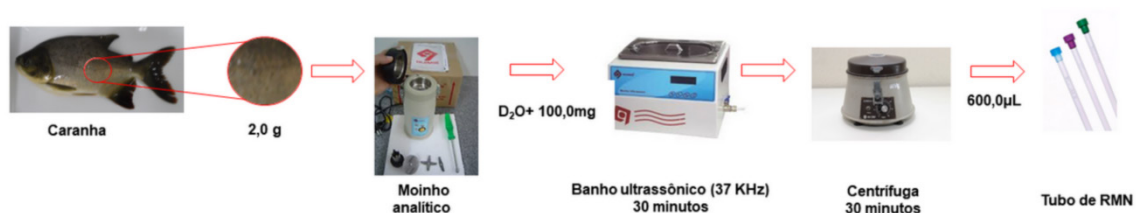


Figura 2. Protocolo de extração.

## 2.3 Experimentos de Rmn De <sup>1</sup>H

Os experimentos de RMN de <sup>1</sup>H foram adquiridos em espectrômetro *Bruker Avance III 11,75 T* equipado com sonda de detecção inversa (TBI) de 5 mm, situado no laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás (LAB-RMN-UFG). Os experimentos foram realizados com controle de temperatura a 25 °C utilizando 600,0  $\mu\text{L}$  de extrato. O ácido trimetilsililpropanóico (TSP-*d*4) 0,01 % (m/m) foi utilizado como referência interna de deslocamento químico.

Os experimentos de <sup>1</sup>H foram realizados com 256 promediações e 8 “dummy scans”. Foram usados 65536 pontos para a digitalização do FID com janela espectral de 20,0 ppm e sem giro da amostra. O tempo total de repetição para cada promediação, que contempla a condição quantitativa de 5 x o tempo de relaxação transversal ( $T_1$ ), foi de 11,0 segundos. Tanto a calibração dos pulsos e ajuste da homogeneidade foram realizados automaticamente. As linhas de base e as fases dos espectros foram corrigidas manualmente.

## 2.4 Calibração do Método Eretic2

Como padrão de calibração do ERETIC2 foram utilizados os sinais de RMN de <sup>1</sup>H da sacarose na concentração de 2 mmol/l solubilizada em solução de 90,0 %  $\text{H}_2\text{O}$  + 10,0%  $\text{D}_2\text{O}$  + 0,05% ácido 4,4-dimetil-4-silapentano sulfônico (DSS) em tubo selado. Os parâmetros de aquisição, processamento, sonda e temperatura foram os mesmos usados nos experimentos de RMN de <sup>1</sup>H dos extratos.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Caracterização do Perfil Metabólico por Rmn de $^1\text{H}$

A figura 3 apresenta o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato em  $\text{D}_2\text{O}$  de uma amostra de caranha. A caracterização dos sinais dos metabólitos foi realizada com base em informações contidas no *Human Metabolomics Database* (HMDB, 2018) e na literatura (SHUMILINA, 2015).

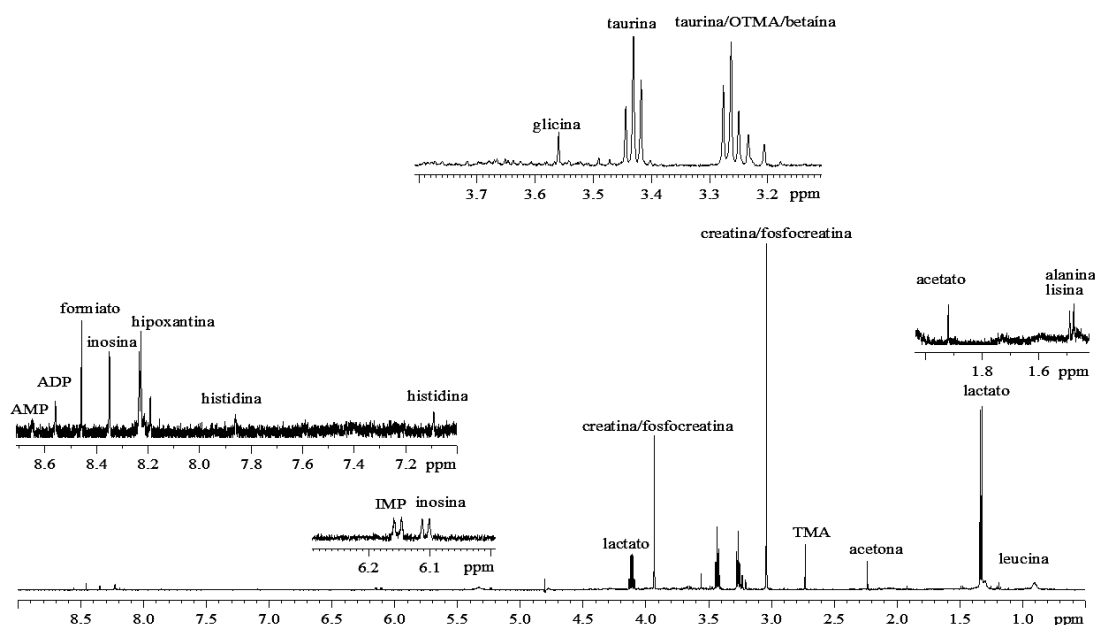


Figura 3. Caracterização do perfil metabólico da caranha por RMN de  $^1\text{H}$  em fase aquosa.

A faixa do espectro compreendida entre 0,6-3,0 ppm foi caracterizada pelos sinais de hidrogênio de grupos alifáticos. Foram identificados sinais de aminoácidos como lisina, leucina, alanina. Também foram identificados os sinais de bases conjugadas dos ácidos acético e láctico, sendo o último, de intensidade dominante na região de 1,38 ppm. Na região entre 6,0-10,0 ppm, foram caracterizados os sinais da adenosina trifosfato (ATP) e de seus produtos de degradação como adenosina difosfato (ADP) e monofostato (AMP), respectivamente. Essa região espectral refletiu as alterações post mortem que ocorreram no peixe. Durante os primeiros instantes após abate, o sistema enzimático endógeno promoveu reações que consumiram glicogênio, fosfocreatina e ATP. Com a escassez de oxigênio nas células, o sistema aeróbio que sintetizava o ATP foi inutilizado e a síntese anaeróbia de ATP continuou até que todo o glicogênio fosse consumido. Ao término do processo foi iniciada a degradação do ATP. Quando a concentração de ATP chegou a valores abaixo de  $1,0 \mu\text{mol/g}$ , foi iniciado o rigor mortis. As desfosforilações sucessivas do ATP levaram a formação de ADP e AMP, identificadas em 8,5 e 8,6 ppm, respectivamente. A desaminação do AMP formou a Inosina 5'-monofostato (IMP), que foi identificada em 6,15 ppm. Essa por sua vez, sofreu reações de desfosforilações, levando a formação de moléculas de inosina (INO), caracterizadas pelos sinais em 6,10 e 8,38 ppm. Também ocorreu a formação de

hipoxantina (Hx), identificada pelos sinais em 8,18 e 8,22 ppm (TEJADA, 2009). Entre 3,0-6,0 ppm foram identificados os sinais da taurina, em 3,3 e 3,4 ppm, da betaína, em 3,2 ppm, do aminoácido glicina, em 3,65 ppm além do segundo sinal do ácido láctico, próximo a 4,0 ppm. Os dois sinais de grande intensidade em 3,1 e 3,9 ppm, foram atribuídos a presença da creatina/fosfocreatina.

Em 3,23 ppm, o simpleto de grande intensidade caracterizou a presença do OTMA. Devido a rotação livre das ligações  $\sigma_{C-C}$  e conseqüente equivalência química, os nove hidrogênios metílicos originaram sinal com mesmo valor de deslocamento químico. O OTMA constitui uma importante fração do nitrogênio não proteico dos peixes. É formado através da ação enzimática no músculo e atua principalmente como osmorregulador proteico, impedindo o encharcamento da carne. Constitui um dos principais substratos para a utilização e decomposição microbiana, que após reações de redução, leva a formação da TMA, identificada próximo a 3,0 ppm (figura 4).

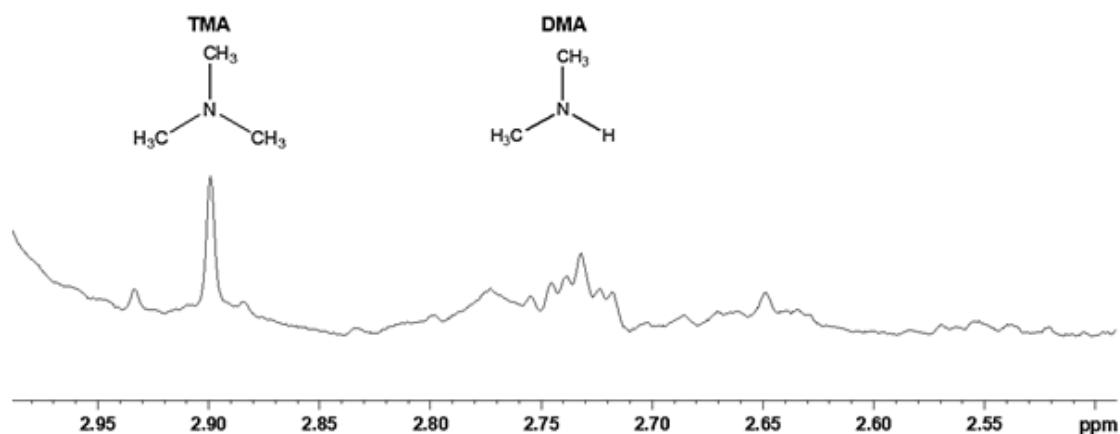


Figura 4. Identificação dos sinais da TMA e DMA.

### 3.2 Quantificação da Tma por Rmnq

As concentrações de TMA obtidas para as amostras de caranhas do grupo controle foram representadas pela figura 5. Ao final do primeiro 1º dia de armazenamento constante a  $-20^{\circ}\text{C}$ , foi registrado aumento na concentração de TMA igual a  $0,07 \pm 0,02$  mM, em relação a concentração inicial. Com o decorrer do tempo de armazenamento até o 24º dia, foram registradas diminuições nas concentrações da TMA, até o valor final de  $0,07 \pm 0,01$  mM. O decréscimo observado na concentração, indicada na curva de quantificação do grupo controle, foi associada à sua continua conversão a DMA por atividade microbológica. Assim descrito por Castejón *et al.*, a DMA é uma metilamina com formação induzida durante o congelamento, sendo um bioindicador de peixes armazenados por longos períodos (CASTEJÓN, 2016).

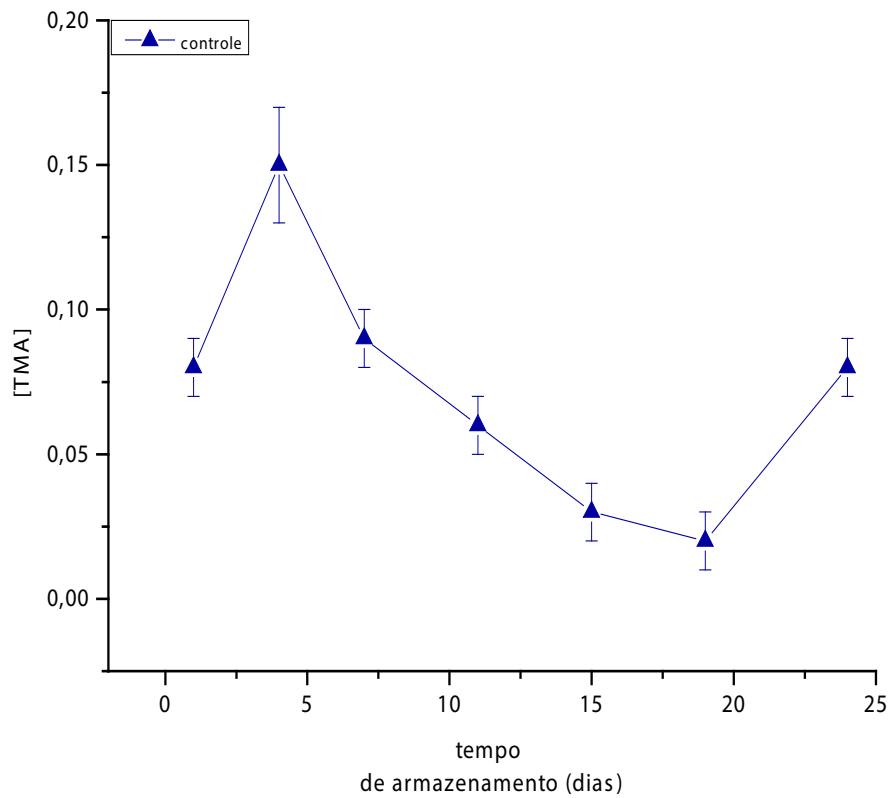


Figura 5. Variações nas concentrações da TMA em mmolar determinadas pelo método ERETIC2 nas amostras de caranha do grupo controle.

Por outro lado, a curva de quantificação da TMA para as amostras de caranhas descongeladas e recongeladas por 7 ciclos ao longo dos 24 dias de armazenamento (grupo tratamento), demonstrou a forte influência que quebra da cadeia do frio teve na alteração da qualidade dos peixes (figura 6).

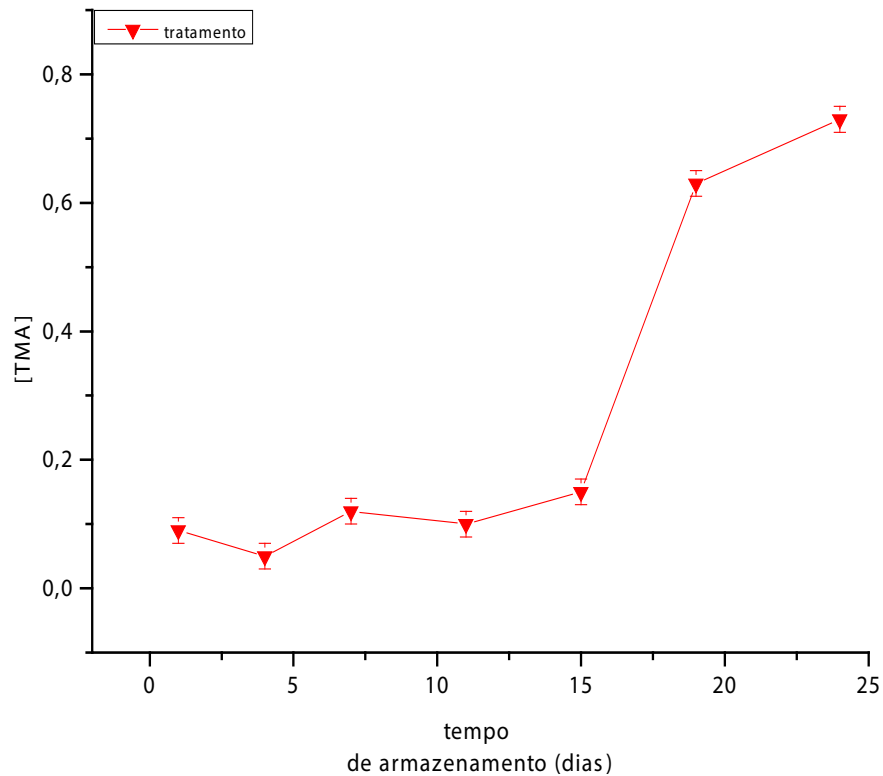


Figura 6. Variações nas concentrações da TMA em mmolar determinadas pelo método ERETIC2 nas amostras de caranha do grupo tratamento.

Foi registrado decréscimo na concentração apenas ao final do primeiro ciclo de descongelamento e recongelamento (tempo igual a 1 dia), com variação na concentração de  $0,10 \pm 0,01$  mM para  $0,05 \pm 0,01$  mM (figura 6). Com o aumento do número de ciclos de descongelamentos e recongelamentos, foi registrado aumento contínuo na concentração de TMA até o valor final de aproximadamente  $0,70 \pm 0,01$  mM. Shumilina *et al.*, descreveram um resultado similar em seu trabalho sobre o uso da RMN no monitoramento de mudanças *post mortem* em amostras de salmon (*Atlantic salmon*) que foram armazenados a temperaturas constantes de 0 e 4 °C. Foi identificado a influência que o aumento da temperatura apresentou no aumento da formação de TMA. Os autores identificaram que após 10 dias de armazenamento a temperatura de 0 °C, o valor de TMA produzida no músculo foi de 0,1 mg /100g de músculo de salmon. Após o dia 14, a concentração de TMA aumentou para 0,3 mg/100 g de salmon. Para as amostras de salmon armazenadas a temperatura de 4°C, ao final do 7 dia de armazenamento, a TMA já apresentava concentração de 0,4 mg/100 g de salmon. A concentração de TMA ao final dos 14 dias a temperatura de 4°C foi de 2,5 mg/100 g de salmon (SHUMILINA, 2015). No presente trabalho, o aumento da temperatura foi associado ao ato de descongelar, momento onde provavelmente a ação das bactérias foi estabelecida no tecido em maior extensão o que resultou na formação da TMA.

Vale ressaltar que a legislação brasileira, representada no poder do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), regulamenta através da Portaria N° 185, de 13 de maio de 1997, que a concentração permitida de bases voláteis totais (n-BVT) no pescado apto ao consumo humano deverá ser inferior a 30 mg/ 100g de carne (MAPA, 2018). As n-BVT são representadas pela amônia, TMA e DMA. Quando convertemos as concentrações da TMA, apresentadas na figura 6 para mg e a normalizamos para 100 g de carne de caranha, torna-se claro o risco do consumo de peixes descongelados e recongelados (figura 7).

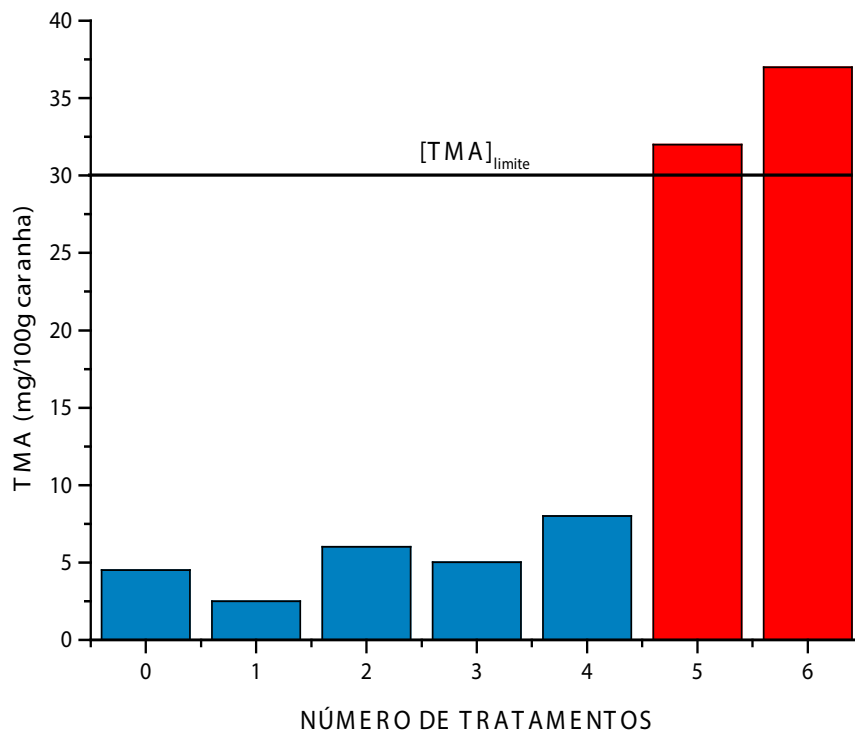


Figura 7. Concentração de TMA em mg/ 100 g de carne de caranha recongelada. O limite legal permitido pela legislação MAPA foi representada pela linha.

Os sucessivos descongelamentos e recongelamentos, tornam as caranhas impróprias ao consumo a partir dos tratamentos 5 e 6, onde foram registrados valores de concentração de TMA, acima do limite estabelecido no regulamento técnico do MAPA. O mesmo não ocorreu com as amostras controle que foram mantidas a temperatura constante de  $-20^{\circ}\text{C}$  e descongeladas apenas para a análise (figura 8). A concentração da TMA apresentou oscilações, indicando que existiu formação da mesma no peixe, porém, o limite estabelecido pelo regulamento MAPA não foi excedido.

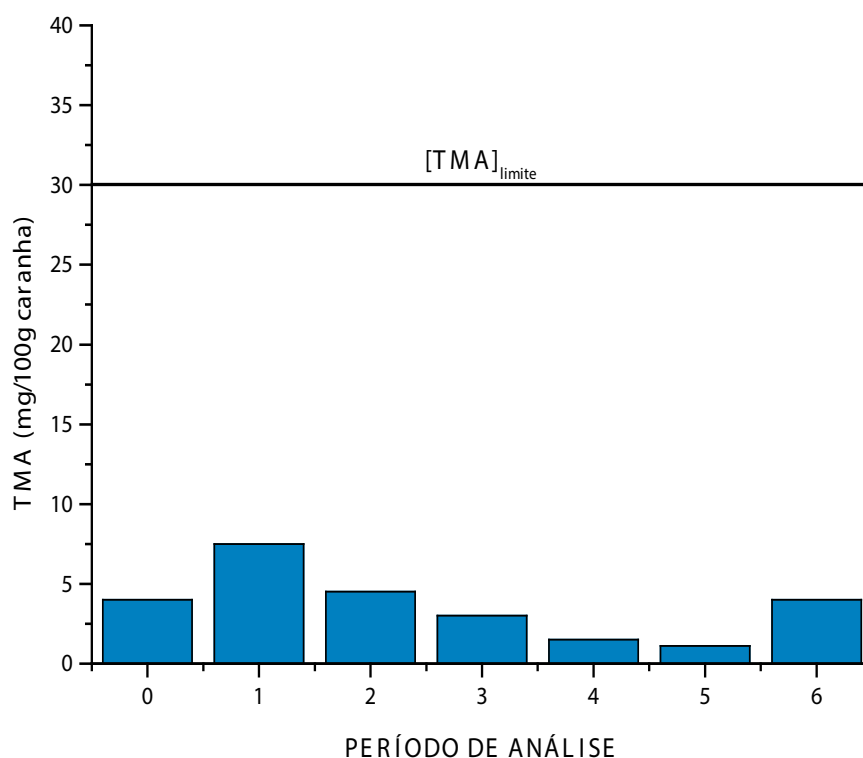


Figura 8. Concentração de TMA em mg/ 100 g de carne de caranha controle. O limite legal permitido pela legislação MAPA foi representada pela linha.

O risco do consumo de peixes submetidos a processamentos inadequados de conservação aumenta no que concerne à falta de esclarecimento da população sobre segurança alimentar e de políticas sanitárias efetivas. Os resultados apresentados indicaram que caranhas armazenadas a temperaturas de  $-20^{\circ}\text{C}$ , comuns em câmaras frias de grandes mercados e em refrigerados domiciliares, se submetidas a contínuos processos de descongelamento e recongelamentos, podem apresentar formação de compostos como a TMA, que conferem risco ao consumidor, por serem biomarcadores indicativos da atividade bacteriana no alimento.

#### 4 | CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou a grande aplicabilidade da espectroscopia de RMN no estudo metabólico do pescado. Amostras de caranha descongeladas e recongeladas intencionalmente foram usadas para avaliar a influência da quebra da cadeia do frio do pescado no que tange a formação da TMA. Quando comparado aos teores de TMA, determinados para amostras apenas armazenadas congeladas, foi demonstrado que a atividade biológica, principal mecanismo de formação da substância, foi extensivamente favorecido. Os resultados trazidos pela RMN reforçam a ideia do consumo do peixe em seu estado fresco além da necessidade de métodos



estáveis de armazenamento durante todas as etapas da cadeia do frio, para que o consumo do peixe recongelado não seja inviabilizado pelos processos degradativos aqui identificados.

## 5 | AGRADECIMENTOS

O autor agradece a CAPES, CNPq e a UFG.

## REFERÊNCIAS

- Akoka, S., L. Barantin, M., Trierweiler, M. Concentration Measurement by Proton NMR using the ERETIC Method. *Analytical Chemistry* (1999) 71, 25-54.
- Bharti, S.K., Roy, R. Quantitative  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy. *Trends in Analytical Chemistry* (2012) 35, 5-25.
- Castejón, D., García-Segura, J.M., Herrera, A., Cambero, M.I. NMR-detection of methylamine compounds in Atlantic salmon (*Salmo salar*) subjected to E-beam irradiation. *Food Control* (2016) 60, 455-460.
- Departamento de Inspeção de Origem Animal, DIPOA. Brasil, 2018.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO, 2018.
- Ghaly, A. E., Dave, D., Budge, S., Brooks, M.S. Fish spoilage and preservation techniques: Review. *American Journal of Applied Sciences* (2010) 7, 859-877. acessado em 2018.
- Huss, H.H. Quality and quality changes in fresh fish. *FAO Fisheries Technical Paper* (1995), 348.
- Khan, A. Q., Aldosari, F., Hussain, S. M. Fish consumption behavior and fish farming attitude in Kingdom of Saudi Arabia (KSA). *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* (2018) 17, 195-199.
- Ministério da Agricultura, Pecuária, Abastecimento e Pesca, 2018.
- Oetterer M., D'arce M.A.B.R., Spoto M., *Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Editora: Manole LTDA, 35 (2006), ISBN: 8520419780. Organização Mundial da Saúde, 2018.
- Shumilina, E., Ciampa, A., Capozzi, F., Rustad, T., Dikiy, A. NMR approach for monitoring post-mortem changes in Atlantic salmon fillets stored at 0 and 4°C. *Food Chemistry* (2015) 1, 12-22.
- Tejada, M. *ATP-derived products and K-value determination Fishery products*. Wiley-Blackwell (2009), 68-88.
- Teresa W., Fan M., Lane A, N. (2016). Applications of NMR spectroscopy to systems biochemistry. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 92-93, 18-53.
- Tolstorebrov I., Eikevik T, M., Bantle M. (2016). Effect of low and ultra-low temperature applications during freezing and frozen storage on quality parameters for fish. *International journal of refrigeration*, 63, 37-47.
- Vidal N, P., Manzanos, M, J., Goicoechea E., Guillén M, D. Quality of farmed and wild sea bass lipids studied by  $^1\text{H}$  NMR: Usefulness of this technique for differentiation on a qualitative and a quantitative basis. *Food Chemistry* 135 (2012) 1583–1591.

## RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE ENTEROBACTÉRIAS ISOLADAS A PARTIR DE FRUTAS E HORTALIÇAS COMERCIALIZADAS EM CAPANEMA, PARÁ

### **Suania Maria do Nascimento Sousa**

Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas (UFPA-ICB)  
Belém-PA

### **Cintya de Oliveira Souza**

Instituto Evandro Chagas (IEC), Seção de Bacteriologia e Micologia  
Ananindeua-PA

### **Fagner Freires de Sousa**

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará (IFPA)  
Cametá-PA

### **Patrícia Suelene Silva Costa Gobira**

Universidade Federal do Pará, Rede de Biodiversidade e Biotecnologia (UFPA-BIONORTE)  
Belém-PA

### **Hellen Kempfer Philippsen**

Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA)  
Capanema-PA

**RESUMO:** Os alimentos de origem vegetal têm sido apontados como fontes de contaminação de microrganismos patogênicos, especialmente em condições em que os padrões de segurança dos alimentos apresentam falhas. As infecções por esses microrganismos podem ainda ser de difícil tratamento caso os mesmos adquiram resistência aos antimicrobianos. Assim, objetivou-se analisar as condições higiênic-

sanitárias de frutas e hortaliças comercializadas em feiras-livres e no mercado municipal da cidade de Capanema, Pará, bem como, traçar o perfil de resistência antimicrobiana dos microrganismos identificados. O levantamento das condições higiênico-sanitárias foi efetuado por meio da aplicação de um *check-list* baseado na Resolução RDC nº 216 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e para a identificação dos microrganismos e testes de sensibilidade aos antimicrobianos foi utilizado o equipamento *Vitek 2*. De modo geral, 65% dos pontos comerciais avaliados foram classificados como “ruins”. Nas análises microbiológicas 12 gêneros de bactérias foram identificados, sendo que os mais frequentes foram *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia* e *Pseudomonas*. Os microrganismos isolados passaram por testes de sensibilidade aos antimicrobianos, visando traçar o perfil de resistência bacteriana a diversos antibióticos. As bactérias mais resistentes foram as dos gêneros *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Pseudomonas*, e os antimicrobianos aos quais os microrganismos apresentaram maior resistência foram Ampicilina, Cefoxitina, Cefuroxima Axetil, Ampicilina/Sulbactam e Colistina.

**PALAVRAS-CHAVE:** hortifrútis; resistência bacteriana; segurança dos alimentos.

**ABSTRACT:** Foods of plant origin have been

identified as sources of contamination of pathogenic microorganisms, especially in conditions where food safety standards are faulty. Infections by these microorganisms can still be difficult to treat if they become resistant to antimicrobials. The objective of this study was to analyze the hygienic-sanitary conditions of fruits and vegetables marketed in fairs and in the municipal market of the city of Capanema, Pará, as well as to outline the antimicrobial resistance profile of the identified microorganisms. The survey of hygienic-sanitary conditions was carried out through the application of a checklist based on Resolution RDC nº 216 of the National Agency of Sanitary Surveillance (ANVISA) and for the identification of the microorganisms and antimicrobial susceptibility tests the Vitek equipment was used. In general, 65% of the commercial points evaluated were classified as “bad”. In the microbiological analyzes 12 genera of bacteria were identified, the most frequent being *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia* and *Pseudomonas*. The isolated microorganisms underwent antimicrobial sensitivity tests, aiming to trace the bacterial resistance profile to several antibiotics. The most resistant bacteria were *Klebsiella*, *Enterobacter* and *Pseudomonas*, and the most resistant microorganisms were Ampicillin, Cefoxitin, Cefuroxime Axetil, Ampicillin / Sulbactam and Colistin.

**KEYWORDS:** hortifrútiis; bacterial resistance; food safety.

## 1 | INTRODUÇÃO

A poucas décadas atrás, uma das maiores preocupações da saúde pública girava em torno das doenças de origem alimentar, o que era motivo de um alto índice de mortalidade. Porém, esse cenário teve sua mudança com a chegada dos antibióticos, o que trouxe maior sucesso no combate a essas enfermidades, diminuindo os casos de morte. No entanto, logo os microrganismos desenvolveram a capacidade de resistir aos fármacos, tornando essa resistência um novo desafio para a terapia médica (Seibert *et al.*, 2014).

Os alimentos de origem vegetal têm sido apontados como grandes veiculadores de microrganismos patogênicos (Bezerra, 2015), e os mesmos podem ser de difícil tratamento caso apresentem resistência aos medicamentos. Esses alimentos também podem ser um meio de propagação da resistência entre o meio ambiente e o ser humano. Desta forma, é importante que a segurança dos alimentos seja priorizada, minimizando assim os riscos de infecções alimentares e de disseminação da resistência antimicrobiana.

Bertolino (2010) aponta que é necessário que o alimento seja seguro e não apresente falhas que possibilitem a contaminação do produto, pois não basta que o mesmo tenha boa aparência, odor, sabor e uma bela embalagem, é importante que os alimentos sejam disponibilizados em quantidade e qualidade adequadas.

Segundo Souza (2006) o anseio pela melhoria contínua, o aumento das preocupações com os consumidores e da competitividade entre as organizações, fez

com que o comércio desenvolvesse procedimentos que visassem aumentar a qualidade sanitária dos produtos comercializados. A partir disso, surgiram as Boas Práticas de Fabricação (BPF), que são procedimentos necessários para garantir a qualidade sanitária dos alimentos, abordando a estrutura física da organização, a disposição de equipamentos e utensílios, higiene e comportamento dos manipuladores de alimentos, higienização e sanitização de superfícies e fluxos dos processos desenvolvidos.

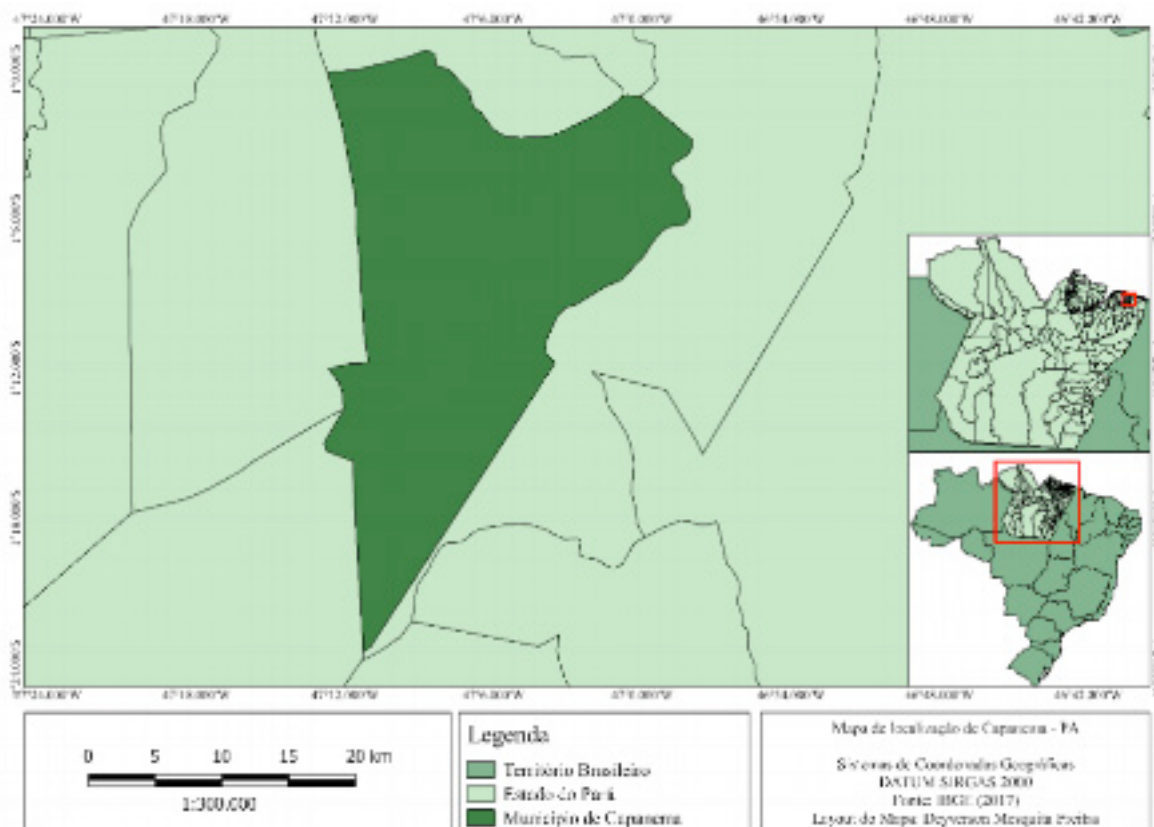
As feiras-livres, por exemplo, são locais com características específicas que geralmente possuem situações favoráveis para o crescimento e proliferação de microrganismos. Os problemas verificados nesses locais podem estar, muitas vezes, relacionados as más condições higiênico-sanitárias das bancas, que podem estar quebradas, mofadas, úmidas e sujas, e ainda, por conta de vestimenta inadequada dos manipuladores e higiene incorreta dos produtos comercializados (XAVIER, 2009).

Na cidade de Capanema, o mercado municipal e as feiras-livres são as principais fontes de alimentos para a população local e municípios vizinhos, sendo destaque na comercialização de frutas e hortaliças e atraindo centenas de pessoas por dia. Com base nesse contexto, objetivou-se com essa pesquisa analisar as condições higiênico-sanitárias de frutas e hortaliças comercializadas em Capanema, Pará, bem como, traçar o perfil de resistência antimicrobiana dos microrganismos identificados.

## **2 | METODOLOGIA**

### **2.1 Tipo de pesquisa e caracterização do local de estudo**

Esta é uma pesquisa quantitativa e de delineamento transversal que foi realizada no mercado municipal e em uma feira-livre da cidade de Capanema, Pará, durante o ano 2017. A cidade localiza-se aproximadamente 160 km da capital do Estado. Situa-se no Nordeste paraense, próxima às coordenadas: latitude 01°11'45" sul e longitude 47°10'51" oeste, em uma altitude de 24m. O município (Figura 1) possui 614,693m<sup>2</sup> de extensão rica em calcário.



## 2.2 Amostragem e levantamento de dados sobre as condições higiênico-sanitárias

Nos locais de estudo foram identificados 22 pontos comerciais de frutas e hortaliças, 9 no mercado municipal e 13 na feira-livre. Para cada comerciante, foi apresentado um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), o qual foi assinado por 20 (91%) vendedores, 7 no mercado municipal e 13 na feira-livre, concordando em participar da pesquisa, sendo este o método de inclusão adotado, sendo excluídos do estudo aqueles que não concordaram em participar da pesquisa.

Aos participantes foi aplicado um questionário *check-list* baseado na Resolução RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), contendo questões relativas às condições sanitárias do comércio de alimentos, sendo composto por 22 quesitos de avaliação divididos em quatro critérios, como demonstrado na tabela 1.

ETAPAS	CRITÉRIOS	Nº DE QUESITOS
1	Instalações	7
2	Utensílios	4
3	Manipuladores	5
4	Higiene dos alimentos	6
<b>TOTAL</b>		<b>22</b>

Tabela 1: Etapas e número de quesitos utilizados para a avaliação por *check-list*.

Os pontos comerciais avaliados foram classificados com base no que é indicado

pela ANVISA, de três formas, como BOM: 75 a 100% de atendimento; REGULAR: 50 a 74,9% de atendimento e RUIM: de 0 a 49,9% de atendimento dos quesitos.

## 2.3 Amostragem e análises microbiológicas

Para as análises microbiológicas, foram selecionadas aleatoriamente 10 barracas de venda, 4 no mercado municipal e 6 na feira-livre, e de cada uma foram coletadas 3 amostras de hortifrútis, compostas por maçãs, goiabas, coentro, couve e alface.

Após a coleta, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Enteroinfecções Bacterianas II, da Seção de Bacteriologia e Micologia do Instituto Evandro Chagas, Pará. Para análise de *Salmonella* spp. e outras possíveis enterobactérias foi utilizada uma metodologia adaptada da disposta no Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial de *Salmonella* spp. de 2011, do Ministério da Saúde, Brasil.

As amostras foram maceradas, e 25 gramas de cada alimento foram adicionadas em 225mL de Caldo Lactosado e incubado a 35°C por 24 horas. Após esse período, para enriquecimento em caldo seletivo, foi coletado 1mL de cada amostra para 10mL de cada um dos seguintes caldos: Tetracionato (TT), Rappaport (RP) e Gram Negativo (GN). Os tubos contendo os caldos foram então homogeneizados, os caldos GN e TT foram incubados a 35°C/24h e os caldos RP a 42°C/24h. Em seguida, os caldos TT e RP foram semeados em placas contendo meio Ágar SS (*Salmonella Shigella*) e em placas de meio Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD), já o caldo GN foi semeado em meio MacConkey (MC) e ambos foram incubados a 35°C/24h. As colônias com características suspeitas de enterobactérias foram semeadas em tubos contendo Ágar tríplice açúcar e ferro (TSI) e incubadas a 35°C/24h para possível identificação presumtiva e posterior identificação bioquímica e testes de sensibilidade. A identificação bioquímica das cepas cultivadas e o teste de sensibilidade aos antimicrobianos foram realizadas por meio de sistema automatizado *Vitek 2*.

## 2.4 Análise dos dados

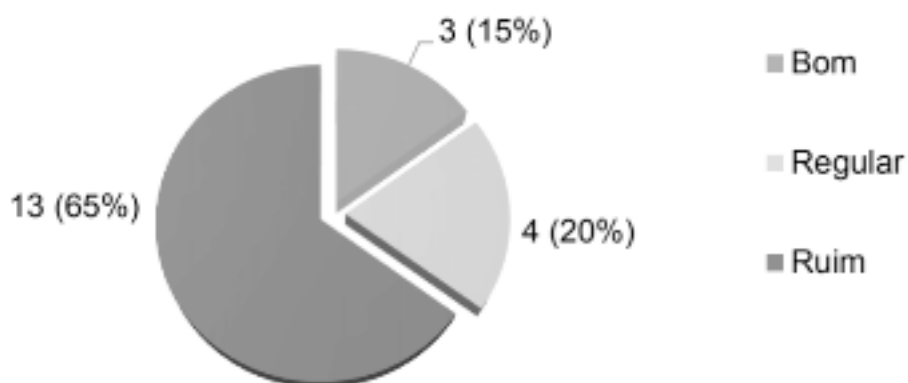
Para análise final, todos os dados das condições higiênico-sanitárias e análises microbiológicas foram tabulados em planilhas eletrônicas através do software Microsoft Excel® 2016, onde também foram gerados os gráficos e tabelas.

# 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 3.1 Análise por *check-list*

Com base nos dados levantados por meio do *check-list*, verificou-se que os pontos comerciais estudados, tanto no mercado municipal quanto na feira-livre, apresentavam vários critérios em não conformidade com o que é indicado pela ANVISA. Assim, dos 20 pontos de vendas analisados, 13 (65%) foram classificados como ruins, seguidos

de 4 (20%) classificados como regulares e apenas 3 (15%) como bons (Figura 2).



Entre os critérios avaliados, as instalações dos pontos de vendas foi o que apresentou menor atendimento aos quesitos, com apenas 41,5% dos locais em conformidade com a legislação vigente. Santos *et al.* (2015) avaliaram as condições higiênico-sanitárias do comércio de alimentos em uma feira de Recife-PE e obtiveram resultados semelhantes, onde o percentual de atendimento dos quesitos de instalações foi de apenas 41,74%, um valor considerado baixo.

Os maiores problemas identificados nas instalações foram a ausência de um local adequado para a estocagem de lixo e a falta de abastecimento de água corrente, fatores estes que podem provocar a contaminação dos alimentos e, conseqüentemente, pôr em risco a saúde dos consumidores. Segundo a RDC nº 216/2004 os resíduos devem ser frequentemente coletados e estocados em local fechado e isolado da área de armazenamento dos alimentos para que sejam evitados focos de contaminação e atração de vetores e pragas urbanas.

Os percentuais de atendimento de cada critério nos dois setores de estudos estão apresentados na tabela 2. Além dos problemas identificados nas instalações, diversas falhas também foram detectadas em relação aos outros critérios avaliados, tais como utensílios de material contaminante, de difícil higienização e armazenados em locais impróprios, não uso de uniformes adequados por parte dos manipuladores e armazenamento inadequado das frutas e hortaliças, estando as mesmas desprotegidas de insetos, poeira e outros fatores que podem colocar em risco a segurança dos alimentos.

Critérios avaliados	Nº de quesitos	Setores	
		Mercado Municipal (%)	Feira-livre (%)
Instalações	7	41	42
Utensílios	4	75	67
Manipuladores	5	34	57
Higiene dos alimentos	6	50	47

Tabela 2: Percentual de atendimento aos critérios avaliados em cada setor

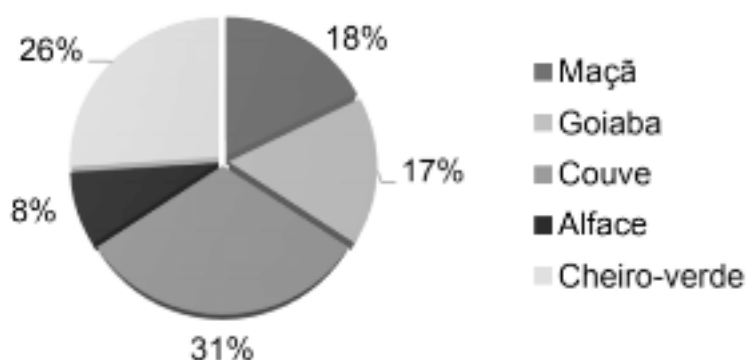
Ferreira *et al.* (2016), também utilizaram uma lista de verificação baseada na

RDC nº 216 da ANVISA, com o intuito de analisar as boas práticas de manipulação de frutas e hortaliças comercializadas em feires-livres de Vitória - ES e as classificaram como regular, com o percentual de adequação das barracas variando de 50 a 64,51%.

Outro trabalho semelhante foi desenvolvido por Raimundo *et al.* (2015) em Curitiba-PR, a fim de avaliar as boas práticas em serviços de alimentação do mercado municipal da cidade. Com este estudo os autores observaram que os estabelecimentos atendiam entre 50 a 75% aos quesitos avaliados, sendo também classificadas como regular. O mesmo autor ressalta que embora o programa de Boas Práticas tenha caráter obrigatório no que compete os serviços de alimentação, diversos locais ainda se encontram em desacordo com os requisitos exigidos pela legislação sanitária e que isto deve ser revisto e melhorado para garantir que as más condições higiênicas-sanitárias não coloquem em risco a saúde dos consumidores.

### 3.2 Análises Microbiológicas

Análises microbiológicas foram realizadas em 30 amostras, coletadas em 10 das 20 barracas que compuseram a amostragem do estudo. Entre os hortifrúteis analisados, as amostras de couve foram as que apresentaram maior frequência (31%) de microrganismos, enquanto que a alface foi a que apresentou menor quantidade (8%), como pode ser observado na figura 3.

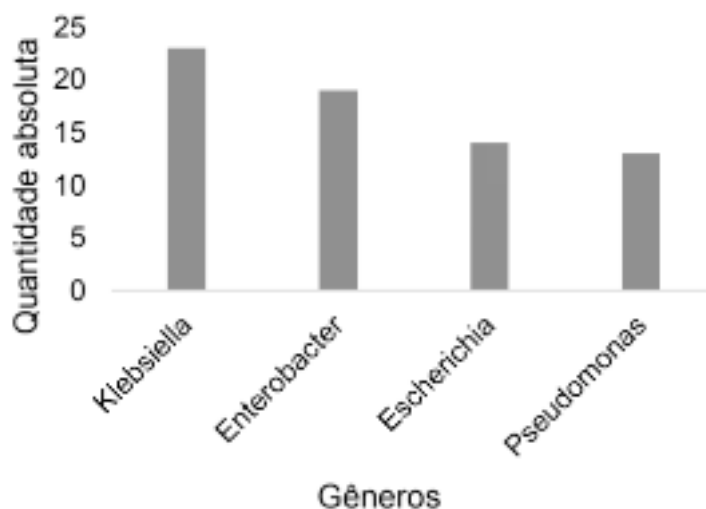


Segundo Pinheiro *et al.* (2005), hortaliças como couve, cheiro-verde e alface são facilmente contaminadas por microrganismos, seja pelas más práticas de manipulação ou através da água de irrigação ou do solo, enquanto que goiabas e maçãs geralmente são ingeridas com casca, facilitando a transmissão de possíveis bactérias para os consumidores, risco que pode ser minimizado quando as frutas são descascadas antes de consumidas, pois a casca pode funcionar como uma barreira parcial para a penetração dos microrganismos.

Entre os microrganismos que podem ser transmitidos por alimentos, um dos que mais causam preocupação à saúde pública são as bactérias do gênero *Salmonella*. No presente estudo, em nenhuma das amostras foi detectada a presença de *Salmonella* spp., porém, diversos outros gêneros bacterianos foram observados, sendo eles: *Acinetobacter*, *Kluyvera*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Aeromonas*, *Citrobacter*,



*Cronobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Proteus* e *Escherichia*. Entre estes, os gêneros mais frequentes foram *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia* e *Pseudomonas* (Figura 4).



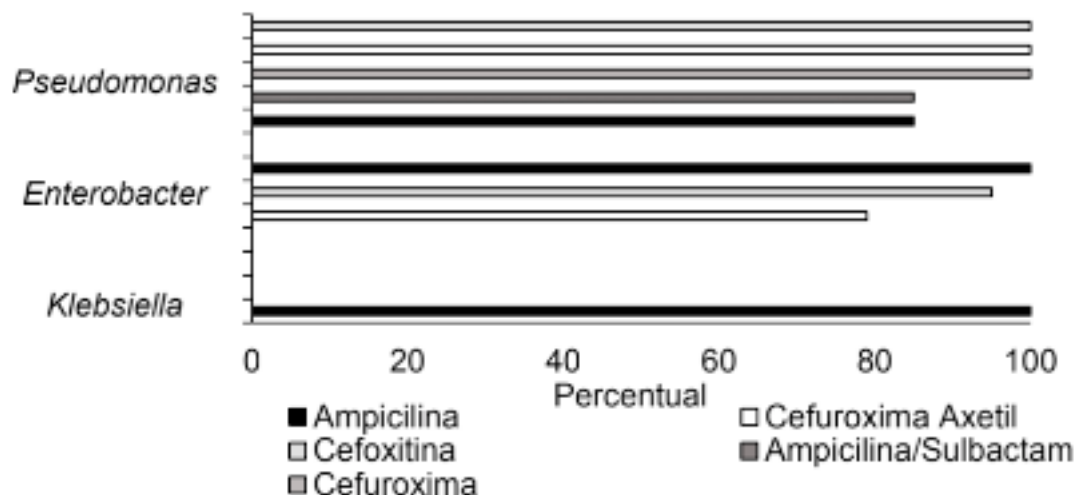
As bactérias do gênero *Klebsiella* e *Enterobacter* podem desenvolver reações indesejadas nos alimentos, acelerando a deterioração dos mesmos. As *Enterobacter* são integrantes naturais da microbiota intestinal do ser humano, porém, assim como *Pseudomonas*, são também oportunistas, podendo tornar-se agentes de doenças de origem alimentar (Franco, 2003).

Os resultados aqui apresentados corroboram com os dados levantados por Welker *et al.*, (2010). Esses autores realizaram análises microbiológicas em alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos ocorridas no estado do Rio Grande do Sul e detectaram que *Escherichia coli* também foi o terceiro microrganismos mais frequente nas amostras analisadas, ficando atrás apenas de *Salmonella* spp. e *Staphylococcus coagulase* positiva.

Barbosa (2014) avaliando o perfil microbiológico de amostras de couves comercializadas em supermercados da cidade de Brasília também detectou a presença de diferentes microrganismos entéricos, tais como *Salmonella*, *Escherichia coli*, *S. aureus* e *Listeria monocytogenes*, concluindo que essas hortaliças representavam riscos aos clientes.

### 3.3 Resistência aos Antimicrobianos

A partir das amostras coletadas foram isoladas 96 cepas bacterianas, as mesmas foram submetidas ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos, sendo testada a resistência dos microrganismos contra diversos antibióticos. Entre as cepas isoladas, 83 (86,4%) foram resistentes a um ou mais antimicrobianos, sendo que dos gêneros com maior frequência, *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Pseudomonas* foram os que se mostraram mais resistentes. As cepas de *Klebsiella* e *Enterobacter*, por exemplo, foram 100% resistentes a Ampicilina, enquanto que *Pseudomonas* apresentaram maior resistência aos fármacos Cefuroxina, Cefuroxina Axetil e Cefoxitina (100%) (Figura 5).



Santana *et al.* (2012), investigaram a resistência de *Klebsiella pneumoniae* e verificaram que 90% das cepas apresentaram resistência a ampicilina. Esses dados podem ser comparados aos do presente trabalho, sendo que ambos mostraram que essa droga pode ser ineficiente para o tratamento de infecções causadas por *Klebsiella* spp., já que se mostram significativamente resistentes ao fármaco.

Na tabela 3 podem ser observados todos os gêneros isolados nesse trabalho, a partir de cada tipo de amostra, e o perfil de resistência que as bactérias apresentaram a cada antimicrobiano testado.

Amostra (N°)	Gêneros isolados (N°)	% Resistências aos antibióticos																	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Maçã (17)	<i>Cronobacter</i> (1)	-	-	-	100	100	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Enterobacter</i> (7)	100	100	-	-	71	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14	-
	<i>Escherichia</i> (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Klebsiella</i> (4)	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Pantoea</i> (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Pseudomonas</i> (1)	100	100	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Serratia</i> (2)	100	100	-	100	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-
Goiaba (16)	<i>Enterobacter</i> (9)	100	100	-	-	100	89	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Klebsiella</i> (7)	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Couve (30)	<i>Acinetobacter</i> (5)	100	-	-	100	100	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Aeromonas</i> (3)	100	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Citrobacter</i> (2)	100	100	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Enterobacter</i> (3)	100	100	-	33	33	100	-	67	-	67	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Escherichia</i> (5)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Klebsiella</i> (4)	100	-	-	100	100	100	-	100	-	100	-	-	-	-	-	-	-	25
	<i>Kluyvera</i> (2)	100	-	-	100	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Proteus</i> (3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	67	-	-	-	-	100	100	-
	<i>Pseudomonas</i> (2)	100	100	-	100	100	100	-	50	-	-	-	-	-	-	-	50	-	-
	<i>Serratia</i> (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	100	-
Alface (8)	<i>Escherichia</i> (3)	33	33	-	33	33	-	-	-	-	33	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Klebsiella</i> (1)	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Pseudomonas</i> (4)	50	50	-	100	100	100	-	25	-	-	-	-	-	-	25	25	-	-

Cheiro-verde (25)	<i>Aeromonas</i> (1)	100	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Citrobacter</i> (4)	100	100	-	-	50	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Cronobacter</i> (2)	-	-	-	100	100	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Escherichia</i> (5)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Klebsiella</i> (7)	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Pseudomonas</i> (6)	100	100	-	100	100	100	-	83	-	-	-	-	-	-	-	-	33

1=Ampicilina, 2=Ampicilina/Sulbactam, 3=Piperacilina/Tazobactam, 4=Cefuroxima, 5=Cefuroxima Axetil, 6=Cefoxitina, 7=Ceftazidima, 8=Ceftriaxona, 9=Cefepima, 10=Ertapenem, 11=Imipenem, 12=Meropenem, 13=Amicacina, 14=Gentamicina, 15=Ciprofloxacina, 16=Tigeciclina, 17=Colistina, 18=BLSE-Betalactamase de Espectro Estendido.

Tabela 3: Perfil de resistência das bactérias identificadas aos antimicrobianos

Através dos resultados levantados no presente estudo, observa-se que entre 17 fármacos testados nenhuma das bactérias apresentou resistência aos antimicrobianos Piperacilina/ Tazobactam, Ceftazidima, Cefepima, Meropenem, Amicacina e Genamicina, podendo esses serem os mais eficazes em tratamentos contra esses microrganismos. Aos outros onze antibióticos testados foi detectada resistência de um ou mais dos microrganismos identificados. Os resultados chamam atenção quanto a resistência observada ao ertapenem para os gêneros *Klebsiella* (100%) e *Enterobacter* (67%) isolados de amostras de couve, e *Escherichia* (33%) isolado de alfaces. Este antimicrobiano pertence à classe dos carbapenêmicos, considerado de última escolha terapêutica e cuja resistência ocorre devido a atuação de enzimas (carbapenemases) codificada por genes que podem ser transferíveis entre bactérias de mesmo gênero ou gêneros diferentes.

#### 4 | CONCLUSÕES

A partir da análise por *check-list* voltada para as condições higiênico-sanitárias de frutas e hortaliças comercializadas em Capanema, Pará, concluiu-se que os critérios de avaliação propostos pela ANVISA sobre as Boas Práticas de Fabricação dos alimentos ainda não são atendidos satisfatoriamente nos locais estudados, sendo que mais de 50% dos pontos comerciais foram classificados como ruins. Diversos fatores identificados nesta análise podem influenciar a qualidade dos alimentos e maximizar os riscos de contaminação por microrganismos patogênicos e oportunistas, os quais podem apresentar vários mecanismos de resistência antimicrobiana, dificultando assim, o tratamento de possíveis infecções de origem alimentar e aumentando o risco de propagação da resistência entre bactérias de alimentos e o homem. Portanto, destaca-se a importância da prevenção de tais riscos, o que pode ser alcançado por meio de tomadas de medidas cabíveis para assegurar ao máximo a segurança dos alimentos.

## 5. REFERÊNCIAS

- Barbosa, T. A. **Avaliação da qualidade microbiológica de couves minimamente processada comercializada nos supermercados de Brasília.** Brasília, Distrito Federal: Faculdade de Ceilândia – FCE/UNB, 2015.
- Bertolino, M. T. **Gerenciamento da qualidade na indústria alimentícia: ênfase na segurança dos alimentos.** Artmed Editora, 2009.
- Bezerra, N. S. **Pesquisa de Salmonella spp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em hortaliças comercializadas em estabelecimento formal e não formal de João Pessoa-PB** (Doctoral dissertation, Universidade Federal da Paraíba), 2015.
- Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação (RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004).* Diário Oficial da União, 2004.
- Brasil, **Manual técnico de diagnóstico laboratorial de Salmonella spp.** Secretaria de Vigilância em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas, Instituto Adolfo Lutz. – Brasília: Ministério da Saúde, 2011.
- Ferreira, A. B. *et al.* **Qualidade de frutas e hortaliças orgânicas comercializadas em feiras livres.** *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 74(4), 410-419, 2016.
- Franco, B. D. G. M. **Importância dos microrganismos nos alimentos.** *Franco BDGM, Landgraf M. Microbiologia dos alimentos. São Paulo: Editora Atheneu, 1-12, 2003.*
- RAIMUNDO, G. *et al.* **Boas práticas em serviços de alimentação do mercado municipal de Curitiba-PR.** *Revista do Instituto Adolfo Lutz, Curitiba-PR, v. 74, n. 3, p. 295-300, 2015.*
- Pinheiro, N. D. S. *et al.* **Avaliação da qualidade microbiológica de frutos minimamente processados comercializados em supermercados de Fortaleza.** *Revista Brasileira de Fruticultura*, 27(1), 153-156, 2005.
- Santana, T. C. F. S. D. *et al.* **Perfil de resistência de Escherichia coli e Klebsiella spp isoladas de urocultura de comunidade do município de São Luís-MA no período de 2005-2008.** *Rev. patol. trop*, 41(3), 295-303, 2012.
- Santos, V. V. M. *et al.* **Condições higiênico-sanitárias do comércio de alimentos em feira de arte e artesanato, Recife-PE.** *Acta Veterinaria Brasilica*, 9(1), 23-33, 2015.
- Seibert, G. *et al.* **Infecções hospitalares por enterobactérias produtoras de Klebsiella pneumoniae carbapenemase em um hospital escola.** *Rev. Einstein*, São Paulo, 12(3), 2014.
- SOUZA, C. P. **Segurança alimentar e doenças veiculadas por alimentos: utilização do grupo coliforme como um dos indicadores de qualidade de alimentos.** *Revista de Atenção Primária à Saúde, Juiz de Fora, MG, v. 9, n. 1, p. 83-88, 2006.*
- Welker, C. A. D. *et al.* **Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil.** *Revista Brasileira de Biociências*, 8(1), 2010.
- XAVIER, A. Z. P. **Condições higiênico-sanitárias das feiras-livre do município de Governador Valadares.** Governador Valadares: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Vale do Rio Doce, 20009.

## USO DE FERMENTAÇÃO POR LACTOBACILOS PARA AUMENTO DAS CARACTERÍSTICAS ANTIOXIDANTES DE *Theobroma grandiflorum*

### **Amanda Caroline de Souza Sales**

Universidade CEUMA, Curso de Biomedicina.  
São Luís, Maranhão.

### **Brenda Ferreira de Oliveira**

Universidade CEUMA, Curso de Biomedicina.  
São Luís, Maranhão.

### **Hermerson Sousa Maia**

Universidade CEUMA, Curso de Biomedicina.  
São Luís, Maranhão.

### **Warlison Felipe de Silva Saminez**

Universidade CEUMA, Curso de Biomedicina.  
São Luís, Maranhão.

### **Tiago Fonseca Silva**

Universidade Federal de Pernambuco, Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia.  
Recife, Pernambuco.

### **Rita de Cássia Mendonça de Miranda**

Universidade CEUMA, Programa de Pós-graduação em Meio Ambiente e Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia (REDE BIONORTE).  
São Luís, Maranhão.

### **Adrielle Zigmignan**

Universidade CEUMA, Curso de Nutrição e Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia (REDE BIONORTE).  
São Luís, Maranhão.

### **Luís Cláudio Nascimento da Silva**

Universidade CEUMA; Curso de Biomedicina, Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana e Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia (REDE

BIONORTE).

São Luís, Maranhão.

**RESUMO:** Probióticos são microrganismos vivos, não patogênicos, que estão associados a diversos benefícios à saúde do hospedeiro. Deste modo, o desenvolvimento de produtos contendo probióticos é de suma importância, e os sucos de frutas têm sido apontados como veículos alternativos. O objetivo desta pesquisa foi avaliar o efeito da fermentação utilizando lactobacilos (*Lactobacillus fermentum* ATCC 23271 ou *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595) na atividade antioxidante do suco de Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). Inicialmente foram determinadas quais as melhores combinações de quantidades de polpa e concentração inicial de inóculo (densidade óptica a 630 nm;  $DO_{630nm}$ ) para promover o crescimento de cada lactobactéria. A viabilidade bacteriana foi aferida após 48 horas de fermentação. Conforme os resultados encontrados, as melhores condições de cultivo foram encontradas no experimento 6 ( $DO_{630nm} = 3,0$ ; 120 mg/mL de polpa). Utilizando estes parâmetros foram realizadas novas fermentações e após 48 horas foi realizada extração líquido-líquido utilizando acetato de etila. O suco não fermentado foi utilizado como controle. Foi observado que ambas fermentações lácticas aumentaram

os conteúdos de compostos fenólicos e flavonoides, assim como a capacidade de inibir os radicais DPPH (2,2- difenil-1- picrilhidrazilo) e ABTS [2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)]. Os melhores resultados antioxidantes foram encontrados com o extrato obtido do suco fermentado por *L. rhamnosus* ATCC 9595. Em conjunto, os resultados demonstram que a fermentação com *L. fermentum* ATCC 23271 ou *L. rhamnosus* ATCC 9595 é uma ferramenta eficaz no aumento do potencial antioxidante do suco de cupuaçu. Estes achados fornecem novas perspectivas para aplicação deste suco para o desenvolvimento de alimentos probióticos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Suco de Fruta. Cupuaçu. Compostos Fenólicos. Espécies Reativas.

**ABSTRACT:** Probiotics are living, non-pathogenic microorganisms that are associated with various health benefits of the host. Thus, the development of products containing probiotics is of paramount importance, and fruit juices have been highlighted as alternative vehicles. The objective of this research was to evaluate the effect of the fermentation using lactobacilli (*Lactobacillus fermentum* ATCC 23271 or *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595) on the antioxidant activity of Cupuaçu juice (*Theobroma grandiflorum*). Initially, the best combinations of pulp and initial inoculum concentrations (optical density at 630 nm; OD<sub>630nm</sub>) were determined to promote the growth of each bacteria. The bacterial viability was measured after 48 hours of fermentation. According to the results, the best cultivation conditions were found in Experiment 6 (OD<sub>630nm</sub> = 3.0, 120 mg/mL pulp). Using these parameters, new fermentations were carried out and after 48 hours liquid-liquid extraction was carried out using ethyl acetate. Unfermented juice was used as control. It was observed that both lactic fermentations increased the contents of phenolic compounds and flavonoids, as well as the ability to inhibit the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)] radicals. The best antioxidant results were found with the extract obtained from the juice fermented by *L. rhamnosus* ATCC 9595. Together, the results demonstrate that the fermentation with *L. fermentum* ATCC 23271 or *L. rhamnosus* ATCC 9595 is an effective tool for increase the antioxidant potential of cupuaçu juice. These findings provide new perspectives for the application of this juice to the development of probiotic foods.

**KEYWORDS:** Fruit juice. Cupuaçu. Phenolic Compounds. Reactive Species.

## 1 | INTRODUÇÃO

Probióticos, é um termo definido como microrganismos vivos não patogênicos que consumidos em doses adequadas, proporcionam benefícios à saúde do hospedeiro atuando na prevenção ou tratamento de determinadas doenças. Como integrante dos alimentos funcionais tem benefícios como, capacidade de sobreviver ao trato gastrointestinal, inibir a proliferação de patógenos e estimular a resposta imune do hospedeiro (DE SOUZA et al., 2018).

Dentre as bactérias probióticas, espécies do gênero *Lactobacillus* têm se destacado graças ao seu potencial terapêutico que incluem o tratamento de infecções vaginais e intestinais (RODRÍGUEZ-NOGALES et al., 2017; MARTINS; SILVA; NICOLI, 2018). Trata-se de microrganismos Gram-positivos, anaeróbios facultativos que são encontrados no trato gastrointestinal, boca, leite materno e na vagina (BOND; MORRIS; NASSAR, 2017; OUARABI et al., 2017; VERCE; DE VUYST; WECKX, 2018). Estudos têm demonstrado que produtos lácteos fermentados por *Lactobacillus* spp. são eficientes no combate de doenças relacionadas ao estresse oxidativo, distúrbios inflamatórios, dislipidemias e diabetes, além de ter efeito anti-obesidade (YADAV et al., 2018).

A fermentação láctica de produtos alimentícios é uma alternativa interessante e bastante aplicada para a obtenção de produtos diferenciados. Tradicionalmente, os produtos enriquecidos com probióticos são leites fermentados e iogurtes, sendo estes consumidos em todo o mundo (DE PRISCO; MAURIELLO, 2016). Entretanto, apesar da fermentação láctica estar muito mais frequentemente associada ao leite, ela também pode ser realizada a partir de outros substratos, como as polpas de frutas, desde que possuam açúcares fermentáveis em suas composições (DI CAGNO et al., 2013). Existe uma demanda crescente para produtos probióticos não lácteos, atendendo principalmente os consumidores que apresentam prevalência de alergia a produtos lácteos e intolerância à lactose, e as necessidades do crescente mercado vegetariano (KUMAR; VIJAYENDRA; REDDY, 2016; NEMATOLLAHI et al., 2016). Neste contexto, os sucos de frutas devido ao alto valor nutricional são apontados como uma alternativa interessante para o desenvolvimento de bebidas fermentadas com probióticos (DI CAGNO et al., 2013; FARIAS; SOARES; GOUVEIA, 2016; NEMATOLLAHI et al., 2016; SANTOS; ANDRADE; GOUVEIA, 2017).

Os sucos de frutas são ricos em vitaminas e minerais, sendo ideais tanto para a fermentação, quanto para o seu consumo. Além disso, apresentam alguns ácidos importantes, como o cítrico, que funciona como acidulante, e o málico, por possuir características organolépticas (FARIAS; SOARES; GOUVEIA, 2016). No Brasil, há uma grande quantidade de frutas tropicais com sabores exóticos e atrativos ao consumidor (FARIAS, 2016). Dentre elas temos o Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), encontrada no noroeste do Maranhão e em outras regiões, que é uma fruta de grande potencial comercial, devido à sua polpa aromática, seu teor de acidez e seu gosto muito agradável. Seu valor nutricional encontra-se na polpa, sendo utilizada para a elaboração de diferentes produtos como sorvete, creme, torta, suco, licores (GALVÃO et al., 2017).

Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da fermentação utilizando as cepas do gênero *Lactobacillus* (*L. rhamnosus* ATCC 9595 ou *L. fermentum* ATCC 23271) na atividade antioxidante do suco de *T. grandiflorum*. Para isto, foram inicialmente avaliadas as melhores condições de fermentação que propiciaram uma maior sobrevivência da bactéria no suco, e após, foram realizadas as

avaliações comparativas do conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides e da ação antioxidante em extratos obtidos a partir dos sucos fermentados e não fermentados.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção e Ativação dos Microrganismos

As linhagens de bactérias (*L. fermentum* ATCC 23271 ou *L. rhamnosus* ATCC 9595) utilizadas neste estudo foram obtidas da Bacterioteca da Universidade Ceuma. Cada linhagem foi ativada em caldo de MRS (De Man, Rogosa e Sharpe) incubada por 24h a 37°C para atingir a absorvância de 0,600. correspondente a 10<sup>9</sup> UFC/mL na escala de MacFarland.

### 2.2 Amostra e Preparo do Suco de Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*)

O fruto de cupuaçu (*T. grandiflorum*) foi coletado na cidade de São Luís do Maranhão. Foi lavado, cortado manualmente com faca de aço inoxidável, em seguida processado no liquidificador para a obtenção da polpa que foi armazenada para uso futuro. Em cada experimento, uma determinada quantidade de polpa, foi dissolvida em 250 mL de água destilada e o pH foi ajustado para 6,0. Cada suco foi submetido à autoclavagem.

### 2.3 Fermentação com lactobacilos

Para a fermentação foi preparado um pré-inóculo de cada lactobacilo em caldo MRS (De Man, Rogosa & Sharpe) a 37 °C por agitação (120 rpm). Após 24 h, alíquotas de 1 mL da suspensão de *L. rhamnosus* ATCC 9595 (nas concentrações mostradas na tabela 1) foram inoculadas nos sucos, nove combinações de diferentes quantidades de polpa e concentração de inóculo (determinado por densidade ótica a 630 nm; DO<sub>630</sub>) para determinar as melhores condições de crescimento bacteriano.

Experimento	Densidade do inóculo (DO <sub>630nm</sub> )	Concentração da polpa (mg/mL)
1	0,1	40
2	2,1	64,6
3	0,1	175,4
4	2,1	200
5	1,0	40
6	3,0	120
7	1,55	40
8	1,55	200
9	1,55	120

Tabela 1: Valores das concentrações do inóculo bacteriano e quantidade de polpa de T.



## 2.4 Quantificações da Viabilidade Celular e Determinação do pH

A quantificação da viabilidade celular foi realizada pelo plaqueamento da bactéria, onde foram feitas as diluições seriadas em solução salina 0,9% (m/v), contendo bactérias e essas diluições foram plaqueadas em placa de Petri contendo meio ágar MRS e em seguida incubadas por 48h a 37°C.

## 2.5 Extração Líquido-Líquido

Após a determinação das melhores condições de crescimento bacteriano, foi realizado um processo de extração líquido-líquido para obtenção das substâncias antioxidantes. Para isso, foram adicionados 50 mL de acetato de etila a 50 mL de cada amostra de suco. Após 24 horas, as fases contendo o solvente foram recuperadas e submetidas à secagem. Os extratos obtidos foram armazenados para posterior uso.

## 2.6 Dosagem de Compostos Fenólicos

A metodologia seguiu o proposto por McDonald et al. (2001). Utilizando 200  $\mu$ L das amostras (concentração de 1000  $\mu$ g/mL) foram adicionadas em tubos de ensaio e 1,0 mL de reagente de Folin-Ciocalteu. Transcorrido três minutos, adicionou-se 800  $\mu$ L de carbonato de sódio (7,5%). A mistura foi incubada à temperatura ambiente, em ambiente escuro e em repouso durante 2 horas. Em seguida as amostras tiveram suas absorvâncias medidas em espectrofotômetro no comprimento de onda 735 nm. A quantidade de fenóis foi calculada em mg/g Equivalente de Ácido Gálico (EAG) da curva de calibração da solução padrão de ácido gálico. O procedimento foi realizado em Triplicata.

## 2.7 Dosagem de Flavonoides

A dosagem de flavonoides foi realizada pela metodologia proposta por Woisky e Salatino (1998) com algumas modificações. Foram utilizados 100  $\mu$ L das amostras (concentração de 1000  $\mu$ g/mL) e misturadas com 100  $\mu$ L da solução reagente (2 g de Cloreto de Alumínio diluído em 100 mL da solução de etanol a 2%) em placa de 96 poços. A mistura foi deixada em temperatura ambiente incubada durante 60 min em ambiente escuro. A absorvância foi medida por espectrofotometria à 420 nm. A quantidade de flavonoides foi calculada em mg/g equivalente de Quercitina (EQ). O procedimento foi feito em Triplicata.

## 2.8 Ensaio DPPH

Neste ensaio a atividade de radical livre do extrato foi medida em termos de hidrogênio doado usando o DPPH radical estável (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo; Sigma-Aldrich) (BLOIS, 1958). Uma alíquota de 250  $\mu$ L de solução de DPPH (1mM) foi

misturada com 40  $\mu$ L de diferentes concentrações da amostra (31,25 – 1000  $\mu$ g/mL). Vinte e cinco minutos mais tarde, a absorbância foi medida no leitor de Elisa a 517 nm. O Ácido Gálico foi utilizado como o composto de referência. A sequestradora de radicais livres foi calculada usando a seguinte fórmula:

$$[\text{DPPH}] (\%) = (\text{Ac} - \text{Aa}) / \text{Ac} \times 100$$

Onde: Ac = controle de absorção; Aa = Absorbância da Amostra

## 2.9 Método do ABTS

Neste ensaio a atividade de radical livre da amostra foi medida em termos de hidrogênio doado usando o ABTS radical estável (2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) (REE et al., 1999). Foi utilizado 20  $\mu$ L da amostra e 250  $\mu$ L da solução reagente ABTS (30 mg do ABTS, 379,4 mg de persulfato de Potássio e 0,137 mL de solução de persulfato). E realizado leitura por espectrofotômetro (734 nm) após 6, 15, 30, 45, 60 e 120 minutos de incubação.

$$\text{Inibição} (\%) = (\text{Ac} - \text{Aa}) / \text{Ac} \times 100$$

Onde, Ac é absorbância do controle e Aa é absorbância da amostra.

## 2.10 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise por estatística descritiva, sendo expressos como média  $\pm$  desvio-padrão. A análise estatística foi realizada utilizando o software Graphpad Prism (versão 5.03), empregando-se a análise de variância (ANOVA) para determinar as diferenças entre as médias a um nível de significância  $p < 0,05$ . A determinação da IC50 (concentração capaz de inibir 50% do radical) foi realizada por regressão linear.

# 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 3.1 Otimização das condições de Crescimento de *L. rhamnosus* ATCC 9595 e *L. fermentum* ATCC 23271 no meio à base de suco de *T. grandiflorum*

A primeira etapa do trabalho foi determinar as melhores condições de crescimento das duas linhagens de *Lactobacillus* no meio à base de *T. grandiflorum*. Foram realizados nove experimentos com diferentes concentrações de inóculo e quantidade de polpa (Tabela 1). Em relação aos resultados com *L. fermentum* ATCC 23271, foram encontrados os altos níveis de crescimento bacteriano (maiores que 13 Log CFU/mL) após 48 horas de cultivo em todas as condições testadas (Figura 1B), o que também foi evidenciado pela diminuição dos valores de pH (<4). Esta linhagem não foi capaz

de crescer nas condições do experimento 8.

Dentre as combinações avaliadas, os melhores resultados de crescimento foram encontrados no experimento 6 (20,30 Log CFU/mL), onde foram usados alta densidade bacteriana como inóculo ( $DO_{630nm} = 3,0$ ) em 120 mg/mL de polpa de *T. grandiflorum*. Esta condição apresentou valor de CFU superiores a todas as outras ( $p < 0,05$ ). Valores elevados de crescimento de *L. fermentum* ATCC 23271 foram também encontrados nas condições dos experimentos 9 (18,91 Log CFU/mL), 7 (18,30 Log CFU/mL) que utilizaram uma densidade intermediária de inóculo ( $DO_{630nm} = 1,55$ ) combinada com 120 mg/mL e 40 mg/mL de polpa. Nos experimentos 2 e 3 foram detectados índices de crescimento de 17,60 Log CFU/mL e 17,83 Log CFU/mL, respectivamente. Estes valores foram estatisticamente semelhantes ( $p > 0,05$ ), mesmo tendo sido utilizando valores bem diferentes de inóculo ( $DO_{630nm} = 2,1$  e  $0,1$ ) e polpa a adição de inóculo (64,6 mg/mL e 175,4 mg/mL). Em adição, os menores valores de CFU foram detectados no experimento 1 (aproximadamente 13 Log CFU/mL), como esperado neste experimento se utilizou as menores concentrações de polpa (10 g) e inóculo bacteriano menos denso ( $DO_{630nm} = 0,1$ ). Todos estes dados apontam que as duas variáveis utilizadas em nosso estudo (concentração da polpa e do inóculo) afetam a taxa de crescimento de *L. fermentum* ATCC 23271.

*L. rhamnosus* ATCC 9595 foi capaz de crescer em todas as combinações testadas, alcançando índices de crescimento superiores a 12 log CFU/mL (Figura 1A). Em todas as condições avaliadas foi observada a diminuição dos valores de pH de 6 para 4, sugerindo que *L. rhamnosus* ATCC 9595 foi capaz de crescer e produzir ácidos orgânicos (FARIAS; SOARES; GOUVEIA, 2016). É importante destacar ainda que estas altas taxas de crescimento foram obtidas sem a suplementação do suco, sendo apenas ajustado o valor de pH para 6,0.

Os melhores resultados foram observados nas condições do experimento 6 onde foram utilizadas 120 mg/mL de polpa de *T. grandiflorum* e a densidade inicial (630 nm) foi de 3,0 do inóculo de *L. rhamnosus* ATCC 9595. Nestas condições foi detectado um crescimento na ordem de 20 Log CFU/mL após 48 horas de cultivo, valor significativamente superior às outras condições (Figura 1A). Nos outros experimentos (8 e 9) que utilizaram as maiores concentrações de polpa (200 mg/mL e 120 mg/mL) associados com uma densidade média de inóculo ( $DO_{630nm} = 1,55$ ) também foram observadas altas taxas de crescimento microbiano (aproximadamente 19 logs CFU/mL). Os menores índices de crescimento (aproximadamente 13 logs CFU/mL), por sua vez, foram obtidos nos experimentos 1 e 7 quando baixas quantidades de polpa foram utilizadas (40 mg/mL) em combinação com inóculo de densidade baixa ( $DO_{630nm} = 0,1$ , experimento 1) ou intermediária ( $DO_{630nm} = 1,55$ , experimento 1). Estes dados denotam que a concentração da polpa é um fator determinante para o crescimento do microrganismo, como esperado.

A polpa do cupuaçu tem característica ácida, sendo rica em compostos voláteis e sais minerais. Possui alto teor de pectina, fibras, ésteres (butanoato de etila e

hexanoato de etila), assim como de ácido ascórbico e de açúcares, assim contribui para o crescimento de microrganismos (MARTIM, 2012). Tais resultados corroboram com os de Farias, Soares e Gouveia, (2016) que encontraram uma alta viabilidade celular 8,78 Log UFC/mL, quando fermentou o suco de maracujá com *L. rhamnosus* ATCC 7469. Inicialmente, as concentrações celulares (0h) foram de 6,72 Log CFU/mL, 7,72 Log CFU/mL e 8,41 Log CFU/mL para os inóculos com 0,1%, 1% e 5% v/v, respectivamente. Ao final da fermentação, a viabilidade celular aumentou para 7,84 Log CFU/mL e 9,52 Log CFU/mL, nos inóculos de 0,1% e 1%, respectivamente, ficando praticamente constante no inóculo a 5% v/v, com 8,78 Log CFU/mL.

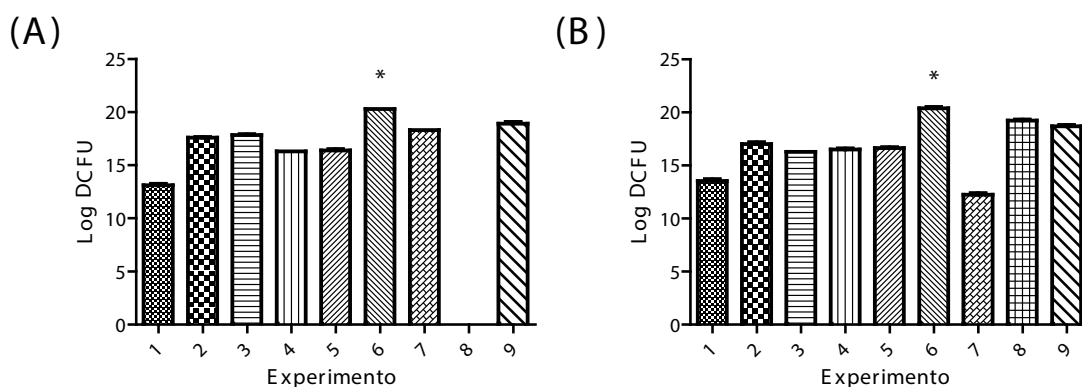


Figura 1: Otimização das condições de cultivos de crescimento de *L. fermentum* ATCC 23271 e *L. rhamnosus* ATCC 9595 em suco de *T. grandiflorum*. (\*) Ensaio com maior crescimento bacteriano ( $p < 0,05$ ).

Costa et al. (2013) e Fonteles et al. (2011) também obtiveram altas taxas de crescimento celular (8,34 e 8,98 Log CFU/mL, respectivamente), quando fermentaram suco de abacaxi e de melão utilizando o probiótico *L. casei*. Pereira et al. (2013) observaram viabilidade similar (8,3 Log CFU/mL) quando fermentaram suco de caju com *L. casei*. Os sucos de frutas podem apresentar ótimo veículo para incorporação de probióticos, dado que contêm quantidades elevadas de açúcares que estimulam seu crescimento.

### 3.2 A fermentação láctica aumentou o conteúdo de compostos fenólicos no suco de *T. grandiflorum*

De acordo com os resultados encontrados nos experimentos de crescimento bacteriano, as condições de cultivo utilizadas no experimento 6 ( $DO_{630nm} = 3,0$  e 120 mg/mL de polpa) foram selecionadas para avaliação do efeito da fermentação láctica na ação antioxidante e teores de compostos fenólicos e flavonoides. Para tanto, após 48 horas de fermentação, os sucos foram submetidos à extração com acetato de etila.

A quantificação do conteúdo de fenólicos totais nos extratos dos sucos de *T. grandiflorum* fermentados ou não por *Lactobacillus* spp. são apresentados na Figura

2. Em ambos os casos foi observado aumento no teor destes compostos. Verificou-se que o extrato do suco fermentado por *L. fermentum* ATCC 23271 apresentou aumento significativo ( $p < 0,05$ ) nos níveis de compostos fenólicos ( $11,20 \pm 0,71$  mg EAG/g), em relação ao extrato obtido do suco não fermentado ( $7,94 \pm 0,71$  mg EAG/g). Este efeito também foi observado na fermentação utilizando *L. rhamnosus* ATCC 9595 que apresentou aumento na ordem de 2 vezes ( $17,83 \pm 0,79$  mg EAG/g).

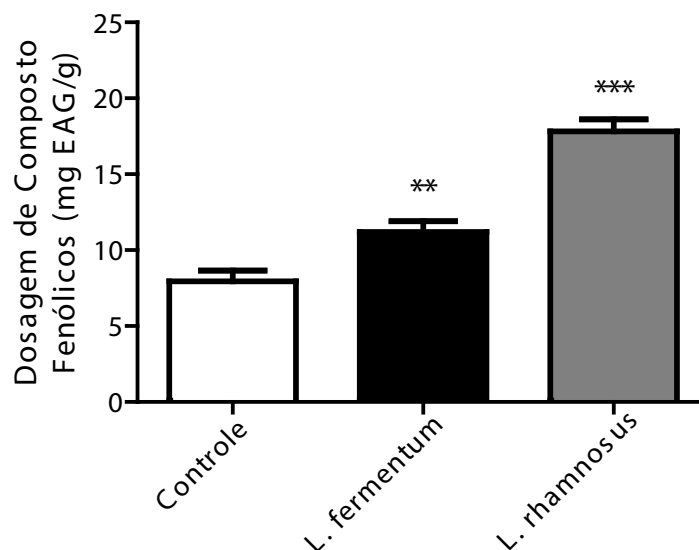


Figura 2: Quantificação de composto fenólico total nos sucos fermentado e não fermentado de *T. grandiflorum*. (\*) Diferenças estatísticas em relação ao suco não fermentado ( $p < 0,05$ ).

Os compostos fenólicos fazem parte do metabolismo secundário dos vegetais, participando de maneira importante na defesa da planta. Compostos dietéticos presentes em frutas e vegetais; seu consumo está associado a efeitos benéficos à saúde (ALMEIDA; SANTOS; VENTURA, 2017). Esses compostos fenólicos apresentam atividade antioxidante, característica apontada como relevante para o retardamento do envelhecimento e prevenção de doenças associadas ao estresse oxidativo (SILVA, 2014; ROTHENBERG; ZHOU; ZHANG, 2018). De fato, diversos estudos têm demonstrado que a ingestão de compostos fenólicos é eficiente no controle da diabetes mellitus, hipertensão e dislipidemias (DIAS et al., 2016; MARTÍN-PELÁEZ et al., 2016; SANTANGELO et al., 2016; MARTÍN-PELÁEZ et al., 2017).

### 3.3 A fermentação láctica aumentou o conteúdo de flavonoides no suco de *T. grandiflorum*

Outra classe de compostos bioativos de grande relevância para a saúde humana são os flavonoides que são bem conhecidos graças ao potencial imunomodulador, anti-hipertensivo e antidiabético (ALKHALIDY; WANG; LIU, 2018; RIBEIRO et al., 2018; VARGAS et al., 2018). A administração oral de flavonoides previne ou melhora os efeitos adversos no rim do consumo elevado de frutose, dieta rica em gordura e

diabetes tipos I e 2. Esses compostos atenuam a função de barreira endotelial renal rompida pela hiperglicemia, a excreção urinária de microalbumina e a hiperfiltração glomerular que resulta de uma redução da lesão podocitária, um fator determinante para a albuminúria na nefropatia diabética (VARGAS et al., 2018). Além disso, os flavonoides têm sido relacionados a efeitos antidepressivos que estão associados principalmente ao aumento do conteúdo de bioamina (GERMAN-PONCIANO et al., 2018; KHAN et al., 2018).

A fermentação do suco de *T. grandiflorum* com *L. fermentum* ATCC 23271 provocou aumento significativo do teor de flavonoides (aproximadamente 10 vezes) (Figura 4). O extrato do suco não fermentado apresentou teores na ordem de  $1,66 \pm 1,44$  mg EQ/g, enquanto que o extrato do suco fermentado obteve  $21,10 \pm 0,84$  mg EQ/g. Similarmente, a fermentação do suco de *T. grandiflorum* por *L. rhamnosus* ATCC 9595 também resultou no aumento (aproximadamente 3 vezes) do teor de flavonoides em comparação com o suco não fermentado (Figura 3B). O extrato do suco fermentado apresentou  $5,80 \pm 3,19$  mg EQ/g, enquanto que no extrato do suco não fermentado os valores encontrados foram de  $1,66 \pm 1,44$  mg EQ/g.

Estudos têm demonstrado que durante a fermentação láctica, os ácidos fenólicos, ésteres de ácido fenólico e flavonoides glicosilados são metabolizados (SVENSSON et al., 2010; EWE; ALIAS, 2012; MARAZZA; GARRO; DE GIORI, 2009). Por exemplo, o efeito da fermentação por linhagens de *L. fermentum* no conteúdo de flavonoides foi relacionado com a conversão de isoflavonas e propriedades probióticas, como observado para o leite de soja fermentado e suplementado com biotina (EWE; ALIAS, 2012).

De igual modo, linhagens de *L. rhamnosus* para aumentar ou modificar o conteúdo de flavonoides de produtos vegetais ou animais tem sido relatado em outros trabalhos, como uma produção de aglicona por *L. rhamnosus* CRL981 pois apresenta maiores níveis  $\beta$ -glicosidase durante a fermentação do leite de soja. *L. rhamnosus* CRL981 foi avaliado quanto à hidrólise de isoflavonas em agliconas, população celular, açúcares residuais e ácidos orgânicos produzidos durante a fermentação em leite de soja (37 °C por 24h). *L. rhamnosus* CRL981 foi capaz de proliferar no leite de soja e produzir uma atividade de  $\beta$ -glucosidase elevada, conseguindo uma hidrólise completa das isoflavonas glucósidas após 12 h de fermentação (MARAZZA; GARRO; DE GIORI, 2009). Segundo Hati et al. (2015) a cepa *L. rhamnosus* C6 também apresenta maior atividade de  $\beta$ -glicosidase e bioconversão de isoflavonas de gliconas a agliconas em leite de soja fermentado. É provável que o aumento do teor de aglicona de isoflavona no leite de soja fermentado melhore a funcionalidade biológica do leite de soja (por exemplo, atividade antioxidante, alívio de distúrbios hormonais em mulheres na pós-menopausa, etc.).

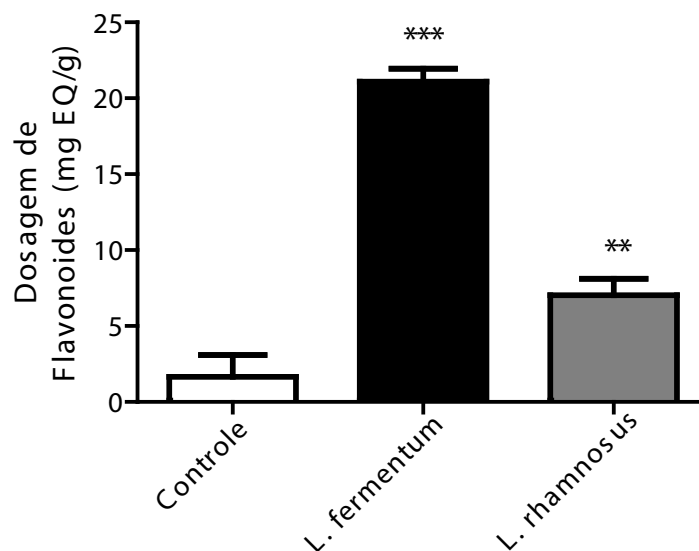


Figura 3: Efeito da fermentação láctica no teor de flavonoides totais no suco de *T. grandiflorum*. (\*) Diferenças estatísticas em relação ao suco não fermentado ( $p < 0,05$ ).

### 3.4 A fermentação láctica aumentou as características antioxidantes do suco de *T. grandiflorum*.

A ação antioxidante dos extratos obtidos a partir dos sucos de *T. grandiflorum* submetidos ou não à fermentação láctica foi determinada pelos testes de DPPH e ABTS. Os melhores resultados foram obtidos pela fermentação com *L. rhamnosus* ATCC 9595. O suco não fermentado apresentou uma IC50 de 8244,32  $\mu\text{g/mL}$  (Tabela 2), sendo observado que a fermentação com *L. rhamnosus* ATCC 9595 aumentou em mais de 10 vezes (IC50 de 799,42  $\mu\text{g/mL}$ ) a ação antioxidante do suco em sequestrar o radical DPPH, já a fermentação com *L. fermentum* ATCC 23271 potencializou mais de duas vezes este efeito (IC50 de 2453,34  $\mu\text{g/mL}$ ).

Ensaio	IC50 ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	Controle	L. fermentum	L. rhamnosus
DPPH	8244,32	2453,34	799,43
ABTS (6 min)	1319,76	796,39	264,28
ABTS (15 min)	1171,27	664,53	185,25
ABTS (30 min)	997,47	525,97	104,58
ABTS (45 min)	860,98	416,45	104,58
ABTS (60 min)	747,43	311,24	44,65

Tabela 2: Valores de IC50 encontrados nos ensaios de DPPH e ABTS para os extratos obtidos dos sucos de *T. grandiflorum* fermentados ou não fermentado.

Comparando os resultados de cada concentração testadas dos extratos fermentados com o controle, foi possível observar que o extrato do suco fermentado por *L.*

*rhamnosus* ATCC 9595 apresentou inibição significativamente maior nas concentrações de 1000  $\mu\text{g/mL}$ , 500  $\mu\text{g/mL}$  e 250  $\mu\text{g/mL}$ , enquanto que para a fermentação com *L. fermentum* ATCC 23271 a inibição do radical DPPH foi significativamente maior que nas concentrações de 1000  $\mu\text{g/mL}$  e 500  $\mu\text{g/mL}$  ( $p < 0,05$ ) (Figura 4).

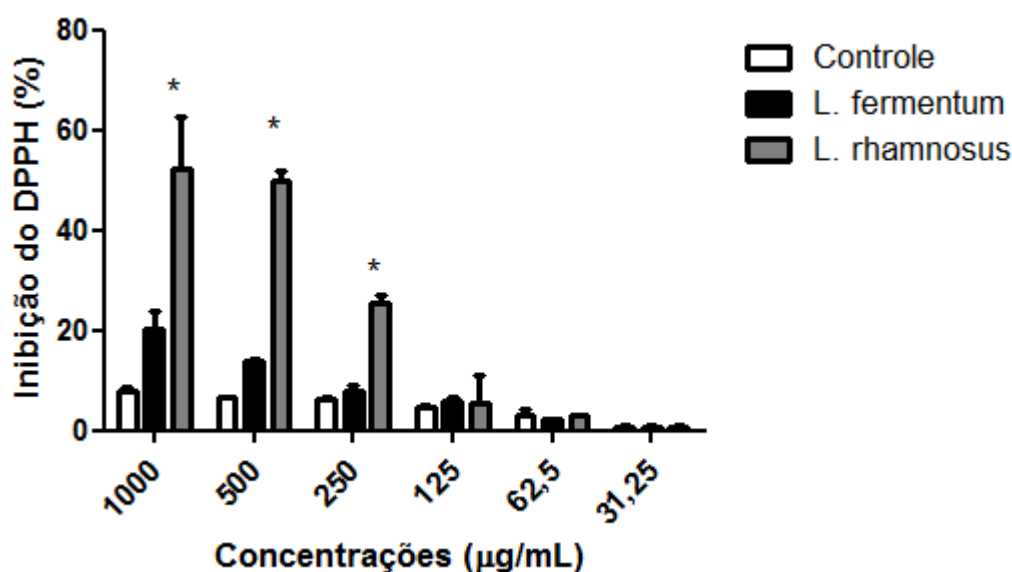


Figura 4: Inibição do radical DPPH por extratos obtidos dos sucos de *T. grandiflorum* fermentados e não fermentado. (\*) Diferenças estatísticas em relação ao suco não fermentado ( $p < 0,05$ ).

A avaliação pelo método ABTS foi realizada após diferentes tempos de incubação (figuras 5 e 6) e os valores de IC50 estão representados na tabela 2. Em todos os períodos testados foram encontrados uma maior atividade antioxidante dos extratos obtidos dos sucos fermentados, sendo este efeito mais potencializado com a fermentação por *L. rhamnosus* ATCC 9595.

Após 6 minutos de incubação, foram encontrados valores de IC50 de 264,28  $\mu\text{g/mL}$  e 796,39  $\mu\text{g/mL}$  para os extratos dos sucos fermentados por *L. rhamnosus* ATCC 9595 e *L. fermentum* ATCC 23271, respectivamente; enquanto que o extrato do suco não fermentado apresentou IC50 de 1319,76  $\mu\text{g/mL}$  (Tabela 2). Neste tempo, a atividade antioxidante do extrato do suco fermentado por *L. rhamnosus* ATCC 9595 foi significativamente superior nas concentrações mais altas ( $\geq 250 \mu\text{g/mL}$ ) em relação ao suco não fermentado, já a fermentação por *L. fermentum* ATCC 23271 apenas foi superior na concentração de 1000  $\mu\text{g/mL}$  (Figuras 5A e 6A).

Resultados semelhantes foram encontrados para incubação por 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos. Nestes períodos, os valores de IC50 para o extrato do suco fermentado por *L. rhamnosus* ATCC 9595 foram aproximadamente 6 a 8 vezes maiores (185,25  $\mu\text{g/mL}$ , 104,58  $\mu\text{g/mL}$ , 104,58  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente para os tempos de 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos) que aqueles observados para o extrato do suco não fermentado (1171,27  $\mu\text{g/mL}$  e 997,47  $\mu\text{g/mL}$ , 860,98  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente) (Tabela 2).



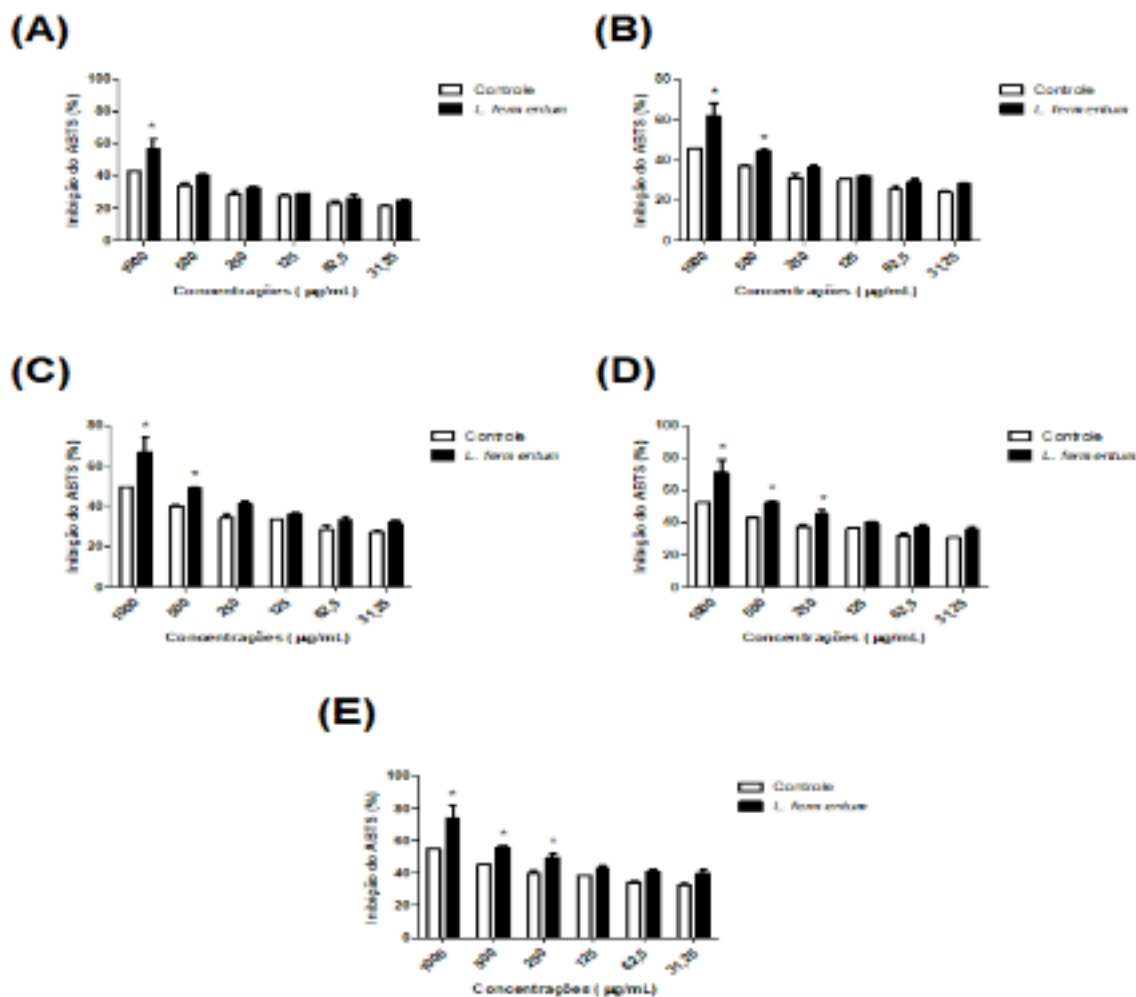


Figura 5: Cinética de inibição do radical ABTS por extratos obtidos dos sucos de *T. grandiflorum* fermentados e não fermentados por *L. fermentum* ATCC 23271. (A) Inibição do Radical ABTS após 6 minutos de incubação; (B) Inibição do Radical ABTS após 15 minutos de incubação; (C) Inibição do Radical ABTS após 30 minutos de incubação; (D) Inibição do Radical ABTS após 45 minutos de incubação; (E) Inibição do Radical ABTS após 60 minutos de incubação. (\*) Diferenças estatísticas em relação ao suco não fermentado ( $p < 0,05$ ).

Vale destacar que, após 60 minutos de incubação, o valor de IC50 para o extrato do suco fermentado por *L. rhamnosus* ATCC 9595 ( $44,65 \mu\text{g/mL}$ ) foi cerca de 17 vezes superior que o encontrado para o extrato do suco não fermentado ( $747,43 \mu\text{g/mL}$ ). Fazendo a comparação para cada concentração, nos tempos 15 minutos e 30 minutos, a atividade antioxidante do extrato do suco fermentado foi significativamente superior nas concentrações de  $1000 \mu\text{g/mL}$ ,  $500 \mu\text{g/mL}$ ,  $250 \mu\text{g/mL}$  e  $125 \mu\text{g/mL}$  (Figura 6). Já após 45 minutos e 60 minutos de incubação, a atividade antioxidante do extrato do suco fermentado foi significativamente superior em todas as concentrações avaliadas (Figura 6D e 6E).

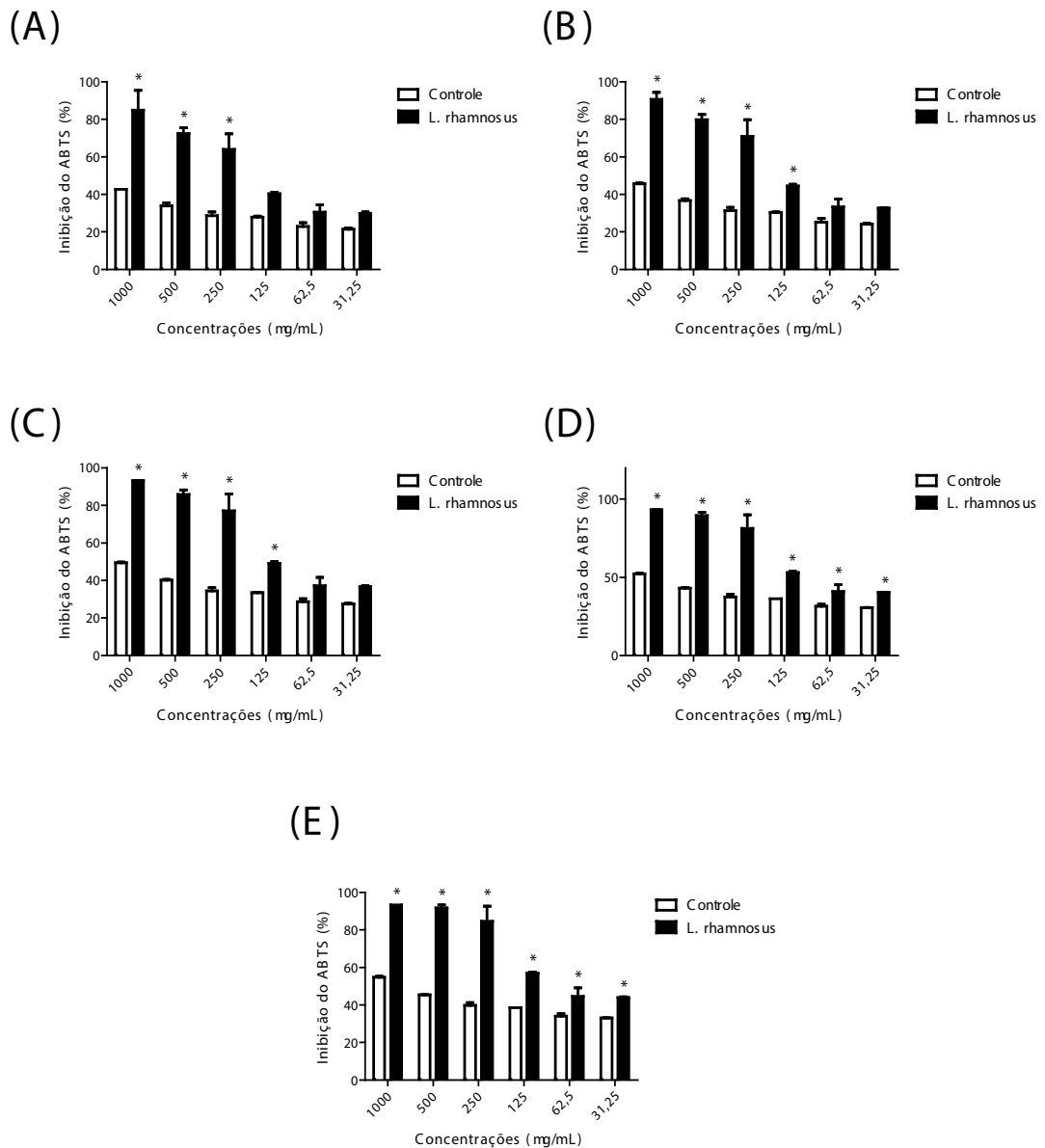


Figura 6: Cinética de inibição do radical ABTS pelos extratos obtidos do suco de *T. grandiflorum* fermentados e não fermentados por *L. rhamnosus* ATCC 9595. (A) Inibição do Radical ABTS após 6 minutos de incubação; (B) Inibição do Radical ABTS após 15 minutos de incubação; (C) Inibição do Radical ABTS após 30 minutos de incubação; (D) Inibição do Radical ABTS após 45 minutos de incubação; (E) Inibição do Radical ABTS após 60 minutos de incubação. (\*) Diferenças estatísticas em relação ao suco não fermentado ( $p < 0,05$ ).

No caso da fermentação com *L. fermentum* ATCC 23271, o extrato apresentou valores de IC50 aproximadamente duas vezes maiores (664,52  $\mu\text{g/mL}$ , 525,97  $\mu\text{g/mL}$ , 416,45  $\mu\text{g/mL}$  e 311,24  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente para os tempos de 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos e 60 minutos) que os obtidos com o suco não fermentado. Nos tempos 15 minutos e 30 minutos, a atividade antioxidante do extrato do suco fermentado por *L. fermentum* ATCC 23271 foi significativamente superior nas concentrações de 1000  $\mu\text{g/mL}$  e 500  $\mu\text{g/mL}$  (Figuras 5B e 5C). Já após 45 minutos e 60 minutos de incubação, a atividade antioxidante do extrato do suco fermentado foi significativamente superior nas concentrações de 1000  $\mu\text{g/mL}$ , 500  $\mu\text{g/mL}$  e 250  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 5D e 5E).

Em conjunto, nossos resultados demonstram que a fermentação láctica do suco de *T. grandiflorum* resultou no aumento no teor de compostos com ação antioxidante, sendo este efeito mais potente utilizando a linhagem *L. rhamnosus* ATCC 9595 do que com *L. fermentum* ATCC 23271. Estudos anteriores têm demonstrado o uso de linhagens de linhagens destas duas espécies com o intuito de aumentar as características funcionais de bebidas. Por exemplo, a cepa *L. fermentum* KKL1 foi utilizada para obtenção de uma bebida probiótica à base de arroz com ação antioxidante (GHOSH K et al., 2015).

Em outro estudo, verificou-se que o extrato de chá verde (*Camellia sinensis*) fermentado por *L. fermentum* (FGTE) aumentou significativamente a viabilidade celular das células hepáticas HepG2, após a exposição ao etanol (PARK; KIM Y; KIM SH, 2012). Semelhantemente, o uso de *L. rhamnosus* para aumentar a atividade farmacológica de plantas foi reportado. Recentemente, foi demonstrado que a biotransformação do extrato de *Pueraria lobata* com *L. rhamnosus* vitaP1 melhorou as atividades anti-melanogênica, anti-tirosinase e a capacidade antioxidante (KWON et al., 2018).

#### 4 | CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, foi possível observar que a polpa de *T. grandiflorum* apresenta as características necessárias para garantir o crescimento dos lactobacilos estudados, sem a necessidade de suplementação. Em adição, a fermentação por estas bactérias aumentou a capacidade antioxidante da polpa o que está associado com aumento nos teores de compostos fenólicos totais e flavonoides. Desta forma, este trabalho fornece indícios para a aplicação do suco de cupuaçu como veículo para crescimento de lactobacilos, o que pode ser explorado pelas indústrias alimentares e farmacêuticas, abrindo novas perspectivas para aplicação deste suco para o desenvolvimento de alimentos probióticos.

#### REFERENCIAS

ALKHALIDY, Hana; WANG, Yao; LIU, Dongmin. Dietary Flavonoids in the Prevention of T2D: **An Overview. Nutrients**, v. 10, n. 4, p. 438, 2018.

ALMEIDA, A. Filipa; SANTOS, Cláudia N.; VENTURA, M. Rita. Synthesis of New Sulfated and Glucuronated Metabolites of Dietary Phenolic Compounds Identified in Human Biological Samples. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 65, n. 31, p. 6460-6466, 2017

BOND, Diana M.; MORRIS, Jonathan M.; NASSAR, Natasha. Study protocol: evaluation of the probiotic Lactobacillus Fermentum CECT5716 for the prevention of mastitis in breastfeeding women: a randomised controlled trial. **BMC pregnancy and childbirth**, v.17, n.1, p.148,2017.

COSTA, Mayra Garcia Maia et al. Sonicated pineapple juice as substrate for *L. casei* cultivation for probiotic beverage development: process optimisation and product stability. **Food chemistry**, v. 139, n. 1-4, p. 261-266, 2013.

DE PRISCO, Annachiara; MAURIELLO, Gianluigi. Probiotication of foods: A focus on microencapsulation tool. *Trends in Food Science & Technology*, v.48, n.01, p. 27-39,2016.

DE SOUZA, Evandro Leite et al. Potential interactions among phenolic compounds and probiotics for mutual boosting of their health-promoting properties and food functionalities—A review. **Critical reviews in food science and nutrition**, p. 1-15, 2018.

DI CAGNO, R.; CODDA, R.; DE ANGELIS, M.; GOBBETTI, M. Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiol.*, v. 33, p. 1-10, 2013.

DIAS, Maria Inês et al. Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review. **Industrial Crops and Products**, v. 82, p. 9-22, 2016.

EWE, Joo Ann; ALIAS, Abdul Karim. Bioconversion of isoflavones and the probiotic properties of the electroporated parent and subsequent three subcultures of *Lactobacillus fermentum* BT 8219 in biotin-soymilk. *Journal of microbiology and biotechnology*, 2012, 22.7: 947-959.

FARIAS, Natalie; SOARES, Mariana; GOUVEIA, Ester. Enhancement of the viability of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 in passion fruit juice: Application of a central

FONTELES, Thatyane Vidal et al. Optimization of the fermentation of cantaloupe juice by *Lactobacillus casei* NRRL B-442. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 7, p. 2819-2826, 2012.

GALVÃO, Jessivaldo Rodrigues et al. Biomassa e estoque de carbono em progênies de cupuaçuzeiros em função da idade. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias (Agrária)**, v. 12, n. 4, p. 503-507, 2017.

GERMAN-PONCIANO, León Jesús et al. Advances in the preclinical study of some flavonoids as potential antidepressant agents. *Scientifica*, v. 2018.

GHOSH, Kuntal, et al. Role of probiotic *Lactobacillus fermentum* KKL1 in the preparation of a rice based fermented beverage. *Bioresource technology*, 2015, 188: 161-168.

KHAN, Haroon et al. Current standing of plant derived flavonoids as an antidepressant. **Food and Chemical Toxicology**, 2018.

KUMAR, Bathal Vijaya; VIJAYENDRA, Sistla Venkata Naga; REDDY, Obulam Vijaya Sarathi. Trends in dairy and non-dairy probiotic products-a review. *Journal of food science and technology*, V.52, n.10, p.6112-6124,2016.

KWON, Jeong Eun et al. Biotransformation of *Pueraria lobata* Extract with *Lactobacillus rhamnosus* vitaP1 Enhances Anti-Melanogenic Activity. *Journal of microbiology and biotechnology*, v. 28, n. 1, p. 22-31, 2018.

MARAZZA, Jose A.; GARRO, Marisa S.; DE GIORI, Graciela Savoy. Aglycone production by *Lactobacillus rhamnosus* CRL981 during soymilk fermentation. **Food microbiology**, v. 26, n. 3, p. 333-339, 2009.

MARTIM, Salomão Rocha. **Características físico-químicas e atividade da peroxidase e polifenoloxidase em genótipos de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Willd ex- Spreng Schum) submetidos ao congelamento**. 2012. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2012.

MARTÍN-PELÁEZ, Sandra et al. Effect of olive oil phenolic compounds on the expression of blood pressure-related genes in healthy individuals. **European journal of nutrition**, v. 56, n. 2, p. 663-670, 2017.

- MARTÍN-PELÁEZ, Sandra et al. Influence of phenol-enriched olive oils on human intestinal immune function. **Nutrients**, v. 8, n. 4, p. 213, 2016.
- MARTINS, Flaviano S.; SILVA, Aristóboło M.; NICOLI, Jacques R. Anti-inflammatory effect of two Lactobacillus strains during infection with Gardnerella vaginalis and Candida albicans in a HeLa cell culture model. **Microbiology Society**, 2018.
- NEMATOLLAHI, Amene, et al. Viability of probiotic bacteria and some chemical and sensory characteristics in cornelian cherry juice during cold storage. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.21, p.49-53,2016.
- OUARABI, Liza, et al. Newly Isolated Lactobacilli strains from Algerian Human Vaginal Microbiota: Lactobacillus fermentum Strains Relevant Probiotic's Candidates. **Probiotics and antimicrobial proteins**, 2017, p.1-12.
- PARK, Jong Ho; KIM, Younghoon; KIM, Sae Hun. Green tea extract (Camellia sinensis) fermented by Lactobacillus fermentum attenuates alcohol-induced liver damage. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, 2012, 76.12: 2294-2300.
- PEREIRA, Ana Lúcia Fernandes et al. Storage stability and acceptance of probiotic beverage from cashew apple juice. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 11, p. 3155-3165, 2013.
- RODRÍGUEZ-NOGALES, Alba, et al. Differential intestinal anti-inflammatory effects of Lactobacillus fermentum and Lactobacillus salivarius in DSS mouse colitis: impact on microRNAs expression and microbiota composition. **Molecular nutrition & food research**, 2017.
- ROTHENBERG, Dylan O.'Neill; ZHOU, Caibi; ZHANG, Lingyun. A Review on the Weight-Loss Effects of Oxidized Tea Polyphenols. **Molecules**, v. 23, n. 5, p. 1176, 2018.
- SANTANGELO, C. et al. Consumption of extra-virgin olive oil rich in phenolic compounds improves metabolic control in patients with type 2 diabetes mellitus: a possible involvement of reduced levels of circulating visfatin. **Journal of endocrinological investigation**, v. 39, n. 11, p. 1295-1301, 2016.
- SANTOS, Eloyza; ANDRADE, Raissa; GOUVEIA, Ester. Utilization of the pectin and pulp of the passion fruit from Caatinga as probiotic food carriers. **Food Bioscience** v.20, p. 56-61,2017.
- SILVA, Herlane Miranda da. **Caracterização físico-química e informações nutricionais de doce em massa de cupuaçu**. 2014. 44 F. Monografia (Graduação em Engenharia de Alimentos). Universidade Federal do Maranhão, 2014.
- SVENSSON, Louise et al. Phenolic acids and flavonoids in nonfermented and fermented red sorghum (Sorghum bicolor (L.) Moench). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 16, p. 9214-9220, 2010.
- VARGAS, Félix et al. Flavonoids in Kidney Health and Disease. **Frontiers in physiology**, v. 9, p. 394, 2018.
- VERCE, Marko; DE VUYST, Luc; WECKX, Stefan. Complete and Annotated Genome Sequence of the Sourdough Lactic Acid Bacterium Lactobacillus fermentum IMDO 130101. **Genome announcements**, v. 6, n.19, p. e00256-18, 2018.
- YADAV, Radha, et al. Consumption of Probiotic Lactobacillus fermentum MTCC: 5898-Fermented Milk Attenuates Dyslipidemia, Oxidative Stress, and Inflammation in Male Rats Fed on Cholesterol-Enriched Diet. **Probiotics and antimicrobial proteins**, p.1-10, 2018.

## VIGILÂNCIA DE EPIZOOTIAS EM PRIMATAS NÃO HUMANOS (PNH) ENTRE 2015 A 2017 NO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE, BRASIL

### **Danielle Domingos da Silva**

Instituto Federal de Educação, Ciência,  
Tecnologia do Rio Grande do Norte  
Natal – Rio Grande do Norte

### **Durval Moraes da Silva**

Subcoordenadoria de Vigilância Ambiental/  
SESAP-RN  
Natal – Rio Grande do Norte

### **Cintia de Sousa Higashi**

Subcoordenadoria de Vigilância Ambiental/  
SESAP-RN  
Natal – Rio Grande do Norte

### **Fabíola de Souza Medeiros**

Subcoordenadoria de Vigilância Ambiental/  
SESAP-RN  
Natal – Rio Grande do Norte

**RESUMO:** A fim de recolher informações sobre o adoecimento, ou morte, de Primatas Não Humanos (PNH), a vigilância de epizootias tem como objetivo prevenir e controlar a incidência de doenças e/ou dos óbitos em uma população humana. Técnicas são adotadas para investigar a circulação de possíveis vírus com potencial nocivo para a saúde pública, como a Febre Amarela (FA) e a raiva. Além de promover a conscientização da população sobre os riscos para a saúde. No presente estudo, foram registrados 58 casos de epizootias no período de 2015 a 2017. Sendo 7 casos de epizootias

registrados no ano de 2015, 22 em 2016 e 29 em 2017. Nota-se que os casos foram aumentando com os anos e que o município pioneiro em notificar e registrar as ocorrências foi Natal. Porém, dos 13 municípios que registraram as ocorrências, houve destaque, além de Natal, para Tibau do Sul e Macaíba. Contudo, não foi comprovado a ocorrência de casos de Raiva ou Febre Amarela no estado do Rio Grande do Norte, transmitida por PNH.

**PALAVRAS-CHAVE:** Epizootias; Primatas Não Humanos; Saúde Pública.

**ABSTRACT:** In order to collect information on the illness or death of Non-Human Primates (NHP), disease surveillance aims to prevent and control the incidence of diseases and/or deaths in a human population. Techniques are adopted to investigate the circulation of possible viruses with potential harmful to public health, such as Yellow Fever (AF) and rabies. In addition to promoting public awareness about health risks. In the present study, 58 epizootic cases were recorded in the period from 2015 to 2017. Seven cases of epizootics were registered in 2015, 22 in 2016 and 29 in 2017. It is noted that cases have increased over the years and that pioneer in notifying and recording occurrences was Natal. However, of the 13 municipalities that registered the occurrences, besides Natal, there was prominence for Tibau do Sul and

Macaíba. However, it has not been proven to occur cases of rabies or yellow fever in the state of Rio Grande do Norte, transmitted by PNH.

**KEYWORDS:** Epizootics; Non-Human Primates; Public Health.

## 1 | INTRODUÇÃO

A vigilância de epizootias em Primatas Não Humanos (PNH) baseia-se essencialmente em recolher informações, oportunamente, sobre o adoecimento ou morte de PNH e investigar adequadamente esses eventos, com objetivo de subsidiar a tomada de decisão para a adoção de medidas de prevenção, de controle e para diminuir a morbimortalidade de doença na população humana, em áreas afetadas (com transmissão ativa) e áreas adjacentes (Ministério da Saúde, 2017).

Com a notificação do animal morto, autoridades de saúde local devem notificar o evento, de imediato, no prazo de até 24 horas, às unidades do Sistema único de Saúde (SUS) nos Níveis estaduais e federais, iniciando assim o procedimento da investigação logo após a notificação. Em amostras de PNH, são examinadas possíveis doenças como a Febre Amarela (FA) e Raiva.

Por meios dessas amostras, é possível cruzar informações a respeito de onde o animal foi encontrado, incluindo fatores e condições do local com os possíveis padrões de transmissão favoráveis das doenças. Para efeito vigilância, de notificação e de investigação, deve ser considerada a seguinte definição de caso suspeito (Ministério da Saúde, 2017):

Caso Suspeito: Primata Não Humano de qualquer espécie, encontrado morto ou doente, em qualquer região do território nacional. Sendo necessário todo caso ser notificado.

Baseada nas características levantadas, a partir dos achados de investigação, as epizootias devem ser classificadas em (Ministério da Saúde, 2017):

- Morte de macaco;
- Epizootia de primata “em investigação”;
- Epizootia confirmada para Febre Amarela;
- Epizootia descartada para Febre Amarela.

A Febre Amarela é uma doença infecciosa febril aguda e não transmissível cujo agente etiológico é um arbovírus da família Flaviviridae, sendo do gênero *Flavivirus*. A FA possui dois ciclos epidemiológicos distintos: Febre Amarela Silvestre (FAS) e a Febre Amarela Urbana (FAU). Esse vírus é encontrado em mosquitos do gênero *Haemagogus* e *Sabethes*. As diferenças cruciais entre os dois ciclos são: o gênero do mosquito transmissor, a localização geográfica e o tipo de hospedeiro (ARAÚJO et al.,

2011).

Na FAS, os PNH são os principais hospedeiros do vírus da Febre Amarela e a transmissão ocorre a partir de vetores silvestres, no qual homem não imunizado participa desse ciclo como hospedeiro acidental. Na FAU, o homem é o único hospedeiro com importância epidemiológica e a transmissão se dá a partir de vetores urbanos infectados, na qual o principal vetor é o *Aedes aegypti* (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2010). A FAS é endêmica nas regiões tropicais da África e das Américas.

Quanto aos sintomas, a Febre Amarela apresenta como aspectos clínicos, inicialmente, a febre aguda, de curta duração e de gravidade variável. Esse quadro tem evolução bifásica (período de infecção e período de intoxicação). Sendo ambos marcados por sintomas semelhantes, dentre os quais, podem-se citar: cefaleia intensa, vômitos, náuseas, febre alta, calafrios e diarreia, além de outros sintomas que fazem referência a cada período em específico.

Em humanos, normalmente, o aparecimento de casos é antecedido de epizootias em PNH. No Brasil, só há ocorrência de casos de FAS e os focos endêmicos até 1999 nos quais situados nos estados das regiões Norte, Centro-Oeste e área pré-amazônica do Maranhão, além de alguns registros na parte oeste do estado de Minas Gerais.

No entanto, no período de 2000 a 2009, observou-se um surto ocorrido com a expansão da circulação viral no sentido leste e sul do país (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2010). Segundo o Ministério da Saúde, atualmente, o Brasil vive o maior surto de Febre Amarela já notificado desde 1980, oriundo de Minas Gerais e nas regiões em torno, decorrente do desastre ambiental ocorrido no município de Mariana, já havendo casos registrados na divisa do estado da Bahia com Alagoas.

Conhecida desde a antiguidade, a raiva continua, nos dias atuais, sendo um problema de saúde, nos países em desenvolvimento, que afeta, principalmente, cães e gatos, em áreas urbanas. Dessa forma e como consequência, esses animais podem atuar como forma de transmissão animal/homem.

A raiva é uma antropozoonose viral, tratando-se de uma encefalite progressiva aguda e letal, levando a vítima a óbito em, praticamente, 100% dos casos. Promovida por um vírus da família Rhabdoviridae e gênero *Lyssavirus*. Portando de dois, principais, ciclos de transmissão: silvestre e urbano.

Quanto à forma de infecção, pode-se subdividir a transmissão urbana e rural em quatro ciclos epidemiológicos: ciclo aéreo, na qual envolve os morcegos; ciclo rural, representado por animais de produção; ciclo urbano, relacionado aos cães e gatos; e o ciclo silvestre, englobando saguis, cachorro do mato, raposas, guaxinim e outros animais selvagens (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2010).

O modo de transmissão da Raiva se dá por meio do vírus contido na saliva do animal, normalmente e principalmente, através da mordedura ou arranhadura. Assim, o vírus penetra no organismo, se multiplica, atingindo o sistema nervoso periférico e, posteriormente, o sistema nervoso central. O vírus rábico é neurotrópico e sua ação, no sistema nervoso central, causa um quadro clínico característico de encefalite aguda,



decorrente da sua multiplicação entre os neurônios (Ministério da Saúde, 2017).

Após o período de instalação do vírus no organismo, seja animal ou humano, aparecem os pródromos iniciais, dessa forma, o paciente, após 2 ou 4 dias, passa a sentir sintomas como mal-estar, aumento da temperatura corporal, cefaleia, náuseas, dor de garganta, irritabilidade, inquietude, sensação de angústia, espasmos musculares involuntários e convulsões (Ministério da Saúde, 2017).

Sendo assim, o objetivo desse presente trabalho é expor dados referentes aos casos de epizootias em PNH nos anos de 2015, 2016 e até agosto de 2017. Nesse contexto, mostrar a importância do serviço de vigilância para o controle e prevenção de doenças que possam impactar a saúde pública.

## **2 | METODOLOGIA**

A metodologia aplicada teve como base o levantamento de dados da Subcoordenadoria de Vigilância Ambiental – Secretaria de Estado de Saúde Pública do RN (SUVAM/SESAP-RN) no que diz respeito à temática. Utilizando registros de PNH com ocorrência de epizootias, no estado do Rio Grande do Norte. Referenciando-se aos anos de 2015, 2016 e até o mês de agosto de 2017. Fazendo uma listagem das regiões potiguares suspeitas. Sendo complementadas, introdutoriamente, com fatos e informações já existentes e executadas e outras regiões do país. Com o intuito de salientar a importância do sistema de vigilância em epizootias no estado do Rio Grande do Norte.

## **3 | RESULTADOS ALCANÇADOS/ESPERADOS E DISCUSSÕES**

Por meio do acesso aos dados da SUVAM/SESAP-RN, foi possível perceber que o registro de epizootias no estado do Rio Grande do Norte vem aumentando, gradativamente, com o passar dos anos. O ano de 2017 foi marcado com um aumento de 131%, aproximadamente, dos casos de epizootias registrados em relação ao ano de 2016. Valendo salientar que os casos registrados no ano de 2017, fazem referência até o mês de agosto, em contrapartida, o ano de 2016, os casos foram registrados de janeiro a dezembro. Se comparado, dessa vez, com o ano de 2015, o houve foi dos registros foi por volta de 414% (Tabela 1).

A ocorrência de um determinado evento pode conter um indeterminado número de animais em um raio delimitado de uma dada região. Dessa forma, esse número pode variar de acordo com os casos de epizootias. Em uma situação hipotética, de acordo com os dados já existentes, até dezembro de 2017 seriam registrados, pelo menos 43 casos de epizootias no RN. Isso representaria cerca de 197% se comparado com 2016 e 621% com 2015 (Tabela 2).

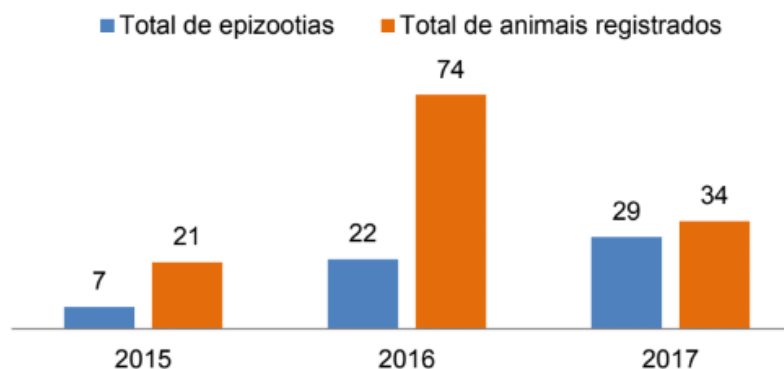


Tabela 1: Comparativo entre os casos registrados de epizootias e animais registrados ao longo de janeiro de 2015 a agosto de 2017 (FONTE: SUVAM/SESAP-RN, 2017).

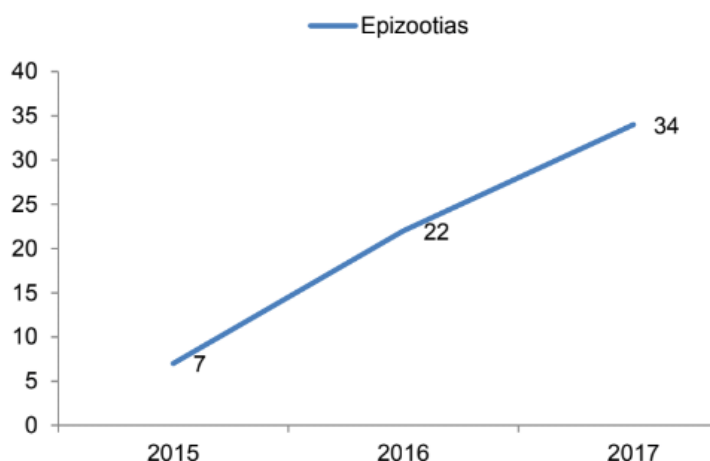


Tabela 2: Perspectiva de casos de epizootias até o final de 2017.

Observando-se outros fatores, os municípios com a maior ocorrência de epizootias são: Natal (2015, 2016 e 2017), Tibau do Sul (2016 e 2017) e Macaíba (2016), conforme Tabela 3. Podem-se considerar vários fatores para que isso ocorra com maior frequência nesses municípios, dentre eles, conjectura-se que esses PNH estão em maior contato, direto e indiretamente, com os seres humanos e, conseqüentemente, mais passível a contração de doenças e fatalidades; fatores antrópicos no meio ambiente, causando assim um desequilíbrio em seus *habitats*; e ao fato de o município de Natal ter instalado o Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) o qual desenvolve a vigilância em PNH além de ser treinada para o desenvolvimento de ações de controle e prevenção dessas epizootias.

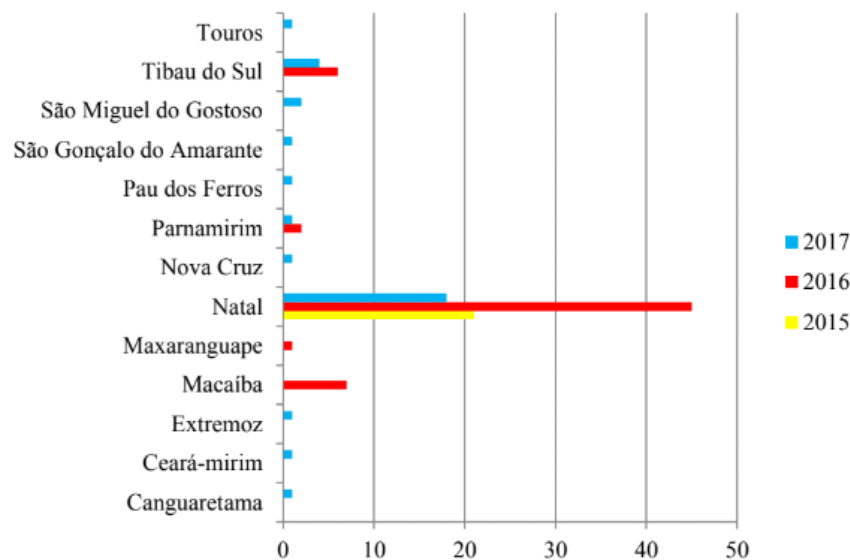


Tabela 3: Distribuição geográfica por município dos casos registrados de PNH ao longo de 2015 a 2017 (FONTE: SUVAM/SESAP-RN, 2017).

De acordo ainda com os dados referentes da SUVAM/SESAP-RN, as amostras coletadas (a campo *in loco*, as amostras são enviadas para o Laboratório Central do Rio Grande do Norte – LACEN/RN – como também podem ser enviado o animal inteiro para ser coletadas diretamente no LACEN/RN) são enviadas, posteriormente, para o Instituto Evandro Chagas ou a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), atualmente.

São realizados exames, nas amostras coletadas, de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), Imunoistoquímico (IHQ) e anatomopatológico (biópsia) para a identificação da presença do vírus de FA e raiva. A técnica de PCR permite estudar uma parte do material ou fragmento específico da molécula de DNA a fim de detectar e analisar a sequência que é o alvo de estudo. É considerada a forma de exame mais segura e confiável quanto aos resultados obtidos.

O exame IHQ é o método de identificação de antígenos nos tecidos, utilizando o princípio da ligação específica de anticorpos e antígenos, usado para o diagnóstico de células anormais. É visto como um exame subjetivo, de acordo com profissionais da saúde. E a biópsia ocorre com a coleta de tecido para o estudo macro e microscópico para o diagnóstico de doenças.

Foi observado que em 2017 houve um caso registrado de PNH com FA. No entanto, o registro cita ainda que o caso marcado como positivo foi para o exame de IHQ e, ao mesmo tempo, negativo para o exame de PCR. Isso se dá pelo fato de a técnica do PCR não ter identificado a sequência do vírus da FA no fragmento da molécula de DNA e o IHQ estar passível a falhas em seus resultados, podendo haver, assim, alteração no resultado obtido, sendo necessário a realização do PCR após o exame de IHQ para confirmação da doença alvo.

Ainda não foi identificado nenhum caso de PNH infectado com o vírus da raiva nos anos de estudo. Contudo no estado Ceará já foi registrado alguns casos. De um total

de 27 e 7 casos registrados, referentes aos anos de 2016 e 2017, respectivamente, examinados que ainda estão na espera pelo resultado, de acordo com a Tabela 4. É fundamental a realização de exames nas amostras de PNH, por intermédio da vigilância ambiental, com o intuito de evitar casos futuros em humanos de doenças, como as tais já supracitadas.

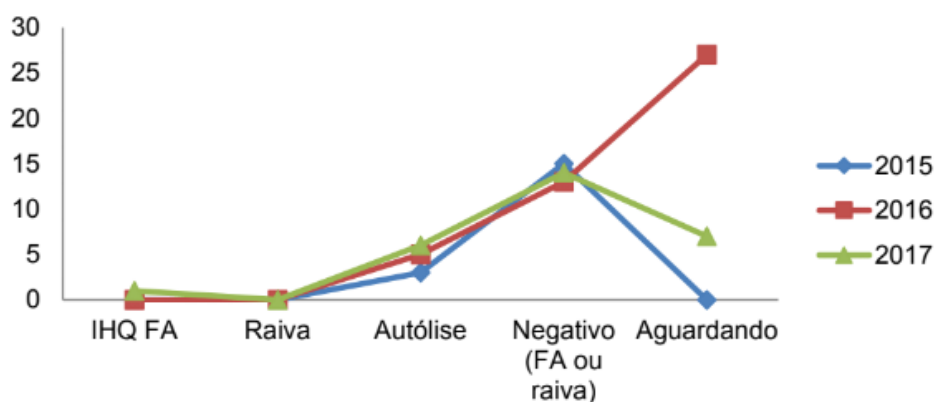


Tabela 4: Registros de exames e situação atual das amostras coletadas nos anos de 2015 a 2017 (Fonte: SUVAM/SESAP, 2017).

#### 4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

É fundamental considerar a vigilância ambiental de epizootias para a identificação de possíveis doenças que podem acarretar a população humana, podendo levar até ao óbito. Sabendo que em novembro de 2015 em Minas Gerais, o Brasil foi submetido a um dos maiores desastres ambiental já registrado e até hoje, é possível ver vestígios desse impacto no local afetado e nas regiões adjacentes. Diante disso, é importante que haja um sistema de vigilância que possa monitorar a circulação dos vírus que possam causar impacto a saúde da população humana, tais como a febre amarela e a raiva, já que são doenças que podem levar tanto os PNH como os humanos a óbito. É fundamental a capacitação de profissionais da saúde para estudar, controlar epizootias suspeitas e zelar pela saúde pública, por meio de campanhas de promoção a saúde, atividades de educação e vacinação.

#### REFERÊNCIAS

ARAÚJO, F.; et al. *Epizootias em primatas não humanos durante reemergência do vírus da febre amarela no Brasil, 2007 a 2009*. Epidemiol. Serviço de Saúde, v. 20, nº 4. Brasília: dezembro, 2011.

BRASIL. *Guia de Vigilância Epidemiológica*. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. 7. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

BRASIL. *Guia de Vigilância de Epizootias em Primatas Não Humanos e Entomologia Aplicada à Vigilância de Febre Amarela*. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. 2. ed. Atualizada – Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

BRASIL. *Manual de Coleta para Raiva Animal*. Diretoria de Vigilância Epidemiológica. Santa Catarina: Ministério da Saúde.

VASCONCELOS, P. *Febre Amarela*. Artigo de Revisão. Revista de Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, p. 275-283, mar-abr, 2003.

## **SOBRE O ORGANIZADOR**

### **Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto**

Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade do Estado de Mato Grosso (2005), com especialização na modalidade médica em Análises Clínicas e Microbiologia. Em 2006 se especializou em Educação no Instituto Araguaia de Pós graduação Pesquisa e Extensão. Obteve seu Mestrado em Biologia Celular e Molecular pelo Instituto de Ciências Biológicas (2009) e o Doutorado em Medicina Tropical e Saúde Pública pelo Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (2013) da Universidade Federal de Goiás. Pós-Doutorado em Genética Molecular com concentração em Proteômica e Bioinformática. Também possui seu segundo Pós doutoramento pelo Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Aplicadas a Produtos para a Saúde da Universidade Estadual de Goiás (2015), trabalhando com Análise Global da Genômica Funcional e aperfeiçoamento no Institute of Transfusion Medicine at the Hospital Universitätsklinikum Essen, Germany.

Palestrante internacional nas áreas de inovações em saúde com experiência nas áreas de Microbiologia, Micologia Médica, Biotecnologia aplicada a Genômica, Engenharia Genética e Proteômica, Bioinformática Funcional, Biologia Molecular, Genética de microrganismos. É Sócio fundador da “Sociedade Brasileira de Ciências aplicadas à Saúde” (SBCSaúde) onde exerce o cargo de Diretor Executivo, e idealizador do projeto “Congresso Nacional Multidisciplinar da Saúde” (CoNMSaúde) realizado anualmente no centro-oeste do país. Atua como Pesquisador consultor da Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de Goiás - FAPEG. Coordenador do curso de Especialização em Medicina Genômica e do curso de Biotecnologia e Inovações em Saúde no Instituto Nacional de Cursos. Como pesquisador, ligado ao Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP-UFG), o autor tem se dedicado à medicina tropical desenvolvendo estudos na área da micologia médica com publicações relevantes em periódicos nacionais e internacionais.

Agência Brasileira do ISBN  
ISBN 978-85-7247-298-2

