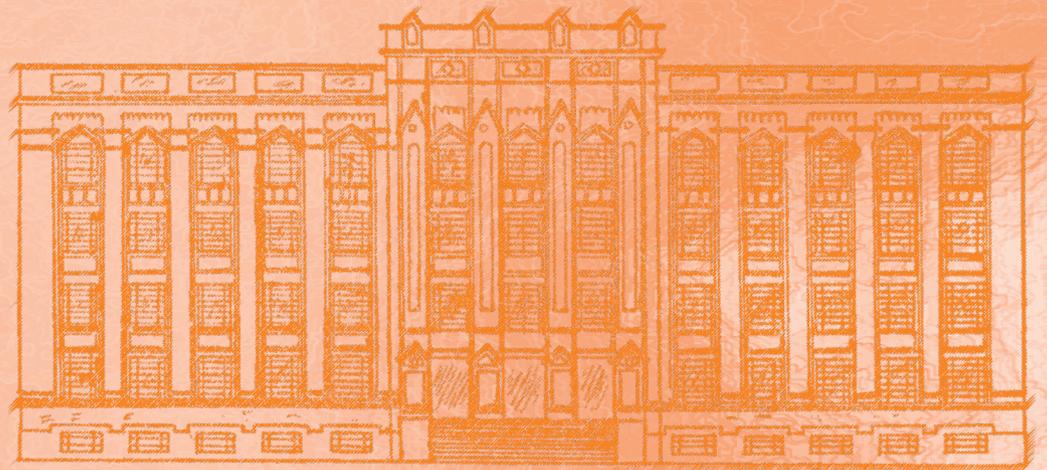


REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

ISSN: 0073-9855 (impresso)
ISSN: 1983-3814 (on-line)
RIALA6



Volume 71 número 1, 2012





Coordenadoria de Controle de Doenças
Instituto Adolfo Lutz

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Volume 71 número 1, 2012
Janeiro - Março 2012

Publicação trimestral/Quarterly publication
Solicita-se permuta/Exchange desired

INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Diretor Geral do Instituto Adolfo Lutz

Alberto José da Silva Duarte

Editor Chefe

Adriana Bugno

Editor Adjunto

Luis Fernando de Macedo Brígido

Editores Assistentes

Christiane Asturiano Ristori Costa

Jacqueline Tanury Macruz Peresi

Lucile Tiemi Abe Matsumoto

Márcia Liane Buzzo

Maria Helena Iha

Maria Helena Martini

Miriam Solange Fernandes Caruso

Neuza Kasumi Shirata

Raquel dos Anjos Fazioli

Núcleo de Acervo

Rocely Aparecida Bueno Moita

Conselho Editorial / Editorial Board

Adele Caterino-de-Araújo, São Paulo, Brasil.

Alexandre Januário da Silva, Atlanta, EUA.

Antonio Ruffino Netto, Ribeirão Preto, Brasil.

Bernadette Dora G. de Melo Franco, São Paulo, Brasil.

Delia Rodrigues Amaya, Campinas, Brasil.

Elizabeth de Souza Nascimento, São Paulo, Brasil.

Elizabeth Castañeda, Bogotá, Colômbia.

Eliseu Alves Waldman, São Paulo, Brasil.

Fernando C. Schmitt, Porto, Portugal.

Gordon S. Shephard, Cape Town, África do Sul.

Guilherme Prado, Belo Horizonte, Brasil.

Hans P. van Egmond, Bilthoven, Holanda.

Heitor Franco de Andrade Junior, São Paulo, Brasil.

John Gilbert, York, UK.

Juan Carlos Palomino, Antuérpia, Bélgica.

Lígia Bicudo de Almeida Muradian, São Paulo, Brasil.

Luz Elena Cano Restreppo, Medellín, Colômbia.

Maria José Mendes Gianini, Araraquara, Brasil.

Marluce Bibbo, Pennsylvania, EUA.

Martin Emilio Munk, Copenhagen, Dinamarca.

Myrna Sabino, São Paulo, Brasil.

Paul W. Flinn, Kansas, EUA.

Pedro Paulo Chieffi, São Paulo, Brasil.

Regina Maura Bueno Franco, Campinas, Brasil.

Susana Córdoba, Buenos Aires, Argentina.

Terezinha de Jesus Andreoli Pinto, São Paulo, Brasil.

Thales de Brito, São Paulo, Brasil.

Vanessa Yardley, London, UK.

Venâncio Avancini Ferreira Alves, São Paulo, Brasil.

Vera Akiko Maihara, São Paulo, Brasil.

Vera Lucia Garcia Calich, São Paulo, Brasil.

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

1941

2012, 71(1)

ISSN 0073-9855

CDD₁₈ 614.07205

RIALA 6

ISSN 1983-3814 versão *on line*

ISSN 2176-3844 CD-ROM

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

Normas para catalogação de publicações seriadas especializadas, São Paulo, Ed. Polígono, 1.072.

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

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

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

Portal de Revistas Saúde SP

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

Cartas ao editor:

Endereço / Address

Núcleo de Acervo

Av. Dr. Arnaldo, 355, 01246-902 São Paulo/ SP – Brasil

Tel/ Fax. + 55 11 3068-2869

E-mail: rial@saude.sp.gov.br

■ ARTIGO DE REVISÃO/ REVIEW ARTICLE

1426 Qualidade e segurança do pescado

Seafood quality and safety

Karoline Mikaelle de Paiva SOARES, Alex Augusto GONÇALVES..... 1-10

1427 Regulamentação da comercialização de alimentos no ambiente escolar: análise dos dispositivos legais brasileiros que buscam a alimentação saudável

Regulation of food commercialization in school environment: analyses of the Brazilian legal instruments to promote healthy foods

Cristine Garcia GABRIEL, Gabriela Dalsasso RICARDO, Roberta Melchiorretto OSTERMANN, Arlete Catarina TITTONI CORSO,

Maria Alice Altenburg de ASSIS, Patrícia Faria Di PIETRO, Francisco de Assis Guedes de VASCONCELOS..... 11-20

■ ARTIGO ORIGINAL/ORIGINAL ARTICLE

1428 Phenotypic profiles and detection of target genes by PCR in isolates from different sources and reference strains, identified as *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*)

Perfis fenotípicos e detecção de genes alvo por PCR em isolados de diferentes origens e cepas de referência identificados como *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*)

Márcia Barbosa WARNKEN, Marcelo Luiz Lima BRANDÃO, Aline Encarnação SOUZA, Célia Maria Carvalho Pereira

Araulo ROMÃO, Ana Cristina Martins Almeida NOGUEIRA, Maria Teresa DESTRO..... 21-31

1429 Comparação das técnicas do número mais provável (NMP) e de filtração em membrana na avaliação da qualidade microbiológica de água mineral natural

Comparison of most probable number (MNP) and membrane filtration techniques for analyzing the natural mineral water microbiological quality

Marcelo Luiz Lima BRANDÃO, Carla de Oliveira ROSAS, Valéria de Mello MEDEIROS, Márcia Barbosa WARNKEN,

Silvia Maria Lopes BRICIO, Ana Maria Luiz da SILVA, Denise Rosane Perdomo AZEREDO..... 32-39

1430 Pesquisa de enterobactérias em chocolates

Detection of enterobacteria in chocolates

Érika Marques REOLON, Aline Regina Barbosa SANTOS, Vanessa Eliane MOREIRA, Maristela da Silva do NASCIMENTO..... 40-43

1431 Ocorrência de fungos e aflatoxinas em grãos de milho

Occurrence of fungi and aflatoxins in corn kernels

Larissa Fatarelli BENTO, Maria Aparecida Braga CANEPPELE, Maria Cristina de Figueiredo e ALBUQUERQUE,

Leimi KOBAYASTI, Carlos CANEPPELE, Patrícia de Jesus ANDRADE 44-49

1432 Seleção de fungos isolados do ambiente com atividade lipolítica

Isolation and selection of lipolytic enzymes-producing fungi

Michele Cardoso COIMBRA, Thiago Okubo Procópio PINTO, Vinicius D'ARCADIA CRUZ, Pedro de OLIVA NETO 50-55

1433	Avaliação da eficácia da água sanitária na sanitização de alfaces (<i>Lactuca sativa</i>) Evaluation of the efficacy of sodium hypochlorite in sanitization of lettuce (<i>Lactuca sativa</i>) Hugo de Sousa SANTOS, Maria Christina Sanches MURATORI, Ana Luísa Alves MARQUES, Verbena Carvalho ALVES, Francisco das Chagas CARDOSO FILHO, Amilton Paulo Raposo COSTA, Maria Marlúcia Gomes PEREIRA, Carlos Alberto da Rocha ROSA.....	56-60
1434	Caracterização e compostos bioativos do óleo da castanha-de-cutia (<i>Couepia edulis</i>) Physical-chemical characterization of bioactive compounds of the oil from cutia nut (<i>Couepia edulis</i>) Tainara COSTA-SINGH, Thiago Bergler BITENCOURT, Neuza JORGE.....	61-68
1435	Determinação de aminas biogênicas em diferentes tipos de queijos por cromatografia líquida de alta eficiência Determination of biogenic amines in different types of cheese by high-performance liquid chromatography Fernanda Lima CUNHA, Carlos Adam CONTE JUNIOR, César Aquiles LÁZARO, Lucas Rabaça dos SANTOS, Eliane Teixeira MÁRSICO, Sérgio Borges MANO	69-75
1436	Propriedades morfológicas e funcionais e outras características da pasta do amido nativo e oxidado da amêndoa do caroço de manga (<i>Mangifera indica</i> L.), variedade Tommy Atkins Morphological and functional characteristics and other properties of the native and oxidized starch paste produced from mango kernels of Tommy Atkins variety Marianne Louise Marinho MENDES, Pushkar Singh BORA, Ana Paula Loura RIBEIRO	76-84
1437	Influência da dieta suplementada com óleo de soja na composição centesimal e perfil lipídico de tilápias do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) Effect of dietary regime supplemented with soybean oil on the lipid profile and chemical composition of Nile tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>) Janice Izabel DRUZIAN, Bruna Aparecida Souza MACHADO, Carolina Oliveira de SOUZA, Lorena Magalhães FRAGA, Viviane de Alencar Araes DURAN, Uíara Souza de BURGHGRAVE, Bruno Lopes BASTOS, Ricardo Castelo Branco ALBINATI, José Eugênio GUIMARÃES	85-92
1438	Efeito da adição de radícula de malte na ração de frangos de corte: composição físico-química e perfil de ácidos graxos da carne Effect of the addition of malt radicle on the broiler feed: chemical composition and meat fatty acid profile Daiana NOVELLO, Ricardo Alves da FONSECA, Jamile Kailer dos SANTOS.....	93-100
1439	Determination of As (III) and As (V) in grape juice samples by differential pulse cathodic stripping voltammetry Determinação de As (III) e As (V) em amostras de suco de uva por voltametria de redissolução catódica Juliana Machado de CARVALHO, Katia Christina LEANDRO.....	100-104
1440	Efeito da adição de erva-mate nas características sensoriais e físico-químicas de barras de cereais Effect of yerba mate on the sensory and physicochemical characteristics of cereal bars Lucinéia CHIESA, Cláudia SCHLABITZ, Cláucia Fernanda Volken de SOUZA	105-110
1441	Fécula de mandioca e farinha de albedo de laranja na formulação de bolos de chocolate Cassava starch and orange albedo flour in chocolate cakes formulation Izabel Cristina Veras SILVA, Aline Alves Oliveira SANTOS, Aline Rezende ALVES, Mayra Crystiane de Aragão BATISTA, Paulo Sérgio MARCELLINI.....	111-117
1442	Teor de gordura e de água: fatores determinantes na textura e na aceitabilidade de requeijão light Fat and moisture contents: determining factors on the light processed cheese texture and acceptability Rita de Cássia dos Santos Navarro da SILVA, Valéria Paula Rodrigues MINIM, Márcia Cristina Ribeiro Teixeira VIDIGAL, Jociele Almeida TEIXEIRA, Liliâne Elen da Silva MORAES, Luiz Paulo LIMA, Luis Antônio MINIM.....	118-126

1443	Concentrado proteico do soro e yacon agregam valor nutricional e sensorial em iogurte <i>diet</i> Whey protein concentrate and yacon enhance the nutritional and sensory values in diet yogurt Maria Inês DANTAS, Christiane Mileib VASCONCELOS, Carina Aparecida PINTO, Valéria Paula Rodrigues MINIM, Hércia Stampini Duarte MARTINO.....	127-133
1444	Leite fermentado caprino sabor umbu: elaboração e aceitabilidade Fermented umbu-flavored goat milk: elaboration and acceptance Rita Vieira GARCIA, Antônio Eustáquio Rezende TRAVASSOS.....	134-139
1445	Análise descritiva quantitativa e aceitação sensorial de iogurte obtido pela mistura de leite caprino e bubalino Quantitative and descriptive analysis and sensory acceptance of yoghurt made from caprine and bubaline milk mixtures Maria de Fátima BEZERRA, Roberta Targino Pinto CORREIA.....	140-147
1446	Investigação da presença de anorexígenos, benzodiazepínicos e antidepressivos em formulações fitoterápicas emagrecedoras Investigation on the occurrence of anorexigens, benzodiazepines and antidepressants in the weight-reducer phytotherapy formulations Daniela Santos Maia ANDRIOLO, Luzia Helena da CUNHA, Amália Soares SANTANA, Maria Eloíza SAMPAIO, Virgínia del Carmen Troncoso VALENZUELA, Maria Gorette Resende DUARTE, Eliana de Faria GARCIA.....	148-152
1447	Ensaio da membrana cório-alantoide (HET-CAM e CAM-TBS): alternativas para a avaliação toxicológica de produtos com baixo potencial de irritação ocular Chorioallantoic membrane assays (HET-CAM and CAM-TBS): alternative tests for performing toxicological evaluation of products with low potential for ocular irritation Amanda Gleyce Lima de OLIVEIRA, Ronald Santos SILVA, Eloisa Nunes ALVES, Rosaura de Farias PRESGRAVE, Octavio Augusto França PRESGRAVE, Isabella Fernandes DELGADO	153-159
1448	Efeito do pinçamento tardio do cordão umbilical nos níveis séricos de ferritina de crianças de 0, 3 e 6 meses de vida Effect of delayed umbilical cord clamping on ferritin contents in sera from full-term infants aged 0, 3 and 6 months of life Elizandra Leal STEFFEN, José Edson Paz da SILVA, Ângela Regina Maciel WEINMANN, Paulo Afonso BELTRAME.....	160-165
1449	Avaliação da expressão dos antígenos Ki-67 e CD71 em células blásticas CD34 positivas nas leucemias agudas Determination of Ki-67 and CD71 antigens expression on CD34-positive blastic cells in acute leukaemias Heliana Trindade MARINHO, Elda Pereira NORONHA, Érika Bárbara Abreu Fonseca THOMAZ, Geni Lourdes de Resende Ramos VERAS, Raimundo Antônio Gomes OLIVEIRA	166-171
1450	Desempenho da metodologia de revisão rápida de 100% em esfregaços citopatológicos do colo do útero com e sem informações clínicas Performance of the 100% rapid review methodology on cervix Pap smears with and without clinical information Edna Joana Cláudio MANRIQUE, Nadja Lindany Alves SOUZA, Suelene Brito do Nascimento TAVARES, Luiz Carlos ZEFERINO, Rita Goreti AMARAL	172-177
■ COMUNICAÇÃO BREVE/BRIEF COMMUNICATION		
1451	Micro-organismos patogênicos e deteriorantes em chocolate artesanal ao leite Pathogenic and deteriorative microorganisms in homemade milk chocolate Talita Schneid TEJADA, Priscila Alves DIAS, Rita de Cássia dos Santos da CONCEIÇÃO, Cláudio Dias TIMM.....	178-181
1452	Survival of pathogenic microorganisms in kefir Sobrevivência de micro-organismos patogênicos em kefir Priscila Alves DIAS, Daiani Teixeira da SILVA, Talita Schneid TEJADA, Maria Cristina Garcia Moraes LEAL, Rita de Cássia dos Santos da CONCEIÇÃO, Cláudio Dias TIMM	182-186

1453	Perfil sanitário da carne bovina <i>in natura</i> comercializada em supermercados	
	Sanitary profile of fresh beef commercialized in supermarkets	
	Vanessa de Souza Rodrigues MATOS, Ana Paula Portela GOMES, Vilmara Almeida dos SANTOS, Fernanda FREITAS, Isabella de Matos Mendes da SILVA	187-192
1454	Avaliação da qualidade físico-química de leites pasteurizados	
	Evaluation of physicochemical quality of pasteurized milk	
	Emanuel Neto Alves de OLIVEIRA, Dyego da Costa SANTOS.....	193-197
■ NOTA CIENTÍFICA/ SCIENTIFIC NOTE		
1455	Uso de soro de leite bovino para elaboração de meios de cultura para <i>Staphylococcus aureus</i>	
	Culture media made by bovine whey for <i>Staphylococcus aureus</i> growth	
	Renata Albuquerque COSTA, Márcia Viviane de BRITO, Verônica Sousa de BRITO, Joséires Lira de Sousa FONTENELLE, Jackson Rafael Oliveira PEIXOTO, Gustavo Hitzschky Fernandes VIEIRA, Regine Helena Silva dos Fernandes VIEIRA	198-201
1456	Contaminação fúngica em condimentos de feiras livres e supermercados	
	Fungal contamination in spices sold in street markets and supermarkets	
	Luciana Portela da SILVA, Adelayne Rodrigues ALVES, Cíntia de Moraes BORBA, Mitra MOBIN.....	202-206
1457	Avaliação da qualidade química e microbiológica de salsichas tipo Viena	
	Evaluation of the chemical and microbiological qualities of Vienna type sausages	
	Tahis Regina BAÚ, Cristiane de Abreu DIAS, Alexandre da Trindade ALFARO	207-210
■ RESUMOS DE TESES E DISSERTAÇÕES		
	Solar and conventional drying of residual annatto grains	
	Secagem solar e convencional de grãos residuais de urucum	
	Dyego C. Santos	211
	Processing, characterization and storage of traditional and diet umbu-caja jams	
	Processamento, caracterização e armazenamento de geleia tradicional e dietética de umbu-cajá	
	Emanuel N. A. Oliveira	212
■ INSTRUÇÕES AOS AUTORES.....		
		213-218

Qualidade e segurança do pescado

Seafood quality and safety

RIALA6/1426

Karoline Mikaelle de Paiva SOARES*, Alex Augusto GONÇALVES

*Endereço para correspondência: Departamento de Ciências Animais, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Av. Francisco Mota, 572, CEP: 59.625-900, Bairro Costa e Silva, Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil. E-mail: karolinemikaelle@hotmail.com

Recebido: 29.06.2011 - Aceito para publicação: 17.01.2012

RESUMO

A carne de pescado possui uma constituição química peculiar que lhe confere riqueza nutricional, porém com alto potencial de deterioração. Neste contexto, os benefícios nutricionais deste grupo alimentar só podem ser aproveitados quando os fatores segurança e qualidade forem garantidos, tornando-se fundamental o emprego de ferramentas que possam agir na contenção dos mecanismos de deterioração, como o emprego da cadeia do frio em todas as etapas do seu processamento. O presente artigo teve o objetivo de reunir as informações relevantes relatadas na literatura sobre pescado, suas características gerais, mecanismos de deterioração e métodos de avaliação da qualidade.

Palavras-chave. pescado, deterioração, frescor.

ABSTRACT

The seafood flesh has a peculiar chemical constitution which provides nutritional riches, but it shows a high deteriorating potential. In this context, the nutritional benefits of this food group can be put to good use only after guaranteeing the product safety and quality. Therefore, the use of tools for slowing the deteriorative mechanisms down has been crucial, such as the cold chain application in all of the seafood processing stages. This study is aimed at collecting relevant data on seafood from specific scientific literature concerning its general characteristics, deterioration mechanisms and quality evaluation methodologies.

Keywords. seafood, deterioration, freshness.

INTRODUÇÃO

O termo “pescado” designa todo alimento que pode ser retirado de águas oceânicas ou interiores (doces ou salobras) e que possa servir para alimentar o homem ou os animais. É um termo genérico, envolvendo peixes, crustáceos, moluscos, algas, etc.¹.

O consumo *per capita* do pescado vem aumentando, consideravelmente, nas últimas décadas², sendo que a média mundial permanece em torno de 16 quilos por pessoa ao ano³, bem acima da média no Brasil (7 kg/pessoa/ano), onde a carne de peixes representa apenas 5% do total de carnes consumidas no país⁴. Esse baixo índice de consumo, no Brasil, deve-se entre outros fatores à baixa disponibilidade do pescado em grandes quantidades⁵.

O pescado é uma das principais fontes de proteína na alimentação humana, caracterizado por elevada digestibilidade e alto valor biológico, além de um elevado teor de ácidos graxos poli-insaturados, sendo um alimento mais saudável do ponto de vista nutritivo⁶.

Apesar da elevada importância nutricional, o pescado é o alimento de origem animal com maior probabilidade de deterioração, principalmente por apresentar pH próximo a neutralidade, elevada atividade de água nos tecidos, alto teor de nutrientes facilmente utilizáveis pelos micro-organismos, acentuado teor de fosfolípidios e rápida ação destrutiva das enzimas presentes nos tecidos e nas vísceras do peixe^{7,8}.

A vida útil dos produtos alimentícios refere-se ao intervalo de tempo em que o produto pode ser conservado em determinadas condições de temperatura, umidade relativa, luminosidade, oxigênio etc., de forma a garantir seus atributos sensoriais e nutricionais. No entanto, durante esse período ocorrem reações de deterioração da qualidade⁹. No intervalo decorrido da captura até o processamento ou comercialização, o pescado fica sujeito a perdas de qualidade (físico-química, sensorial e microbiológica) devido às condições de armazenamento a bordo e à natureza da sua composição, podendo haver alterações nas características químicas, físicas ou microbiológicas, que resultam em alterações sensoriais. Os vários métodos de captura, tempo de arraste, áreas de pesca, resfriamento, etc. influenciam o grau de conservação e frescor do peixe.

O frescor é um atributo que varia continuamente e significa que o peixe apresenta propriedades similares às que possuía em vida ou que se passou um período curto

após captura¹⁰. Entre os principais métodos de avaliação do frescor, destacam-se os sensoriais, os físico-químicos e os microbiológicos. A avaliação sensorial é o método mais utilizado, em virtude de baixo custo, eficiência e praticidade, sendo comumente realizada no setor de pescado e pelos serviços de inspeção sanitária.

Valor nutricional da carne de pescado

A carne de pescado constitui uma fonte de proteínas de alto valor biológico, sendo em vários países, como os da Europa e da Ásia, a proteína de origem animal mais consumida. Com relação à quantidade e à qualidade das proteínas do pescado, o teor é sempre alto, variando entre 15% a 25%¹¹.

O pescado apresenta todos os aminoácidos essenciais e tem elevado teor de lisina, um aminoácido iniciador do processo digestivo e necessário na dieta brasileira à base de arroz. A digestibilidade é alta, acima de 95%, conforme a espécie, e superior à das carnes em geral e à do leite, devido à mínima quantidade de tecido conjuntivo. O valor biológico é próximo de 100, determinado pela alta absorção dos aminoácidos essenciais¹².

Os músculos do pescado são constituídos por vários grupos de proteínas: as que formam a fração sarcoplasmática, desempenhando funções bioquímicas nas células; as proteínas miofibrilares do sistema contrátil; e as proteínas dos tecidos conjuntivos, responsáveis principalmente pela integridade dos músculos¹². O músculo do peixe é funcionalmente similar ao dos mamíferos, mas há diferenças importantes quanto ao comprimento das fibras musculares (mais curtas nos peixes) e à inserção das fibras no miocomata, que correspondem a tabiques de tecido conjuntivo que separam fibras musculares longitudinais⁶.

Neste grupo alimentar, o nível de colesterol, em geral, é baixo. Além disso, o pescado possui elevado teor de ácidos graxos poli-insaturados, que possuem efeito cardioprotetor, reduzindo os riscos de doenças coronarianas. Os efeitos cardioprotetores dos ácidos graxos poli-insaturados do grupo ômega-3 podem ser atribuídos a múltiplos efeitos fisiológicos dos lipídios, como na pressão sanguínea, na função vascular e na manutenção da euritmia cardíaca⁹. Em estudo realizado na Itália, em 2002, concluiu-se que o suplemento diário de 1 g de ácidos graxos poli-insaturados ω -3, encontrados no óleo de peixe, reduziu significativamente o risco de morte súbita em pessoas convalescentes de ataques cardíacos¹¹.

Os peixes de água salgada são ricos em minerais, como iodo e cálcio, possuindo uma concentração de cálcio quatro vezes maior que carnes bovinas¹³.

Qualidade do pescado *versus* riscos a saúde pública

A segurança e a qualidade dos produtos alimentares são tópicos importantes da atualidade, o que é evidenciado pelo crescente número de leis que exigem a qualidade dos alimentos nas várias etapas da cadeia de produção. A qualidade dos produtos da pesca e aquicultura é, em grande parte, determinada pelo grau de frescor¹⁴. Efetivamente, os produtos da pesca são muito perecíveis em comparação com outros de origem animal, devido não só às suas características intrínsecas, mas também ao habitat natural. Assim, a presença de elevada quantidade de água, o tipo de proteínas e o baixo teor de tecido conjuntivo, bem como a natureza psicrófila da flora bacteriana, determinam a ocorrência de um conjunto de alterações que rapidamente contribuem para sua desvalorização ou rejeição¹⁵.

Principais riscos a saúde humana

As doenças transmitidas por alimentos representam um importante problema de saúde pública, por acometerem milhões de pessoas em todo o mundo¹⁶. Gonçalves¹⁷ ressalta a importância da análise de risco no setor pesqueiro, destacando, nas etapas que vão do processamento à comercialização, os patógenos emergentes como os principais contribuintes para as doenças carreadas pelos alimentos atualmente. Além disso, enfatiza o risco microbiológico como um dos itens mais avaliados pela indústria de processamento do pescado visando à segurança alimentar. Entre os principais patógenos associados ao pescado que emergiram nos últimos vinte anos, citam-se: *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* 0157H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Enteritidis*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus*, *Yersinia enterocolitica*, *Norwalk-like virus*, *Rotavirus*, *Cryptosporidium parvum* e *Giardia lamblia*.

Outro importante aspecto associado à qualidade do pescado é o risco de intoxicação por histamina, que é uma amina não volátil que pode ser produzida em algumas espécies de pescado a partir da histidina livre. Os peixes são um dos raros animais que acumulam histidina livre nos fluidos musculares. A descarboxilação da histidina por enzimas bacterianas resulta em formação de histamina^{18,19}. Veciana-Nóguas et al.²⁰ ressaltam que o conteúdo de histamina em pescado recém-capturado

é muito baixo, enfatizando que seu aumento está relacionado a contaminação dos peixes após a captura, processo de deterioração, manipulação inadequada do produto em temperaturas altas de estocagem e condições precárias de higiene.

Além dos riscos associados aos micro-organismos patogênicos, merecem destaque pela importância em saúde pública os endoparasitas e as biotoxinas¹¹. Os peixes são passivos de infecção por numerosas espécies de parasitas protozoários e metazoários que podem ser encontrados na superfície do corpo ou nos órgãos internos²¹.

Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), a Organização Mundial da Saúde (OMS) e outras organizações relacionadas à saúde, as ictioparasitoses são patologias emergentes que mostram uma tendência de crescimento alarmante em nível global e que constituem uma preocupação que justifica a necessidade de se estabelecerem mecanismos de luta visando o seu controle²². São endoparasitoses relevantes em saúde pública a *Phagicola longa* e os nematoides da família *Anisakidae*, que possui identificação mais recente que a primeira¹¹. Segundo Pereira et al.²³, vermes da família *Anisakidae* são nematoides parasitas do aparelho gástrico de mamíferos marinhos, como focas, baleias e golfinhos. As larvas desses parasitas são encontradas frequentemente em carne de salmão, bacalhau, arenque, atum, hadoque e linguado (hospedeiros intermediários). A infecção humana resulta do hábito do homem de se alimentar com peixes crus, cozidos de forma insuficiente, congelados, salgados ou defumados, contendo larvas infectantes vivas do nematoide. As espécies mais comumente envolvidas na infecção humana são *Anisakis simplex* e *Pseudoterranova decipiens*.

Deterioração do pescado

Entre os produtos de origem animal, o pescado representa o mais susceptível ao processo de deterioração. Isso se deve à associação de fatores intrínsecos e extrínsecos. Entre os fatores intrínsecos, apresentam maior relevância: a elevada atividade de água dos tecidos, o teor elevado de nutrientes que podem facilmente ser utilizados pelos micro-organismos, a rápida ação destrutiva das enzimas naturais presentes nos tecidos, a alta taxa de atividade metabólica da microbiota, a grande quantidade de lipídeos insaturados e pH próximos à neutralidade²⁴.

A manipulação do pescado, desde a captura ao processamento/comercialização, é fundamental na

garantia da qualidade dos mesmos, determinando a intensidade com que se desenvolvem as alterações, que obedecem a três causas principais: enzimática, oxidativa e bacteriana²⁵. A rapidez com que se desenvolvem cada uma dessas alterações depende de como foram aplicados os princípios básicos da conservação, assim como da espécie e dos métodos de captura⁶.

Manipulação do pescado

Os métodos de captura aos quais o pescado é submetido influenciam na sua qualidade. Se o pescado se debate tentando se libertar das redes de pesca ou morre em agonia nos barcos pesqueiros, ocorre o esgotamento de suas reservas de energia (glicogênio), ocasionando um *rigor mortis* mais rápido e, conseqüentemente, uma deterioração mais acelerada e intensa; portanto, quanto mais glicogênio é armazenado, maior é o tempo de vida útil do produto.

O pescado começa a alterar-se imediatamente após a captura. Por essa razão, a manipulação cuidadosa é fundamental, o que implica cumprir três princípios gerais: resfriar imediatamente, evitar abusos de temperatura e manter elevado o grau de limpeza tanto na cobertura como no porão do barco. O resfriamento é a operação mais crítica na manipulação do pescado a bordo⁶. A utilização de gelo de forma adequada e na devida proporção é a forma mais comum²⁶. O pescado fresco deve ser mantido o mais próximo possível do ponto de congelamento, com a temperatura próxima a 0 °C²⁷.

O gelo utilizado na conservação do pescado em escamas ou picado de barras deve ser produzido a partir de água potável e ter boa procedência e qualidade principalmente quanto ao padrão microbiológico, pois, apesar de o gelo não ser um bom meio de cultivo para bactérias, devido à falta de nutrientes, o mesmo poderá funcionar como veículo de transporte ao pescado²⁵.

A evisceração e a lavagem constituem outras operações que exigem cuidados durante a manipulação⁶.

Rigor mortis ou rigidez cadavérica

Rigor mortis significa o enrijecimento do músculo como resultado do esgotamento de trifosfato de adenosina (ATP). Após a morte do pescado, os compostos orgânicos da carne se hidrolisam. O glicogênio é o composto que se hidrolisa mais rapidamente, provocando acúmulo de ácido láctico no músculo e reduzindo o pH²⁸.

Este evento é resultado de reações bioquímicas complexas no músculo, ocorrendo do seguinte modo:

após a morte do peixe por asfixia, cessa a entrada de O₂, e os produtos metabólicos não oxidados no sangue e nos músculos paralisam o sistema nervoso. Ocorrem a hiperemia e a liberação de muco. Neste momento, o peixe está em pré-rigor, fase que dura de 1 a 2 horas, tendo o glicogênio como fonte de energia e o ATP combinado com a miosina, o que confere ao peixe uma carne branda com pH médio de 7,0. O ATP presente (2.200 µg de trifosfato de adenosina/g de peixe) é usado para liberar energia, transformando-se em ADP (adenosina difosfato). Em seguida, há redução total do ATP. É liberada a miosina que estava combinada com o ATP. Aparece o ácido láctico (3.300 µg/g) formado a partir da degradação do glicogênio. Este é o ponto de passagem do pré-rigor para o *rigor mortis*²⁹.

A recuperação do *rigor mortis* ocorre quando o músculo se relaxa novamente e recupera a flexibilidade, porém não a elasticidade característica da fase pré-rigor. A proporção entre o começo e a resolução do rigor varia segundo a espécie e é afetada por temperatura, manipulação, tamanho e condições físicas do pescado²⁷. Ao terminar essa fase, têm início as fases de deterioração autólise e bacteriana.

Autólise

Segundo Beirão et al.²⁸, autólise é o processo de hidrólise de proteínas e gorduras que constituem a carne do pescado devido à ação das enzimas proteolíticas e lipolíticas. Huss²⁷ ressalta que as alterações autolíticas são responsáveis pela perda inicial da qualidade do peixe fresco, mas contribuem muito pouco para a deterioração do peixe refrigerado e de outros produtos da pesca. Porém o rápido desenvolvimento de cheiros desagradáveis e o aparecimento de manchas devido à ação das enzimas digestivas em alguns peixes não eviscerados constituem exceções.

Franco e Landgraf³⁰ descrevem a autólise como o processo decorrente de duas ações principais:

- Ação dos sucos digestivos: esses sucos possuem natureza ácida e muitas enzimas proteolíticas atravessam a parede intestinal após a morte do pescado, indo atuar sobre os tecidos musculares, provocando sua decomposição e facilitando a disseminação de micro-organismos do trato gastrointestinal. Essas enzimas também atacam e perfuram as vísceras, acelerando a deterioração.
- Ação das enzimas dos tecidos: levam ao amolecimento e à desintegração da carne,

facilitando a disseminação dos micro-organismos contaminantes.

Decomposição bacteriana

O desenvolvimento bacteriano é um dos principais fatores que levam à deterioração do pescado. A grande maioria das bactérias apresenta atividades proteolíticas e lipolíticas, contribuindo para a desintegração dos tecidos, levando a uma série de reações bioquímicas indesejáveis, com subsequentes formação e acúmulo de substâncias de odor desagradável, repugnantes e tóxicas³¹.

Vieira e Saker-Sampaio³² ressaltam que ação microbiana no *pós-mortem* se deve a ausência de defesas naturais contra a penetração de micro-organismos na carne, o que existia enquanto músculo. A microbiota bacteriana de deterioração do pescado consiste de bastonetes gram-negativos não esporulados, onde os principais micro-organismos associados à deterioração do mesmo são os pertencentes aos gêneros: *Pseudomonas*, *Acetobacter*, *Moraxella*, *Flavobacterium*. Estes são influenciados pela natureza do ambiente aquático, onde a temperatura é um dos fatores seletivos³³. Além desses, os coliformes frequentemente podem estar relacionados à contaminação e à deterioração dos alimentos. Os peixes frescos resfriados são invariavelmente deteriorados por bactérias, enquanto os peixes salgados e secos têm tendência maior a serem deteriorados por fungos. Muitas bactérias deteriorantes possuem um bom crescimento entre 0 e 1 °C³⁴.

A deterioração de peixes de água doce e salgada ocorre de forma semelhante, sendo que a principal diferença é a presença de uma flora de água salgada para os peixes marinhos e as diferentes composições químicas dos constituintes de nitrogênio não proteico dos peixes.

A parte mais suscetível a ação bacteriana é a região das brânquias. Os primeiros sinais de deterioração podem ser notados quando estas estruturas começarem a exalar odor desagradável. Após, se o pescado não for eviscerado imediatamente, as bactérias do intestino vão logo para as paredes e cavidades intestinais³⁴. Outras regiões suscetíveis a intensa deterioração bacteriana são os intestinos e o limo superficial. No músculo, as substâncias nitrogenadas não proteicas são as primeiras a serem atacadas pela ação bacteriana, e posteriormente ocorre o consumo de proteínas e a formação de odor desagradável³².

No início, o peixe fresco possui flora, cor e textura características, com predominância de *Flavobacteria*. Já

quando em refrigeração, *Pseudomonas* multiplicam-se facilmente, mesmo a 0 °C. Após 9-10 dias de estocagem, registram-se populações de 10⁷-10⁸ UFC/g, e, em 10-12 dias, 60-90% da população é de *Pseudomonas*. O restante corresponde a *Acromobacter* e *Flavobacterium*³⁵.

O processo e a natureza da decomposição bacteriana dependem da composição da microbiota, da oxidação aeróbia ou de processos de redução aeróbia. Os principais produtos finais da decomposição bacteriana são: substâncias inorgânicas, hidrogênio, CO₂, amoníaco, compostos sulfurados, H₂S e mercaptanos; ácidos graxos de cadeia curta (acético, propiônico, valérico, láctico, succínico), ácidos aromáticos (benzoico, fenil propiônico e seus sais amoniacaais), bases orgânicas, incluindo as mais simples monoaminas (metilamina, dimetilamina e trimetilamina), monoaminas cíclicas (histamina e feniltilamina) e diaminas (putrescina e cadaverina). As principais alterações nos compostos nitrogenados não proteicos são: redução do óxido de trimetilamina (OTMA) a trimetilamina (TMA), descarboxilação da histidina em histamina e decomposição da ureia com liberação de amônia⁶.

Oxidação lipídica

A oxidação de lipídios ocorre quando elétrons são removidos de um átomo ou um grupo de átomos, ou seja, dá-se pela perda de elétrons durante a transferência destes de uma substância a outra, um de cada vez ou em pares. Essa reação é causada pelo oxigênio atmosférico, menos frequentemente por ozônio, peróxido, metais e outros agentes oxidantes. A oxidação lipídica leva à formação de radicais livres, promovendo alterações de diversas propriedades, principalmente as sensoriais (sabor, aroma, textura e cor)³⁶.

A velocidade da reação de oxidação depende do grau de insaturação na molécula do ácido graxo. Quanto maior é o grau de insaturação, maior é a suscetibilidade a oxidação. O elevado grau de insaturação das gorduras do pescado o torna bastante suscetível a oxidação, tornando o produto rançoso. Isso acarreta alterações não apenas no sabor, mas também pode apresentar riscos associados à formação de peróxidos resultantes da degradação. A rancificação produz um cheiro forte e um sabor acre^{5,29}.

Métodos de avaliação da qualidade do pescado

Segundo Gonçalves⁹, a complexidade do processo de decomposição do pescado torna impossível o uso de apenas um método para avaliar sua qualidade. Portanto, é

mais viável e segura a utilização de métodos combinados. Geralmente, combinam-se um método sensorial (subjetivo) e um método não sensorial (objetivo). Os métodos sensoriais são muito antigos, porém muito utilizados. Entre os métodos não sensoriais, destacam-se os físicos (pH, tensão das fibras musculares, propriedades elétricas, dureza do músculo, viscosidade do suco extraído da carne, entre outros), os químicos (nitrogênio das bases voláteis totais, nitrogênio de trimetilamina, hipoxantina, histamina, valor de K, aminas, aminoácidos livres, H₂S, etc.) e os microbiológicos.

Métodos físico-químicos

Os métodos físico-químicos são utilizados para quantificar a formação de compostos de degradação no pescado. Várias são as determinações que podem avaliar o grau de conservação do pescado, como a medição do pH, a de bases voláteis totais (BVT) e a de histamina por espectrofluorimetria, além da reação de Éber para gás sulfídrico³⁷.

Os métodos utilizados devem seguir legislações oficiais. No Brasil, os métodos analíticos oficiais são estabelecidos pela Instrução Normativa n. 25, de 2 de junho de 2011, segundo a qual amostras encaminhadas a provas físico-químicas deverão estar separadas daquelas enviadas a análises microbiológicas³⁸.

Quanto ao pH, a legislação brasileira estabelece valores máximos de 6,5 e 6,8 para as musculaturas interna e externa dos peixes, respectivamente^{39,40}. Segundo Ogawa e Maia⁵, o pH não é um índice seguro para avaliar o estado de frescor do peixe, e por isso seu uso geralmente é restrito por variar de amostra para amostra.

As bases voláteis totais representam o conjunto das bases nitrogenadas, como amônia, trimetilamina, dimetilamina, monometilamina, putrescina, cadaveriana e espermidina, normalmente presentes em pescado que deteriora. Segundo Jesus et al.⁴¹, o nitrogênio das BVT tem sido utilizado para estimar objetivamente a qualidade do pescado (grau de frescor), esperando que, à medida que as contagens microbianas sejam mais elevadas, seus valores aumentem, ultrapassando o limite estabelecido pelo MAPA – 30 mg/100 g de músculo⁴⁰.

Muitos autores citam a análise de N-BVT como o principal método objetivo de análise de frescor em pescado. Fontes et al.⁴², ao avaliarem o estado de frescor e a qualidade higiênica do pescado vendido em uma cidade do interior de Portugal, elegeram a análise de N-BVT como o método objetivo sempre que surgiam

dúvidas relativas ao grau de frescor do pescado. Nesta pesquisa, o pescado próprio para consumo apresentou valores que variaram entre os 20,60 e 27,36 mg/100g. Em contrapartida, outros estudos mostram que os limites de 30 mg/100 g não são adequados para todos os tipos de peixe, pois algumas espécies apresentam níveis de N-BVT acima do padrão permitido, mas demonstram estar em condições microbiológicas e sensoriais favoráveis ao consumo. Da mesma forma, outros tipos de peixes, mesmo contendo níveis de N-BVT compatíveis com a legislação, oferecem condições desfavoráveis ao consumo⁴³. Por esta razão, muitas pesquisas recentes têm criticado a utilização da análise de N-BVT como critério único para avaliar o frescor desses produtos. Howgate⁴⁴, em uma revisão crítica sobre a utilização da análise de N-BVT como parâmetro para avaliar o frescor, cita que os teores de N-BVT são muitos variáveis até mesmo em peixes da mesma espécie, devido a fatores biológicos, época do ano e habitat.

A histamina é uma amina primária formada a partir da descarboxilação por meio da enzima histidina-decarboxilase. Essa reação pode ser acelerada por bactérias como *Proteus morgagnii* e *Proteus vulgaris* e outras bactérias mesófilas, e por isso a medição da histamina torna-se um importante método de avaliação da qualidade do pescado⁴⁵. Segundo a legislação brasileira, o nível máximo permitido de histamina no músculo de pescado é de 100 ppm nas espécies pertencentes às famílias *Scombridae*, *Scombresocidae*, *Clupeidae*, *Coryyphaenidae* e *Pomatomidae*³⁹.

A reação de Éber para gás sulfídrico é indicada para avaliar o estado de conservação do pescado fresco e de produtos relacionados em geral, como o pescado curado. É utilizada para avaliar o frescor em pescados porque a decomposição bacteriana no músculo do animal libera enxofre, que em meio ácido se transforma em gás sulfídrico. Fundamenta-se na combinação do gás sulfídrico com solução de acetato de chumbo, produzindo enegrecimento do papel de filtro previamente tratado com a referida solução-reagente. Esta prova não se aplica no caso de produtos condimentados e em conservas de pescado que foram processadas em alta temperatura e baixa pressão, pois pode resultar em falso positivo³⁷.

Métodos microbiológicos

A avaliação microbiológica de alimentos é usada na avaliação retrospectiva da qualidade microbiológica ou para avaliar a “segurança” presumível dos alimentos.

Testes microbiológicos possuem limitações como opção de controle de qualidade do pescado, que se referem ao tempo, já que os resultados ficam disponíveis vários dias após o teste, e às dificuldades relacionadas a amostragem, métodos analíticos e uso de micro-organismos indicadores²⁷.

No Brasil, a Resolução RDC n. 12/2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) define os padrões microbiológicos para alimentos expostos a venda e exportação. As bactérias sobre as quais a legislação estabelece limites quase sempre não alteram a aparência do pescado, entretanto a limitação decorre da patogenicidade ao homem, e não por deteriorarem o produto. As salmonelas e as escherichias são redutoras de OTMA; e as primeiras, em pequeno número, já são capazes de causar danos à saúde do consumidor, bem antes de causarem alterações de odor (odor amoniacal), razão pela qual se investiga apenas sua presença em 25 g do alimento^{25,46}.

A segurança do pescado quanto ao padrão microbiológico é de suma importância, visto que as doenças transmitidas por alimentos têm sempre ocorrido em decorrência da falta de cuidados e de controle desde a aquisição da matéria-prima até a manipulação e o processamento⁴⁷.

No pescado, a qualidade sanitária da água de onde os animais são retirados constitui o ponto-chave para a obtenção de um produto final de boa qualidade microbiológica. Germano e Germano¹¹ afirmam que o pescado pode ser veiculador de uma gama enorme de micro-organismos patogênicos para o homem, a maior parte deles decorrente da contaminação ambiental. O lançamento de esgotos nas águas de reservatórios, lagos e rios e no próprio mar é a causa poluidora mais comum registrada no mundo inteiro. No caso particular da pesca marítima, a captura em águas costeiras oferece mais riscos do que a realizada em alto-mar.

Além da água, os micro-organismos podem ser adquiridos nas várias etapas do processamento, como o descasque, a descamação, a evisceração, o empanamento e outros³⁴.

Dentre os micro-organismos mais importantes, destacam-se os pertencentes ao gênero *Vibrio*. *V. parahaemolyticus* é usual na água do mar, principalmente no nível das regiões costeiras, e pode estar associado a processos infecciosos do pescado, afetando em particular as criações de camarão marinho. No homem, causa gastroenterite aguda, caracterizada por quadro

disentérico, principalmente após o consumo de peixe *in natura*, mariscos, camarões e ostras. *V. cholerae*, de origem humana, pode ser adquirido pelo consumo de pescado e causar cólera. Além desse gênero, outros importantes são *Salmonella*, *Streptococcus*, *Shigella* e *Sthaphylococcus*¹¹.

Métodos sensoriais

Segundo Oetterer⁴⁸, peixe “fresco” é definido como aquele que possui características sensoriais bem definidas, que proporcionam maior aceitação pelo consumidor.

A percepção sensorial é o método mais antigo e confiável para a avaliação do frescor do pescado, sendo largamente empregado na rotina da indústria de pescado devido a necessidade por rapidez no julgamento de lotes de matéria-prima e do produto acabado, bem como pela facilidade de execução⁹.

A análise sensorial é utilizada para avaliar o frescor dos alimentos, como o pescado, levando em conta aspectos sensoriais como coloração e aparência⁴⁹. Como as alterações que mais caracterizam a deterioração em peixes estão relacionadas principalmente a alterações sensoriais, a análise sensorial é o principal método de avaliação do frescor em peixes.

A avaliação sensorial é considerada satisfatória na avaliação da qualidade de peixes, apresentando vantagens adicionais como rapidez, baixo custo, não ser destrutiva e estar relacionada aos critérios de aceitação adotados pelos consumidores²⁴.

A inspeção sanitária do pescado, realizada conforme a legislação brasileira em vigor, baseia-se, principalmente, em observações sensoriais, privilegiando a visão, o tato e o olfato e verificando a apresentação, o aspecto, a consistência, a resistência e o odor ou cheiro⁵⁰. Esta prática permite a liberação para o comércio varejista ou a indústria alimentícia somente de pescados em boas condições higiênico-sanitárias. No entanto, assim que o pescado é liberado, forma-se uma extensa cadeia de comercialização, que propicia o desenvolvimento de contaminações microbiológicas⁵¹.

Segundo o RIISPOA⁴⁰, o pescado fresco próprio para consumo deverá apresentar as seguintes características sensoriais:

- Superfície do corpo limpa, com relativo brilho metálico;
- Olhos transparentes, brilhantes e salientes, ocupando completamente as órbitas;

- Guelras róseas ou vermelhas, úmidas e brilhantes, com odor natural, próprio e suave;
- Ventre roliço, não deixando impressão duradoura à pressão dos dedos;
- Escamas brilhantes, bem aderentes à pele, e nadadeiras apresentando certa resistência aos movimentos provocados. Não devem ser viscosas.
- Carne firme, consistência elástica, de cor própria da espécie;
- Vísceras íntegras, perfeitamente diferenciadas;
- Ânus fechado;
- Cheiros específicos, lembrando o das plantas marinhas.

Na União Europeia, foi proposto o Regulamento Comunitário n. 2.406/96, de 26 de novembro de 1996, que inclui esquemas de avaliação do grau de frescor para alguns grupos de peixes (brancos, azuis e elasmobrânquios), cefalópodes e crustáceos e que se destinam a serem usados tanto pela indústria como pelos serviços de inspeção¹⁵.

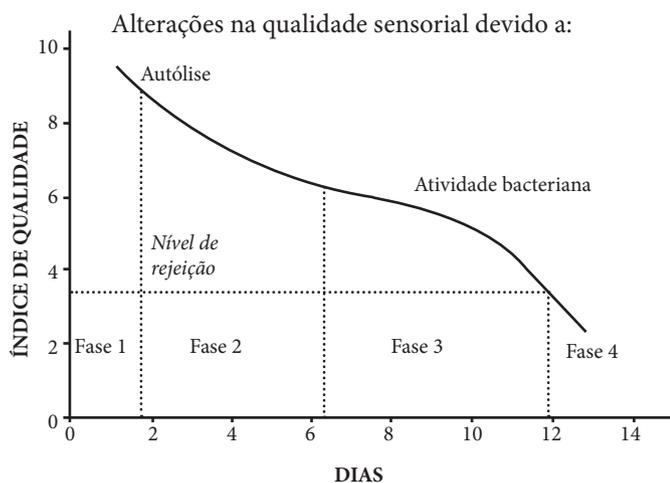


Figura 1. Evolução típica da análise sensorial de pescado, obtida por meio de métodos usuais. Adaptado¹⁴

Entre os métodos de análise sensorial com pescado, o método do índice de qualidade (MIQ) destaca-se por ser específico para cada espécie, o que o torna mais fidedigno, e por isso vem sendo bastante estudado nas últimas décadas.

Método do Índice de Qualidade

O método do índice de qualidade (MIQ) é uma avaliação sensorial que procura ultrapassar as dificuldades surgidas na aplicação das tabelas da União

Europeia mencionadas anteriormente. Este método, que ultimamente tem merecido grande atenção por parte da indústria de processamento e do setor da comercialização, inspeção e investigação, foi desenvolvido em meados de 1980 na Tasmanian Food Research Unit^{52,53}. O MIQ foi desenvolvido, inicialmente, para peixe inteiro armazenado em refrigeração e, hoje, tem sido aplicado, entre outros produtos, em filé e peixe congelado¹⁶.

Segundo Martinsdóttir et al.⁵⁴, o MIQ possui algumas vantagens únicas, como:

- o provador deve avaliar todos os parâmetros incluídos no esquema, não podendo escolher os parâmetros mais importantes;
- é um método objetivo e mais prático que outros;
- a informação pode ser usada na gestão de produção, uma vez que há uma relação linear entre índice de qualidade e o tempo de armazenagem em gelo (Figura 2);
- possui uma concepção que permite o treino fácil de pessoas inexperientes na avaliação sensorial de pescado;
- é um método adaptado tanto para treinar provadores quanto para monitorizar seu desempenho.

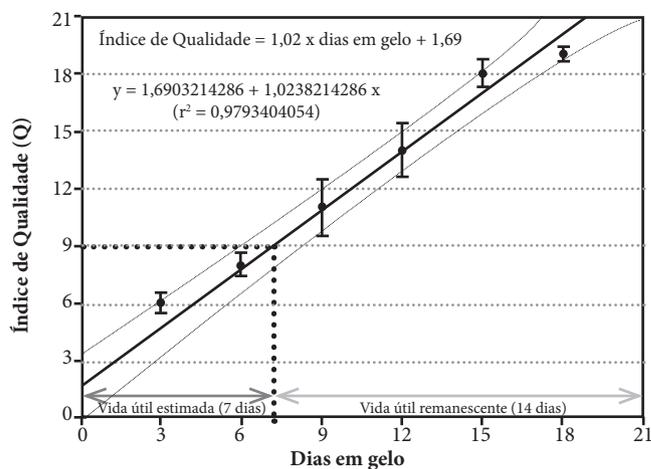


Figura 2. Curva obtida no desenvolvimento do MIQ para a carapeba (*Eucinostomus gula*)⁵⁵

Consiste em um sistema de gradação para estimar o frescor e a qualidade dos pescados, e tem se mostrado rápido e eficiente para muitas espécies de peixes³. Baseia-se na avaliação dos atributos sensoriais considerados significativos (aspecto e/ou textura da pele, aspecto dos olhos, aspecto e odor das brânquias/guelras, etc.) por meio

de um sistema de classificação por pontos de demérito (de 0 a 3). A soma dessas classificações quantifica a falta de qualidade sensorial até um valor máximo, específico de cada espécie ou gênero, que corresponde à total falta de qualidade – impróprio/rejeitado para consumo humano – e que se obtém a partir da análise sensorial de pescado realizada por um painel de provadores treinados⁵⁶.

O peixe no momento da captura tem pontuação zero, ou próxima a zero. Conforme vai se deteriorando, os atributos adquirem pontuações mais elevadas, acumulando pontos de demérito, cujo valor máximo varia de acordo com o protocolo desenvolvido para a espécie estudada⁵⁷.

O MIQ (ou QIM, em inglês) vem sendo adaptado para várias espécies, como o bacalhau inteiro fresco (*Gadus morhua*⁵⁸), dourada (*Sparus aurata*⁵⁹) e carapeba (*Eucinostomus gula*⁵⁵), entre outras.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A carne de pescado constitui uma excelente fonte de proteínas, possuindo todos os aminoácidos essenciais ao homem, além de ser rica em ácidos graxos poli-insaturados do grupo ômega-3 e possuir um baixo teor de colesterol. Porém é um alimento com alto potencial de deterioração, exigindo cuidados em toda a cadeia produtiva, relacionados principalmente à refrigeração e à manipulação que evitam alterações no frescor.

O consumo da carne de pescado submetida a manipulação inadequada pode causar riscos à saúde pública.

Existem vários métodos de se inspecionar a qualidade do pescado, destacando-se os métodos sensoriais, devido a eficiência, praticidade e baixo custo. O MIQ é o método sensorial que vem sendo adotado pelos estudiosos da área de pescado nas últimas décadas. Por ser um método específico, é necessário o desenvolvimento de esquemas para cada espécie.

REFERÊNCIAS

1. Barros GC. Perda de qualidade do pescado, deterioração e putrefação. *Rev Cons Fed Med Vet*. 2003;30:59-64.
2. Delgado CL. Outlook for fish to 2020: meeting global demand international. Malaysia: Food Policy Research Institute; 2003.
3. Oliveira VM, Freitas MQ, Clemente SCS, Mársico ET. Método do índice de qualidade (MIQ) desenvolvido para camarão (*Litopenaeus vannamei*) cultivado. *Rev Ciênc Vida*. 2009;29(1):60-71.
4. Pimenta A. Consumo de carne e peixe no Brasil. [acesso 2010 jul 03]. Disponível em: [http://www.hojeemdia.com.br/cmmlink/hoje-em-dia/colunas-artigos-e_blogs/semanais/aluisio-pimenta-1.338/consumo-de-carne-e-peixe-no-brasil-1.22597].
5. Ogawa M, Maia EL. Manual da pesca: ciência e tecnologia do pescado, v. 1. São Paulo: Varela; 1999.
6. Ordóñez JA. Tecnologia de alimentos de origem animal, v. 2. São Paulo: Artmed; 2005.
7. Gaspar J, Vieira R, Tapia M. Aspectos sanitários do pescado de origem de água doce e marinha, comercializado na feira de Gentilândia, Fortaleza, Ceará. *Ciênc Tecnol Aliment*. 1997;11:20-8.
8. Leitão MFF, Rios DPFA, Guimarães JGL, Baldini VLS, Mainades Pinto CSR. Alterações químicas e microbiológicas em pacu (*Piaractus mesopotamicus*) armazenado sob refrigeração a 5 °C. *Ciênc Tecnol Aliment*. 1997;17:160-6.
9. Gonçalves AA, editor. Tecnologia do pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação. São Paulo: Atheneu; 2011.
10. Gonçalves PMR. O pescado e as bactérias do seu meio ambiente. *Hig Aliment*. 2004;18(116/117):29-32.
11. Germano PML, Germano MIS. Higiene e vigilância sanitária de alimentos. 3. ed. São Paulo: Manole; 2008.
12. Oetterer M, Regitano-D'Arce MAB, Spoto MHF. Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos. Barueri: Manole; 2006.
13. Ornellas LH. Técnica dietética, seleção e preparação de alimentos. 7. ed. São Paulo: Atheneu; 2001. p. 142-3.
14. Esteves E, Anibal J. Quality Index Method (QIM): utilização da análise sensorial para determinação da qualidade do pescado. Congresso do Algarve; 2007; Anais. p. 365-73.
15. Nunes ML, Batista I. Aplicação do índice de qualidade (QIM) na avaliação da frescura do pescado. IPIMAR Divulgação. Lisboa, 29;2004.
16. Kärferlein EK, Motarjemi Y, Bettcher DW. Foodborne disease control: a transnational challenge. *Emerg Infect Dis*. 1997;3(2):503-10.
17. Gonçalves AA. Análise de risco no setor pesqueiro – parte II: a pesca. *Hig Aliment*. 2009;23(174/175):99-104.
18. Baldini VLS. Aminas biogênicas e a deterioração do pescado. *Bol Ital*. 1982;19:389-402.
19. Contreras-Guzman A. Bioquímica do pescado e derivados. Jaboticabal: FUNESP; 1994.
20. Veciana-Nogués MT, Mariné-Font A, Vidal-Carou MC. Biogenic amines as hygienic quality indicators of tuna. Relationships with microbial counts, ATP- related compounds, volatile amines, and organoleptic changes. *J Agri Food Chem*. 1997;45:2036-41.
21. Fonseca MG, Silva RJ. Occurrence of Rondonia rondoni Travassos (Nematoda: Atractidae) in the pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holgerg (Osteichthyes: Characidae) celomatic cavity. Reunião Anual do Instituto Biológico; 2004; São Paulo.
22. Bogoslavsky B. Parasites of genus Anisakis: legal control in canned fish. *Infopesca Int*. 2009;37:18-23.
23. Pereira AD, Atui MB, Torres DMAGV, Mangini ACS, Zamboni CQ. Incidência de parasitos da família Anisakidae em bacalhau (*Gadus morhua*) comercializado no Estado de São Paulo. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2000;59(1/2):45-9.
24. Soares FMV, Vale SR, Junqueira RG, Glória BA. Teores de histamina e qualidade físico-química sensorial de filé de peixe congelado. *Ciênc Tecnol Aliment*. 1998;18(4):462-70.

25. Vieira RHSF. Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática. São Paulo: Varela; 2003.
26. Zanini MS, Martins JD, Torres A, Tobias FL. Avaliação microbiológica do gelo de balcão frigorífico de peixarias da grande Vitória-ES. *Hig Aliment*. 2001;15(80/81):122.
27. Huss. Garantia de qualidade dos produtos da pesca. (FAO Documento Técnico sobre pescas, 334). Roma: FAO; 1997.
28. Beirão LH, Teixeira E, Batista CRV, Santo MLE, Damian C, Meinert EM. Tecnologia pós-captura de pescado e derivados. In: Polli, CR et al. *Aquicultura: experiências brasileiras*. Florianópolis: UESC; 2004. p. 407-42.
29. Oetterer, M. Processamento de surimi – conhecimento das técnicas de obtenção e de controle da qualidade do produto para a introdução na indústria brasileira. Projeto Programa de Cooperação Internacional CNPq/JAICA. Brasília: CNPq; 1998.
30. Franco BDGM, Landgraf M. Microbiologia de alimentos. São Paulo: Atheneu; 2008.
31. Carvalho MRB. Composição e deterioração de pescados. *Semana de Ciência e Tecnologia Agropecuária*. 2000; Jaboticabal: Anais.
32. Vieira RHSF, Saker-Sampaio S. O emprego do gelo nos barcos de pesca. In: Vieira RHSF, editor. *Microbiologia, higiene e qualidade do pescado*. São Paulo: Varela; 2003. p. 37-43.
33. Germano PML, Oliveira JCF, Germano MIS. O pescado como causa de toxinfecções bacterianas. *Hig Aliment*. 1993;7:40-45.
34. Jay JM. Microbiologia de alimentos. 6. ed. Porto Alegre: Artmed; 2005.
35. Massaguer PR. Microbiologia dos processos alimentares. São Paulo: Varela; 2005.
36. Araújo JMA. Química de alimentos: teoria e prática. Viçosa: Imprensa Universitária da UFV; 1995.
37. Tavares M, Moreno RB. Pescado e derivados. In: Instituto Adolfo Lutz. *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*. 4. ed. Brasília: Anvisa; 2005. cap. 18, p. 633-43.
38. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 25, de 2 de junho de 2011: Anexo I: Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Controle de Pescado e seus Derivados. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 3 mar 2011. Seção I, p. 34-9.
39. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n. 185, de 13 de maio de 1997: Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Peixe Fresco (Inteiro e Eviscerado). *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 15 mai 1997. Seção I, n. 158. p. 102-8.
40. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto-Lei n. 30.691, de 29 de março de 1952. Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 1952.
41. Jesus RS, Lessi E, Tenuta-Filho A. Estabilidade química e microbiológica de “minced fish” de peixes amazônicos durante o congelamento. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2001;21(2):144-8.
42. Fontes MC, Esteves A, Caldeira F, Saraiva C, Vieira-Pinto M, Martins C. Estado de frescor e qualidade higiênica do pescado vendido numa cidade do interior de Portugal. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2007;59(5):1308-15.
43. Taha P. Microbiologia e deterioração do pescado exercido pela WEG – Penha Pescados S. A. Seminário sobre o controle de água na indústria do pescado; 1988; Santos: Anais Santos Leopoldianum. p. 210-6.
44. Howgate PA. Critical review of total volatile bases and trimethylamine as indices of freshness of fish. Part 2. Formation of the bases, and application in quality assurance. *EJEAFChe*. 2010;9(10):58-88.
45. Xavier FG, Righi D, Bernardi MM. Histamina, serotonina e seus antagonistas. In: Spinosa HS et al. *Farmacologia aplicada à medicina veterinária*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2007. p. 215-24.
46. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC n. 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, 10 jan 2001. Seção 1, n. 7-E. p. 45-53.
47. Marques CO, Seabre LMJ, Damasceno KSFSC. Qualidade microbiológica de produtos a base de sardinha (*Opisthonema oglium*). *Hig Aliment*. 2009;23(174/175):99-104.
48. Oetterer M. Industrialização do pescado cultivado. Guaíba: Agropecuária; 2002.
49. Rodas MAB, Tavares M, Marsiglia DAP. Avaliação das características sensoriais de alimentos sob o ângulo da legislação brasileira. *Bol Inst Adolfo Lutz*. 2004;14(1/2):5-7.
50. Prata LF. Higiene e inspeção de carnes, pescado e derivados. São Paulo: Unesp; 1999.
51. Germano PML, Oliveira, JCF, Germano, MIS. Aspectos da qualidade do pescado de relevância em saúde pública. *Hig Aliment*. 1998;12(53):30-7.
52. Bremner HAA. Convenient easy-touse system for estimating the quality of chilled seafoods. *Fish Proc Bull*. 1985;7:59-70.
53. Bremner HAA, Olley J, Vail AMA. Estimating time-temperature effects by a rapid systemic sensory method. In: Kramer DE, Liston J, organizadores. *Seafood Quality Determination*. Amsterdã: Elsevier Science; 1987. p. 413-35.
54. Martinsdottir E, Sveinsdottir K, Luten JB, Schelvis-Smit R, Hyldig G. Reference manual for the fish sector: sensory evaluation of fish freshness. QIM Eurofish. 1970 AB IJmuiden, Holanda, 2001.
55. Soares KMP. Desenvolvimento do método do índice de qualidade (MIQ) para avaliar o frescor da carapeba (*Eucinostomus gula*) armazenada em gelo [monografia]. Mossoró (RN): Universidade Federal Rural do Semi-Árido; 2010.
56. Huss. Quality and quality changes in fresh fish. Roma: FAO; 1995. (Fisheries Technical Paper, 348).
57. Sveinsdottir K, Martinsdottir E, Jorgensen B, Kristbergsson K. Application of quality index method (QIM) scheme in shelf-life study of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J Food Sci*. 2002;67(4):1570-9.
58. Bonilla AC, Sveinsdottir K, Martinsdottir E. Development of Quality Index (QIM) scheme for fresh cod (*Gadus morhua*) filets and application in shelf life study. *Food Control*. 2007;18:352-8.
59. Huidobro A, Pastor Tejada M. Quality index method developed for raw gilthead seabream (*Spaurus aurata*). *J Food Sci*. 2001;67(7):1202-5.

Regulamentação da comercialização de alimentos no ambiente escolar: análise dos dispositivos legais brasileiros que buscam a alimentação saudável

Regulation of food commercialization in school environment: analyses of the Brazilian legal instruments to promote healthy foods

RIALA6/1427

Cristine Garcia GABRIEL*, Gabriela Dalsasso RICARDO, Roberta Melchiorretto OSTERMANN, Arlete Catarina Tittoni CORSO, Maria Alice Altenburg de ASSIS, Patrícia Faria Di PIETRO, Francisco de Assis Guedes de VASCONCELOS

*Endereço para correspondência: Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina. Campus Universitário, Bairro Trindade. CEP 88040-970 Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. Telefones: (48) 3721-9784 e (48) 99091226. E-mail: cris_ntr@hotmail.com

Recebido: 11.07.2011 - Aceito para publicação: 08.02.2012

RESUMO

Este estudo investigou os dispositivos legais que regulamentam a comercialização de alimentos e bebidas em escolas do Brasil. Como critério para a busca, utilizou-se o levantamento em *sites* populares de busca eletrônica, incluindo dispositivos publicados no Brasil nos últimos dez anos (período de 2001 a 2010). Foram identificadas 19 regulamentações que dispõem sobre os itens a serem comercializados nas escolas brasileiras. Dentre essas, dez referem-se a regulamentos municipais; uma, aos municípios da região metropolitana da Grande São Paulo; uma, ao Distrito Federal; e sete versam sobre diferentes estados brasileiros. Todos os dispositivos relacionam itens com proibição de comercialização; 44% deles apresentam opções de alimentos permitidos e vedam a divulgação de propagandas dos alimentos proibidos no ambiente escolar; 50% referem à obrigatoriedade de divulgação de material informativo sobre alimentação e nutrição. Os dispositivos legais objetivam auxiliar a escola na formação de hábitos alimentares saudáveis e na prevenção da obesidade. Todavia, a eficácia dessas regulamentações precisa ser monitorada para que os objetivos propostos possam ser alcançados. Considerando-se a função pedagógica da alimentação escolar, são fundamentais ações bem estruturadas que promovam a adoção de práticas alimentares saudáveis.

Palavras-chave. serviços de alimentação, alimentação escolar, legislação de alimentos.

ABSTRACT

The legal instruments which regulate the commercialization of food and drink at Brazilian schools were investigated. The study was performed through popular electronic search engines, including legal instruments published in Brazil in the last ten years (from 2001 to 2010). Nineteen regulations were identified with lists of items to be sold at Brazilian schools. Ten of those refer to municipal regulations; one refers to the municipalities of the metropolitan area of Greater São Paulo; one to the Federal District; and seven to different Brazilian states. All legal instruments list items which cannot be sold; 44% of them list permitted food options and restrain any advertising on the prohibited food in the school environment; 50% refer to the mandatory inclusion of informational material about food and nutrition. The legal instruments aim to assist the school for encouraging healthy eating habits and for preventing obesity. Nevertheless, the efficiency of these regulations needs to be monitored so that the proposed objectives might be complied. Considering the pedagogical duty of school food, a well-planned action to promote the adoption of healthy eating habits is crucial.

Keywords. food service, school feeding, commercialized food, food legislation.

INTRODUÇÃO

Os locais que comercializam alimentos e bebidas na escola, como as cantinas escolares, têm sido reconhecidos como espaços fundamentais para a promoção da alimentação escolar saudável^{1,2}. A preocupação com a obesidade infantil e suas consequências incentivou, notoriamente a partir de 2001, a instituição de dispositivos legais para regulamentar os alimentos comercializados nas unidades escolares em diversos municípios e estados brasileiros^{3,4}.

A Coordenação Geral de Alimentação e Nutrição (CGAN), órgão do Ministério da Saúde responsável pela condução da Política de Alimentação e Nutrição (PNAN) no país, tem implementado ações prioritárias para favorecer a alimentação saudável nas escolas, dentre as quais se destaca a restrição à comercialização de alimentos e preparações com altos teores de gorduras saturada e trans, açúcar livre e sal⁵.

Visando auxiliar na promoção de hábitos alimentares no ambiente escolar, o Ministério da Saúde lançou em 2007 o material *Regulamentação da comercialização de alimentos em escolas do Brasil: experiências estaduais e municipais*, em que sintetiza as legislações e projetos de leis vigentes na época e aborda as dificuldades de implementação das normativas, apresentando algumas sugestões que podem ser adotadas em uma possível lei de abrangência nacional³.

Com o objetivo de verificar se a Lei de Regulamentação das Cantinas do Estado de Santa Catarina (Lei n. 12.061/2001)⁶ estava sendo cumprida, Gabriel et al.⁴ realizaram diagnóstico sobre o funcionamento de 156 cantinas em oito municípios polos do Estado e verificaram que 68% das cantinas não comercializavam salgadinhos fritos, refrigerantes, pipocas industrializadas, balas, pirulitos, gomas de mascar e salgadinhos industrializados. Os itens que apresentaram maior dificuldade de adequação à lei foram os sucos artificiais (comercializados por 67% dos estabelecimentos) e a comercialização diária de duas frutas (83% não comercializavam frutas). Muitas cantinas disponibilizavam itens considerados de baixo valor nutricional, como pizzas (73%), bolos/tortas (65%) e doces (48%)^{4,6}.

Tendo em vista a necessidade de diretrizes nacionais para orientar os proprietários de cantinas a adequarem a comercialização dos alimentos às legislações, o Ministério da Saúde lançou em 2010 o *Manual das cantinas escolares saudáveis: promovendo a*

alimentação saudável, em que aborda temas relacionados a saúde, alimentação saudável, rotulagem, higienização, importância da cantina para a saúde dos alunos e apresenta exemplos e receitas de lanches saudáveis⁷.

Apesar do efeito que a regulamentação do comércio de alimentos e bebidas nas escolas possa representar na qualidade da alimentação escolar, são limitados os estudos nacionais destinados a analisar a aplicação dessas regulamentações^{4,8,9}. Assim, este artigo tem como objetivo investigar dispositivos legais que regulamentam a comercialização de alimentos e bebidas em escolas no Brasil e que, por consequência, visam promover hábitos alimentares saudáveis no ambiente escolar.

MÉTODO

O presente estudo consistiu no levantamento de dispositivos legais publicados nos últimos dez anos (período de 2001 a 2010) que visam à regulamentação da comercialização dos alimentos e bebidas nas escolas brasileiras. Investigaram-se os dispositivos legais nacionais (leis, decretos, portarias e resoluções) relacionadas aos itens comercializados na escola por meio de bares, lanchonetes e cantinas comerciais.

Como critério para a busca, realizou-se levantamento em *sites* populares de busca eletrônica, destacando-se o *Google* (<http://www.google.com.br>) e *Cadê* (<http://br.cade.yahoo.com>). Os unitermos e frases utilizadas nestes *sites* foram: lei das cantinas, comércio de alimentos e bebidas em escolas e regulamentação do comércio de alimentos e bebidas nas escolas.

Para a análise crítica dos dispositivos legais, elaborou-se um roteiro baseado em procedimentos de revisão sistemática de literatura¹⁰, o qual possibilitou uma síntese dessas estratégias legais implantadas no território nacional de acordo com o local, o tipo de dispositivo, a descrição e a lista de alimentos proibidos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram encontrados dezenove dispositivos legais que regulamentam o comércio de alimentos e bebidas nas escolas do Brasil (Tabela 1).

Desses, 84% (n = 16) foram identificados como *leis*, ou seja, regras gerais e permanentes a que todos estão submetidos¹¹. Os demais se caracterizaram como *decreto* (n = 1), *portaria* (n = 1) e *resolução* (n = 1).

Tabela 1. Dispositivos legais brasileiros relacionadas aos alimentos e bebidas comercializados nas unidades educacionais segundo o local, o ano de publicação, a descrição do dispositivo e os alimentos proibidos, instituídos no período de 2001 a 2010.

Local / Dispositivos	Descrição do dispositivo legal	Alimentos proibidos
Município de Florianópolis – Santa Catarina Lei n. 5.853, de 4 de junho de 2001 ¹²	Dispõe sobre os critérios de concessão de serviços de lanches e bebidas nas unidades educacionais públicas e privadas que atendem a educação básica.	Bebidas alcoólicas; balas, pirulitos e gomas de mascar; refrigerantes e sucos artificiais; salgadinhos industrializados; salgados fritos; pipocas industrializadas.
Estado de Santa Catarina Lei n. 12.061, de 18 de dezembro de 2001 ⁶	Idem à Lei Municipal de Florianópolis, Santa Catarina.	Idem à Lei Municipal de Florianópolis, Santa Catarina.
Município do Rio de Janeiro – Rio de Janeiro Decreto n. 21.217, de 1º de abril de 2002 ¹⁸	Proíbe no âmbito das unidades escolares municipais de ensino adquirir, confeccionar, distribuir e consumir os produtos mencionados.	Balas, doces à base de goma, gomas de mascar, pirulito, caramelos, pó para preparo de refresco, bebidas alcoólicas, alimentos ricos em colesterol, sódio e corantes artificiais.
Município de Belo Horizonte – Minas Gerais Lei n. 8.650, de 25 de setembro de 2003 ²³	Dispõe sobre a proibição, em escola da rede pública municipal de ensino, de adquirir, confeccionar, distribuir e comercializar os produtos que menciona e dá outras providências.	Bala, caramelo, pirulito, doce à base de goma e goma de mascar; refresco em pó industrializado; refrigerante; produto manipulado na escola ou em ambiente não credenciado para preparo de alimentos; bebida alcoólica; alimento com mais de 3 g de gordura em 100 kcal e com mais de 160 mg de sódio em 100 kcal.
Estado do Paraná Lei n. 14.423, de 2 de junho de 2004 ¹³	Dispõe que os serviços de lanches nas unidades educacionais públicas e privadas que atendam a educação básica deverão obedecer a padrões de qualidade nutricional e de vida.	Idem à Lei Municipal e Estadual de Santa Catarina
Estado do Rio de Janeiro Lei n. 4.508, de 11 de janeiro de 2005 ¹⁹	Proíbe a comercialização, a aquisição, a confecção e a distribuição de produtos que colaborem para a obesidade infantil em bares, cantinas e similares instalados em escolas públicas e privadas.	Salgadinhos, balas, chocolates, doces à base de goma, goma de mascar, pirulito, caramelo, refresco em pó industrializado, refrigerantes, alimento manipulado na escola ou em ambiente não credenciado para confecção de preparação alimentícia, bebidas alcoólicas, alimentos com mais de 3 g de gordura em 100 kcal e com mais de 160 mg de sódio em 100 kcal do produto.
Região Metropolitana da Grande São Paulo Portaria Conjunta dos Coordenadores de Ensino, do Interior e o Diretor do Departamento de Suprimento Escolar, de 23 de março de 2005 ²⁰	Dispositivos para o funcionamento das cantinas escolares.	Comercialização de produtos prejudiciais à saúde e que não ofereçam condições nutricionais e higiênico-sanitárias, bem como aqueles que possam ocasionar obesidade e outros problemas de saúde causados por hábitos incorretos de alimentação – em especial bebida alcoólica, tabaco, medicamento ou produto químico-farmacêutico.
Município de Londrina – PR Lei n. 9.714, de 6 de abril de 2005 ¹⁴	Institui o Programa Londrinense de Nutrição e Saúde Estudantil, dispõe sobre as condições sanitárias dos alimentos consumidos e comercializados nas instituições de ensino localizadas no município de Londrina e dá outras providências.	Bebidas alcoólicas em qualquer graduação, cigarros e produtos que contenham tabaco ou nicotina.
Município de Santos – SP Lei n. 2.327, de 19 de julho de 2005 ²¹	Dispõe sobre o disciplinamento para a venda de lanches e bebidas nas cantinas dos estabelecimentos escolares no município de Santos e dá outras providências.	Bebidas alcoólicas; tabaco; medicamento ou produto químico-farmacêutico; refrigerantes e refrescos artificiais; balas, caramelos, gomas de mascar, pirulitos e assemelhados; preparações fritas em geral (batata frita, ovo frito, salgados fritos, sonho, etc.); biscoitos salgados tipo aperitivo e amendoim, salgado ou doce industrializados; bacon e linguiça; coberturas doces (caramelo, chocolate, morango, etc.) disponíveis para serem adicionadas aos lanches.

Local / Dispositivos	Descrição do dispositivo legal	Alimentos proibidos
Estado do Paraná Lei n. 14.855, de 19 de outubro de 2005 ¹⁵	Dispõe sobre padrões técnicos de qualidade nutricional a serem seguidos pelas lanchonetes e similares instaladas nas escolas de ensino fundamental e médio, particulares e da rede pública.	Balas, pirulitos e gomas de mascar; chocolates, doces à base de goma, caramelos; refrigerantes, sucos artificiais, refrescos em pó industrializado; salgadinhos industrializados, biscoitos recheados; salgados e doces fritos; pipocas industrializadas; alimentos com mais de 3 g de gordura em 100 kcal; alimentos com mais de 160 mg de sódio em 100 kcal do produto.
Distrito Federal Lei n. 3.695, de 8 de novembro de 2005 ²⁷	Dispõe sobre a promoção da alimentação saudável nas escolas de educação infantil, de ensino fundamental e médio das redes pública e privada.	Balas, pirulitos, gomas de mascar, biscoitos recheados; refrigerantes e sucos artificiais; salgadinhos industrializados; frituras; pipoca industrializada; bebidas alcoólicas; alimentos industrializados cujo percentual de calorias provenientes de gordura saturada ultrapasse 10% das calorias totais; alimentos com gordura vegetal hidrogenada.
Município de Natal – RN Lei n. 245, de 16 de agosto de 2006 ²⁸	Dispõe sobre padrões técnicos de qualidade nutricional a serem seguidos pelas lanchonetes e similares instaladas nas escolas de ensino fundamental e médio, particulares e da rede pública, e dá outras providências.	Salgadinhos, balas, chocolates, doces à base de goma, goma de mascar, pirulito, caramelo, refresco em pó industrializado, refrigerantes, alimento manipulado na escola ou em ambiente não credenciado para confecção de preparação alimentícia, bebidas alcoólicas, alimentos com mais de 3 g de gordura em 100 kcal, com mais de 160 mg de sódio em 100 kcal do produto.
Município de Porto Alegre – RS Lei n. 10.167, de 24 de janeiro de 2007 ¹⁶	Estabelece dispositivos para o controle da comercialização de produtos alimentícios e de bebidas nos bares e nas cantinas das escolas públicas e privadas e dá outras providências.	Bebidas alcoólicas; alimentos e bebidas que contenham nutrientes comprovadamente prejudiciais à saúde; e alimentos e produtos cujos componentes possam causar dependência física ou psíquica, ainda que por utilização indevida.
Estado do Rio Grande do Sul Lei n. 13.027, de 16 de agosto de 2008 ¹⁷	Dispõe sobre a comercialização de lanches e de bebidas em escolas no âmbito do Estado do Rio Grande do Sul e dá outras providências.	Bebidas com qualquer teor alcoólico; alimentos e bebidas que contenham, em sua composição química, nutrientes que sejam, comprovadamente, prejudiciais à saúde; alimentos e produtos cujos componentes possam causar dependência física ou psíquica, ainda que por utilização indevida.
Município de Itapetininga – SP Lei n. 5.320, de 15 de junho de 2009 ²²	Dispõe sobre a alimentação a ser oferecida nas unidades escolares públicas e privadas que atendam à educação infantil, ao ensino fundamental e ao ensino médio do município.	Bebidas alcoólicas; refrigerantes, isotônicos, energéticos, sucos artificiais ou adoçados; balas, pirulitos e goma de mascar; bolachas recheadas e biscoitos recheados; preparações fritas em geral (salgados, batata, ovo, sonho, etc.); alimentos que contenham comprovadamente substâncias prejudiciais à saúde.
Estado de Minas Gerais Lei n. 18.372, de 4 de setembro de 2009 ²⁴	Acrescenta dispositivo à Lei n. 15.072, de 5 de abril de 2004, que dispõe sobre a promoção da educação alimentar e nutricional nas escolas públicas e privadas do sistema estadual de ensino.	Produtos e preparações com altos teores de calorias, gordura saturada, gordura trans, açúcar livre e sal, ou com poucos nutrientes.
Município de Aracajú – SE Lei n. 3.814 de 14 de janeiro de 2010 ²⁹	Dispõe sobre a alimentação oferecida nas cantinas e lanchonetes localizadas nas instituições de ensino públicas e privadas dentro da circunscrição do município de Aracajú e dá outras providências.	Salgados de massas ou massas folheadas; frituras em geral; biscoitos recheados; salgados ou pipocas industrializadas; refrigerantes e sucos artificiais; doces de fabricação industrializada ou caseira; balas, pirulitos, gomas de mascar e similares; qualquer alimento de grande potencial calórico e/ou rico em gordura trans, bem como aqueles de baixo teor nutritivo.

Local / Dispositivos	Descrição do dispositivo legal	Alimentos proibidos
Estado de Minas Gerais Resolução n. 1.511, de 26 de fevereiro de 2010 ²⁵	Orienta a aplicação da Lei n. 18.372/2009 no âmbito das escolas do sistema estadual de ensino.	Frituras; salgados e doces com massa folhada; biscoitos; doces; molhos calóricos; bebidas artificiais; salgadinhos e pipocas industrializadas; alimentos apressentados e embutidos; sanduíches e pizzas que tragam em sua composição ingredientes como bacon, batata palha, maionese e molhos gordurosos e calóricos, mortadelas, ovos fritos, queijos gordurosos e outros alimentos embutidos ricos em gorduras e calorias.
Município de Juiz de Fora – MG Lei n. 12.121, de 17 de setembro de 2010 ²⁶	Dispõe sobre a comercialização de alimentos nas cantinas, lanchonetes ou similares dos estabelecimentos da rede particular e pública do Sistema Municipal de Ensino.	Produtos de preparações com altos teores de calorias, gorduras saturadas, gorduras trans, açúcar livre e sal, ou com poucos nutrientes, tais como: frituras; pães e salgados feitos com gorduras hidrogenadas; salgados com massas folhadas; biscoitos recheados; balas, pirulitos, gomas de mascar; ketchup, mostarda e maionese; bebidas artificiais e refrigerantes; salgadinhos e pipocas industrializadas; alimentos apressentados e embutidos; qualquer produto de alto teor calórico e de poucos nutrientes.

Dentre os dispositivos legais, 53% (n = 10) são de âmbito municipal, 37% (n = 7) estadual, 5% (n = 1) regional e 5% (n = 1) do Distrito Federal. Desta forma, observa-se maior predominância de dispositivos municipais (Tabela 1).

A primeira iniciativa de criação de legislação específica sobre comercialização de alimentos e bebidas nas escolas ocorreu no município de Florianópolis, capital do estado de Santa Catarina, a partir da Lei n. 5.853, de junho de 2001¹². Essa lei teve ampla divulgação na mídia nacional e, seis meses após sua criação, foi estendida para todo o estado de Santa Catarina, com a publicação da Lei n. 12.061. Com essa implantação, os proprietários de cantinas escolares ficaram obrigados a comercializar produtos considerados saudáveis, oferecer duas opções de frutas sazonais diariamente e fixar mural próximo ao estabelecimento contendo informações sobre alimentação e nutrição⁶.

Estratégias semelhantes foram identificadas em diferentes municípios e estados, do sul ao nordeste do Brasil. Além de Santa Catarina, foram encontrados dispositivos legais nos outros dois estados da região Sul.

No estado do Paraná, a Lei n. 14.423¹³ foi instituída em 2004, com texto idêntico ao da Lei Estadual de Santa Catarina⁶. Ambas as leis estaduais trazem uma listagem de itens proibidos, todavia não exemplificam os itens permitidos. Especificamente no município de Londrina (PR), a Lei n. 9.714, de abril de 2005, determina que as cantinas e lanchonetes escolares devem oferecer aos seus consumidores produtos *in natura*, como sucos,

saladas, ensopados e salgados assados¹⁴. Ainda no mesmo estado, um segundo dispositivo (Lei n. 14.855, de outubro de 2005) aumentou o rigor sobre as cantinas escolares do estado do Paraná, prevendo penalidades para o estabelecimento infrator, além de disponibilizar listagem de produtos permitidos¹⁵.

No Rio Grande do Sul, por sua vez, foram encontrados dispositivos legais para a capital¹⁶ e para o estado¹⁷. Na capital, a Lei n. 10.167, de janeiro de 2007, proíbe a exposição nas cantinas escolares de cartazes que estimulem a aquisição e o consumo de balas, chicletes, salgadinhos e refrigerantes. Essa lei também estabelece que nos critérios para o fornecimento de alimentos devem constar lanches e refeições equilibradas e balanceadas, com controle de açúcar, sal e gordura, priorizando frutas, verduras e cereais integrais¹⁶. Com abrangência estadual, a Lei n. 13.027¹⁷, de abril de 2008, reforça as recomendações da Lei n. 10.167/2007¹⁶. O art. 6º proíbe alimentos que contenham em sua composição química nutrientes que sejam comprovadamente prejudiciais à saúde, todavia não exemplifica quais seriam estes alimentos¹⁷.

No Sudeste, dispositivos legais foram localizados nos estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais, na Grande São Paulo e em alguns municípios específicos. Na cidade do Rio de Janeiro-RJ, o Decreto n. 21.217, de abril de 2002, proibiu a venda de guloseimas nas cantinas das escolas municipais, assim como vetou a divulgação de propagandas de quaisquer produtos citados como proibidos nas dependências das escolas¹⁸. Em 2005, a Lei n. 4.508 foi instituída no estado do Rio de Janeiro¹⁹,

mantendo as recomendações do Decreto Municipal n. 21.217/2002¹⁸ e focando na proibição de alimentos com corantes, conservantes e antioxidantes artificiais e de alimentos embalados sem rotulagem, composição nutricional e prazo de validade¹⁹.

Na Grande São Paulo, uma Portaria de março de 2005 dispõe sobre a proibição do comércio de produtos prejudiciais à saúde nas cantinas escolares, todavia também não exemplifica quais seriam os itens restritos²⁰. Em julho de 2005, a Lei Municipal n. 2.327, implantada em Santos-SP, dispõe que, além de garantir alimentos que favoreçam a promoção da saúde, os estabelecimentos devem realizar, no momento que antecede à implantação da legislação, campanha educativa dirigida aos alunos e suas famílias, visando a maior conscientização quanto à promoção de alimentação saudável na escola²¹.

No município de Itapetininga-SP, a Lei n. 5.320, de junho de 2009, além de regulamentar a venda de alimentos nas cantinas das escolas municipais, sugere preparações nutritivas e alimentos regionais para serem comercializados. Ainda, as escolas devem ficar responsáveis por observarem e atenderem às necessidades especiais dos alunos, tais como diabetes, intolerâncias e carências nutricionais²².

No estado de Minas Gerais, a capital Belo Horizonte instituiu em setembro de 2003 a Lei n. 8.650, que dispõe sobre a proibição do comércio de produtos considerados nocivos à saúde nas escolas municipais, vetando a divulgação de propagandas com os itens proibidos e estabelecendo critérios para multa e cassação dos estabelecimentos. O art. 3º dessa lei refere que o Poder Executivo deverá criar cartilhas para orientação alimentar à escola, ao aluno e aos pais dos alunos²³.

De alcance estadual, Minas Gerais instituiu, em setembro de 2009, a Lei n. 18.372²⁴. Em fevereiro de 2010, esse estado publicou a Resolução n. 1.511²⁵, que orienta a aplicação da Lei n. 18.372/2009²⁴. O art. 2º da Resolução n. 1.511/2010 veta a comercialização de produtos com alto teor de energia e pouco valor nutricional na escola, listando os produtos proibidos. Abre-se exceção para datas excepcionais de festas comemorativas²⁵.

No mesmo estado, o município de Juiz de Fora publicou a Lei n. 12.121, de setembro de 2010, que, além de vetar a venda de produtos e preparações com altos teores de gorduras e sal, regulamenta que os produtos comercializados nas escolas municipais devem conter rotulagem com valor nutricional e data de validade. Fica sob responsabilidade do proprietário também

a divulgação de materiais educativos utilizados em campanhas de nutrição e alimentação saudável, por meio de cartazes afixados em locais de destaque²⁶.

No Centro-Oeste do Brasil, a Lei n. 3.695, de novembro 2005, no Distrito Federal, além de definir os alimentos proibidos, indicava que as escolas deveriam adotar conteúdo pedagógico sobre alimentação²⁷. Desde 2003, a Universidade de Brasília realiza capacitações para proprietários de cantinas escolares no Distrito Federal por meio do projeto "A Escola Promovendo Hábitos Alimentares Saudáveis"². A Lei n. 3.695/2005 foi revogada em 2006, e após essa medida foi observada menor participação dos proprietários das cantinas no processo de implantação da cantina escolar saudável^{2,27}.

No Nordeste, foram identificados dois dispositivos legais. No município de Natal (Rio Grande do Norte), a Lei n. 245, de agosto de 2006, dispõe sobre padrões técnicos de qualidade nutricional para os itens comercializados, proibindo também a divulgação de propagandas desses²⁸. No município de Aracajú (Sergipe), a Lei n. 3.814 entrou em vigor em janeiro de 2010, vetando a comercialização de alimentos com alto valor calórico e com altos teores de gordura nas cantinas e responsabilizando as escolas a observarem as necessidades alimentares especiais dos alunos. Corroborando com outros dispositivos legais, esta lei também obriga os estabelecimentos comerciais a exporem no local de venda de alimentos placas ou cartazes explicando os benefícios da legislação²⁹.

A partir do exposto, observou-se maior quantidade de dispositivos legais na região Sudeste (47%; n = 9). A Pesquisa de Orçamento Familiar 2008-2009³⁰ constatou que 40% dos meninos e 38% das meninas entre 5 e 9 anos de idade apresentavam sobrepeso no Sudeste, o que indica a importância da efetivação de dispositivos legais na escola que orientem para uma alimentação saudável, tendo em vista a obrigatoriedade do ensino para crianças a partir dos 4 anos³¹.

Neste estudo, não foram encontrados dispositivos legais instituídos na região Norte. Ressalta-se, todavia, que a metodologia de busca adotada no presente estudo não garante a inclusão de todos os dispositivos existentes no país, uma vez que estes podem existir sem estar disponíveis nos *sites* de busca eletrônica. No território nacional, as regiões Sudeste e Sul destacaram-se com relação à instituição de dispositivos legais para regulamentar os alimentos comercializados nas escolas, corroborando levantamento prévio realizado pelo Ministério da Saúde³. No entanto, reforça-se que, para

se obter um panorama mais preciso dessa situação, há necessidade de estudos complementares, que utilizem também outras fontes de dados.

Entre os dispositivos legais analisados, 8 (44,4%) não permitem a divulgação de propagandas dos alimentos proibidos no ambiente escolar^{14,16-19,23,27,28}; 7 (38,8%) referem à obrigatoriedade da presença de frutas na cantina escolar^{6,14,15,17,20,22,29}; e 9 (50,0%) estabelecem a presença obrigatória de mural ou material de comunicação visual para divulgação de informações relacionadas a alimentação e nutrição^{6,12,13,17,20,22,26,27,29}.

Quanto à explicitação dos itens permitidos nos estabelecimentos, destaca-se que somente 4 dispositivos (22,2%) mostram uma lista de alimentos consentidos nas cantinas^{12,15,20,22}. Outros 3 (16,7%) referem que a cantina deve oferecer alimentos saudáveis, exemplificando alguns dos itens considerados adequados (como frutas, saladas e cereais integrais), porém não trazem uma lista com opções variadas^{14,16,17}. 3 (16,7%) trazem disposições mais amplas, referindo, por exemplo, que as cantinas estão proibidas de comercializar alimentos que contenham corantes, conservantes ou antioxidantes artificiais^{15,28} e que devem colocar à disposição dos alunos “apenas alimentos e bebidas que obedeçam a um padrão de qualidade adequado à promoção de uma alimentação saudável e que não possam ocasionar obesidade e outros problemas de saúde causados por hábitos incorretos de alimentação”²¹. Esse tipo de construção dificulta a identificação dos alimentos vetados e permitidos, tanto por parte dos proprietários dos estabelecimentos e da escola quanto por parte dos responsáveis pela fiscalização³.

Somente a partir de 2009, verificou-se a inclusão nos dispositivos legais de orientação para o atendimento a escolares com necessidades nutricionais especiais^{22,29}.

Especificamente sobre o mural educativo, considera-se importante uma reflexão mais ampla sobre a real finalidade do mesmo, que vai além da mera exigência legal de sua afixação próxima à cantina. Torna-se necessária a adequada formação e sensibilização dos profissionais envolvidos na cantina escolar, para que este instrumento educativo possa realmente se tornar um aliado no processo de promoção da alimentação saudável na escola.

Dentre os dispositivos analisados, a lei municipal de Natal é a única que determina que a cantina escolar seja administrada por pessoa devidamente capacitada em aspectos de alimentação e nutrição, e que esta capacitação deve ser reconhecida pelo poder público e realizada por

nutricionista²⁸. Reforçando a importância da temática, Schmitz et al.² apresentaram e avaliaram uma metodologia para capacitação de proprietários de cantinas escolares no Distrito Federal, visando à implantação dos “10 passos da cantina escolar saudável”. A avaliação geral dos 35 participantes do curso foi positiva, e, comparando-se os períodos antes e após a capacitação, foram observados resultados positivos nos estabelecimentos ($p < 0,05$). Destaca-se que ações de apoio, como capacitações para proprietários de cantinas, são fundamentais para garantir a viabilidade econômica dos estabelecimentos e a possibilidade desses transformarem-se em espaços de promoção da alimentação saudável.

Vale ressaltar as estratégias desenvolvidas pelo Ministério da Saúde no campo temático desta investigação, tal como a publicação em 2004 do material educativo denominado “Dez Passos para a Promoção da Alimentação Saudável nas Escolas”³², que considera não saudáveis os seguintes itens alimentares: balas; pirulitos; gomas de mascar; biscoitos, principalmente os recheados; refrigerantes; sucos artificiais ou adoçados; frituras; maionese; salgados com salsichas e presuntos/apresentados; salgadinhos de pacote e pipocas industrializadas. Observa-se, portanto, que os alimentos proibidos pela maioria dos dispositivos legais estão de acordo com os princípios citados nos “Dez Passos da Alimentação Saudável”³².

Destaca-se a emissão da Portaria Interministerial n. 1.010, de 8 de maio de 2006, pelos Ministros da Educação e da Saúde, que instituiu as diretrizes para a promoção da alimentação saudável nas escolas de educação infantil, ensino fundamental e médio das redes públicas e privadas em âmbito nacional³³. Ressalta-se ainda que o documento lançado pelo Ministério da Saúde em 2007 com a identificação de dez dispositivos legais brasileiros de regulamentação da alimentação no ambiente escolar³ tem como objetivo principal apoiar gestores, educadores e profissionais de saúde no desenvolvimento de ações que favoreçam a adoção de práticas alimentares saudáveis.

Para além dos importantes esforços já mencionados, sabe-se que a fiscalização dos dispositivos é fundamental para a efetiva implementação dos mesmos. A tendência tem sido delegar esta tarefa à Vigilância Sanitária, pela natureza do trabalho. Como qualquer processo de regulamentação, os mecanismos de controle devem ser claros, e, independentemente de quem for o responsável pela fiscalização, cabe alguma estratégia

de capacitação deste grupo, tanto em relação à lista de alimentos proibidos quanto aos demais artigos previstos³.

Reforça-se, ainda a necessidade de maior disseminação de dispositivos legais nos 26 estados, no Distrito Federal e nos 5.565 municípios brasileiros ou uma legislação de cunho nacional. Isso garantiria proteção principalmente para as regiões e municípios mais carentes, onde a população está amplamente exposta à dupla carga de morbidade nutricional, com a coexistência de desnutrição e obesidade. Concomitantemente, a fiscalização e a maior disseminação dos dispositivos, mecanismos para o monitoramento e a avaliação periódica das regulamentações precisam ser estruturados, contando com o envolvimento da sociedade e dos diversos setores que possuem interface com o ambiente escolar.

Visando a contribuir para a efetivação e a consolidação da Política Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional (SAN) no ambiente escolar, conforme estabelecido na Portaria Interministerial n. 1.010³³, e almejando potencializar o Programa Nacional de Alimentação Escolar (PNAE) nas escolas públicas e filantrópicas brasileiras, o Fundo Nacional de Desenvolvimento da Educação (FNDE) criou os Centros Colaboradores em Alimentação e Nutrição do Escolar (Cecane)³⁴, os quais formam uma rede interinstitucional que presta apoio técnico e operacional aos estados e municípios na implementação da alimentação saudável nas escolas.

Especificamente com relação ao PNAE, o mesmo merece destaque dentre as políticas públicas de SAN do Brasil, sendo considerado um dos maiores programas na área de alimentação escolar do mundo. Entre suas diretrizes estão: o emprego da alimentação saudável e adequada; a inclusão da educação alimentar e nutricional no processo de ensino e aprendizagem; e o apoio ao desenvolvimento sustentável. Ressalta-se a tendência na proibição de determinados itens na escola também pelo PNAE, uma vez que a Resolução n. 38/2009 do FNDE, atual normativa do programa, refere que a aquisição dos gêneros alimentícios com os recursos do governo federal é proibida para bebidas com baixo teor nutricional, tais como refrigerantes, refrescos artificiais e bebidas similares, sendo restrita para alguns alimentos, como os enlatados, os embutidos e os doces³⁵.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

É dever da família, da comunidade, da sociedade em geral e do poder público assegurar efetivação dos

direitos referentes à saúde e à alimentação de crianças e adolescentes, mediante a efetivação de políticas públicas que permitam o desenvolvimento saudável e harmonioso, em condições dignas de existência. Desta forma, torna-se incoerente pensar em instituições educativas que disponibilizem diariamente alimentos em desacordo com práticas promotoras de saúde.

Dispositivos legais podem estimular o envolvimento mais efetivo da comunidade escolar na implantação do ambiente saudável, uma vez que essas regulamentações trazem como meta prevenir os vários agravos à saúde relacionados com a alimentação inadequada, bem como incentivar hábitos alimentares saudáveis.

Louvadas as iniciativas das esferas estaduais e municipais, é necessário estabelecer normas gerais e diretrizes para desencadear um conjunto de ações que visem à educação nutricional e em saúde em âmbito nacional. A Portaria Interministerial n. 1.010³³ parece ser o primeiro passo para desenvolver ações nesse sentido. Entretanto, cabe às esferas estaduais e municipais a viabilização de projetos que propiciem a efetivação das mudanças almejadas.

Sabe-se que os dispositivos legais analisados são estratégias para qualificar a alimentação escolar. Por outro lado, reconhece-se que o problema da obesidade de crianças em idade escolar não será resolvido apenas com a proibição de alimentos calóricos nas escolas ou com a limitação de sua publicidade. A transformação consciente das práticas alimentares não é um processo imediato, exigindo tempo e dedicação. Para tal, faz-se necessária a ação conjunta de pais, professores, profissionais da saúde, gestores, legisladores e publicitários, entre outros, para promover ambientes e estratégias propícias à promoção de hábitos alimentares saudáveis e que incentivem também a prática de exercícios físicos entre os escolares.

A regulamentação da comercialização de alimentos e bebidas pelas cantinas escolares ainda é um processo em construção, devendo avançar com vistas à promoção do ambiente escolar saudável. Faz-se necessário promover a ampliação, o acompanhamento e a avaliação das iniciativas encontradas, procurando-se apontar os benefícios ou entraves das regulamentações em vigor.

Neste estudo, destaca-se que, para melhor compreensão da realidade brasileira, foram investigados somente os dispositivos legais nacionais em âmbito nacional, estadual e municipal sobre a comercialização

dos alimentos nas escolas. Assim, dentre as limitações aponta-se que não foram consideradas as legislações sobre a alimentação escolar gratuita, não se buscou a legislação internacional sobre a comercialização de alimentos nas escolas e a busca dos dispositivos legais restringiu-se a bases eletrônicas de dados. Nesse aspecto, vale ressaltar que o número de dispositivos legais identificados pode ter sido subestimado, uma vez que estes podem existir sem estar disponíveis nos *sites* de busca eletrônica. Sendo assim, para um mapeamento mais preciso, outros procedimentos metodológicos deverão ser realizados em estudos futuros, como, por exemplo, o contato direto com as instituições responsáveis pela promulgação dos dispositivos legais no universo de municípios (n = 5.565) e estados (n = 26) brasileiros.

REFERÊNCIAS

1. Kann L, Grunbaum J, McKenna ML, Wechsler H, Galuska DA. Competitive foods and beverages available for purchase in secondary schools – selected sites, United States, 2004. *J Sch Health*. 2005;75(10):370-4.
2. Schmitz BAS, Recine E, Cardoso GT, Silva JRM, Amorim NFA, Bernardon R, et al. A escola promovendo hábitos alimentares saudáveis: uma proposta metodológica de capacitação para educadores e donos de cantina escolar. *Cad Saúde Pública*. 2008;24:312-22.
3. Brasil. Ministério da Saúde, Departamento de Atenção Básica, Secretaria de Atenção Básica. Experiências estaduais e municipais de regulamentação da comercialização de alimentos em escolas no Brasil: identificação e sistematização do processo de construção e dispositivos legais adotados. Brasília: Ministério da Saúde; 2007.
4. Gabriel CG, Vasconcelos FA, Andrade DF, Schmitz BAS. First law regulating school canteens in Brazil: evaluation after seven years of implementation. *Arch Latinoam Nutr*. 2009;59(2):128-38.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Coordenação Geral de Alimentação e Nutrição (CGAN). Promoção da Alimentação Saudável. [acesso 2 abr 2011]. Disponível em: [http://nutricao.saude.gov.br/pas.php].
6. Santa Catarina. Lei n. 12.061, de 18 de dezembro de 2001. Dispõe sobre critérios de concessão de serviços de lanches e bebidas nas unidades educacionais, localizadas no Estado de Santa Catarina. *Diário Oficial do Estado*, 20 dez 2001.
7. Brasil. Ministério da Saúde. Departamento de Atenção Básica, Secretaria de Atenção Básica. Manual das cantinas escolares saudáveis: promovendo a alimentação saudável. Brasília: Ministério da Saúde; 2010.
8. Temple NJ, Steyn NP, Myburgh NG, Nel JH. Food items consumed by students attending schools in different socioeconomic areas in Cape Town, South Africa. *Nutrition*. 2006;22(3):252-8.
9. Gabriel CG, Santos MV, Vasconcelos FAG, Milanez GHG, Hulse SB. Cantinas escolares de Florianópolis: existência e produtos comercializados após a instituição da Lei de Regulamentação. *Rev Nutr*. 2010;23(2):191-9.
10. Moher D, Tetzlaff J, Tricco AC, Sampson M, Altman DG. Epidemiology and reporting characteristics of systematic reviews. *PLoS Med*. 2007;4(3):447-55.
11. Glossário Jurídico. [acesso 5 dez 2011]. Disponível em: [http://www.stf.jus.br/portal/glossario/verVerbete.asp?letra=A&id=184].
12. Santa Catarina. Lei n. 5.853, de 4 de junho de 2001. Dispõe sobre os critérios de concessão de serviços de lanches e bebidas nas unidades educacionais localizadas no Município de Florianópolis. *Diário Oficial do Município*, 5 jun 2001.
13. Paraná. Lei n. 14.423, de 2 de junho de 2004. Dispõe que os serviços de lanches nas unidades educacionais públicas e privadas que atendam a educação básica, localizadas no Estado, deverão obedecer a padrões de qualidade nutricional e de vida indispensáveis à saúde dos alunos. *Diário Oficial do Estado*, 3 jun 2004.
14. Londrina. Lei n. 9.714, de 6 de abril de 2005. Institui o Programa Londrinense de Nutrição e Saúde Estudantil, dispõe sobre as condições sanitárias dos alimentos consumidos e comercializados nas instituições de ensino localizadas no município de Londrina e dá outras providências. *Diário Oficial do Município*, 5 abr 2005.
15. Paraná. Lei n. 14.855, de 19 de outubro de 2005. Dispõe sobre padrões técnicos de qualidade nutricional a serem seguidos pelas lanchonetes e similares instaladas nas escolas de ensino fundamental e médio, particulares e da rede pública. *Diário Oficial do Estado*, 20 out 2005.
16. Porto Alegre. Lei n. 10.167, de 24 de janeiro de 2007. Estabelece, no Município de Porto Alegre, normas para o controle da comercialização de produtos alimentícios e de bebidas nos bares e nas cantinas das escolas públicas e privadas e dá outras providências. *Diário Oficial do Município*, 26 jan 2007.
17. Rio Grande do Sul. Lei n. 13.027, de 16 de agosto de 2008. Dispõe sobre a comercialização de lanches e de bebidas em escolas no âmbito do Estado do Rio Grande do Sul e dá outras providências. *Diário Oficial do Estado*, 16 ago 2008.
18. Rio de Janeiro. Decreto n. 21.217, de 1 de abril de 2002. Proíbe no âmbito das unidades escolares da rede municipal de ensino adquirir, confeccionar, distribuir e consumir os produtos que menciona. *Diário Oficial do Município*, 2 abr 2002.
19. Rio de Janeiro. Lei n. 4.508, de 11 de janeiro de 2005. Proíbe a comercialização, a aquisição, a confecção e a distribuição de produtos que colaborem para a obesidade infantil, em bares, cantinas e similares instalados em escolas públicas e privadas do Estado do Rio de Janeiro, na forma que menciona. *Diário Oficial do Estado*, 12 jan 2005.
20. São Paulo. Portaria Conjunta COGSP/CEI/DSE, de 23 de março de 2005. Normas para funcionamento de cantinas escolares. *Diário Oficial do Estado*, 24 mar 2005.
21. Santos. Lei n. 2.327, de 19 de julho de 2005. Dispõe sobre o disciplinamento para a venda de lanches e bebidas nas cantinas dos estabelecimentos escolares no município de Santos e dá outras providências. *Diário Oficial do Município*, 20 jul 2005.
22. Itapetininga. Lei n. 5.320, de 15 de junho de 2009. Dispõe sobre a alimentação a ser oferecida nas unidades escolares públicas e privadas que atendam à educação infantil, ao ensino fundamental e ao ensino médio do município. *Diário Oficial do Município*, 14 jun 2009.
23. Belo Horizonte. Lei n. 8.650, de 25 de setembro de 2003. Dispõe sobre a proibição, em escola da rede pública municipal de

- ensino, de adquirir, confeccionar, distribuir e comercializar os produtos que menciona e dá outras providências. Diário Oficial do Município, 26 set 2003.
24. Minas Gerais. Lei n. 18.372, de 26 de fevereiro de 2010. Dispõe sobre a promoção da educação alimentar e nutricional nas escolas públicas e privadas do sistema de ensino. Diário Oficial do Estado, 26 fev 2010.
 25. Minas Gerais. Resolução n. 1.511, de 26 de fevereiro de 2010. Orienta a aplicação da Lei n. 18.372/2009 no âmbito das escolas do sistema estadual de ensino. Secretaria de Estado de Educação, 26 fev 2010.
 26. Juiz de Fora. Lei n. 12.121, de 17 de setembro de 2010. Dispõe sobre a comercialização de alimentos nas cantinas, lanchonetes ou similares dos estabelecimentos da rede particular e pública do Sistema Municipal de Ensino. Diário Oficial do Município, 16 set 2010.
 27. Distrito Federal. Lei n. 3.695, de 8 de novembro de 2005. Dispõe sobre a promoção da alimentação saudável nas escolas da rede de ensino do Distrito Federal. Diário Oficial do Distrito Federal, 25 nov 2005.
 28. Natal. Lei n. 245, de 16 de agosto de 2006. Dispõe sobre padrões técnicos de qualidade nutricional a serem seguidos pelas lanchonetes e similares instaladas nas escolas de ensino fundamental e médio, particulares e da rede pública, e dá outras providências. Diário Oficial do Município, 16 ago 2006.
 29. Aracaju. Lei n. 3.814, de 14 de janeiro de 2010. Dispõe sobre a alimentação oferecida nas cantinas e lanchonetes localizadas nas instituições de ensino públicas e privadas dentro da circunscrição do município de Aracaju e dá outras providências. Diário Oficial do Município, 13 jan 2010.
 30. Brasil. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de Orçamento Familiar 2008-2009. [acesso 5 dez 2011]. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1699&id_pagina=1].
 31. Brasil. Emenda Constitucional n. 59, de 11 de novembro de 2009. [acesso 2 dez 2011]. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/constituicao/emendas/emc/emc59.htm].
 32. Brasil. Ministério da Saúde. Dez passos para uma alimentação saudável na escola. 2004. [acesso 15 abr 2011]. Disponível em: [<http://189.28.128.100/nutricao/docs/geral/dezPassosPasEscolas.pdf>].
 33. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria Interministerial n. 1.010, de 8 de maio de 2006. Institui as diretrizes para a promoção da alimentação saudável nas escolas de educação infantil, fundamental e nível médio das redes públicas e privadas, em âmbito nacional. Diário Oficial da União, 9 maio 2006.
 34. Rede Brasileira de Alimentação e Nutrição do Escolar. Centros Colaboradores. [acesso 15 abr 2011]. Disponível em: [http://www.rebrae.com.br/centros_colaboradores.html].
 35. Brasil. Ministério da Educação. Fundo Nacional de Desenvolvimento da Educação – FNDE. Resolução/CD/FNDE n. 38, de 16 de julho de 2009. Dispõe sobre o atendimento da alimentação escolar aos alunos da educação básica no Programa Nacional de Alimentação Escolar – PNAE. [acesso 12 dez 2011]. Disponível em: [<http://www.fnde.gov.br/index.php/leg-res-2009>].

Phenotypic profiles and detection of target genes by PCR in isolates from different sources and reference strains, identified as *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*)

Perfis fenotípicos e detecção de genes alvo por PCR em isolados de diferentes origens e cepas de referência identificados como *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*)

RIALA6/1428

Márcia Barbosa WARNKEN^{1*}, Marcelo Luiz Lima BRANDÃO¹, Aline Encarnação SOUZA¹, Célia Maria Carvalho Pereira Araulo ROMÃO¹, Ana Cristina Martins Almeida NOGUEIRA², Maria Teresa DESTRO³

Endereço para correspondência: ¹Departamento de Microbiologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), Fiocruz, Av. Brasil, 436, Manginhos, Rio de Janeiro, RJ, 21040-360. (21) 3865-5161/5151, ramal 5161. E-mail: marcia.warnken@incqs.fiocruz.br; mwarnken@terra.com.br

²Departamento de Imunologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS).

³Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

Recebido: 16.08.2011 - Aceito para publicação: 31.01.2012

ABSTRACT

Cronobacter, formerly known as *Enterobacter sakazakii*, is a novel genus of the *Enterobacteriaceae* family recognized as a cause of high number of fatal cases in neonates, after consuming infant formula. The conventional methods for detecting these organisms are time-consuming and lack sensitivity. The ISO/TS 22964:2006 is the most recently standardized methodology for detecting *Cronobacter* in powdered infant formula. This study aimed at confirming the Brazilian isolates previously identified as *E. sakazakii* as *Cronobacter* spp. by biochemical assays, and also to compare characteristics of 37 *Cronobacter* and non-*Cronobacter* isolates; and the miniaturized kits and the ISO/TS methodology were evaluated. A conventional PCR protocol targeting *dnaG* was also developed and a previously described *gluA* targeting protocol was used. The majority of the Brazilian isolates were not confirmed as *Cronobacter* spp., and the selective enrichment step of ISO/TS methodology was inhibitory to some *Cronobacter* strains. The ID 32E was the most reliable kit. The PCR protocol targeting *gluA* showed consistent results with ID 32E and the developed *dnaG* PCR protocol was 100% sensitive and specific. Thus, the PCR protocols targeting *gluA* and *dnaG* might be used to complement the *Cronobacter* spp. detection or identification after performing the conventional isolation and identification methods.

Keywords. *Cronobacter* spp., *Enterobacter sakazakii*, ISO/TS 22964:2006, PCR, phenotypic characterization

RESUMO

Cronobacter (*Enterobacter sakazakii*) é um novo gênero da família *Enterobacteriaceae*, reconhecido como responsável pelo elevado número de casos fatais em neonatos após consumo de fórmulas infantis. Os métodos convencionais de detecção desses micro-organismos são demorados e de sensibilidade inadequada. A ISO/TS 22964:2006 é a metodologia padronizada mais recentemente para detecção de *Cronobacter*. Este estudo teve como objetivo identificar como *Cronobacter* spp. os isolados brasileiros previamente classificados como *E. sakazakii*, comparar as características de 37 culturas de *Cronobacter* e não-*Cronobacter* e avaliar os kits miniaturizados e a ISO/TS 22964:2006. Foi também desenvolvido um protocolo convencional de PCR com alvo em *dnaG*. A maioria dos isolados brasileiros não foi confirmada como *Cronobacter* spp., e o enriquecimento seletivo da metodologia ISO foi inibitório para algumas cepas de *Cronobacter*. O kit ID 32E demonstrou desempenho mais confiável. O protocolo de PCR com alvo em *gluA* apresentou resultados consistentes com o ID 32E, e o protocolo com alvo em *dnaG* foi 100% sensível e específico. Portanto, os protocolos de PCR com alvo em *gluA* e *dnaG* podem ser usados para complementar a detecção e identificação de *Cronobacter* spp. após o emprego de métodos de isolamento e identificação convencionais.

Palavras-chave. *Cronobacter* spp., *Enterobacter sakazakii*, ISO/TS 22964:2006, PCR, caracterização fenotípica.

INTRODUCTION

Cronobacter is a novel genus of the *Enterobacteriaceae* family comprising six species and three subspecies^{1,2}. These microorganisms, formerly known as *Enterobacter sakazakii*, have been considered emerging food pathogens associated with meningitis, necrotizing enterocolitis and sepsis in neonates³. Case fatality rates vary from 40% to 80%, and survivors may suffer from severe neurological sequelae such as hydrocephalus, quadriplegia and retarded neural development⁴. In several of these cases, infection was linked to infant formula consumption^{4,5,6,7,8}. The source of reconstituted infant formula contamination may be intrinsic, arising from the manufacturing environment and/or addition of raw ingredients or extrinsic, via catheters, nipples or utensils used to reconstitute infant formula^{6,9,10}. There have been many reported cases of infection related to powdered infant formula (PIF) contaminated with *Cronobacter* spp.^{3,11}. Concern over this problem led to several voluntary recalls of PIF contaminated with *Cronobacter* spp. worldwide, resulting in a collective effort among manufacturers and government bodies to reduce health risks associated with the consumption of contaminated PIF^{3,12,13}.

The methods currently used for the detection and identification of *Cronobacter* spp. have been reported as inadequate and controversial¹⁴. The traditional methods^{15,16} for the detection of these organisms are time-consuming and labor-intensive, taking 5-7 days for a final result. Moreover, some culture media do not support the growth of all *Cronobacter* strains, and several commercial identification kits have been found unreliable¹⁷⁻²⁰. The sensitivity and the specificity of culture media and kits used for the detection and identification of *Cronobacter* are important features that directly affect the cost of production of PIF because they can reduce or increase the number of rejected batches during routine surveillance. In a public health context, culture media and commercial kits are important tools for the correct identification of the etiological agent of infection. Reliable methods are also important for monitoring food safety. To minimize the hazards due to the *Cronobacter* spp. contamination of PIF, the use of accurate, sensitive and specific detection and identification methods for these microorganisms is of utmost importance.

Development of molecular methods such as polymerase chain reaction (PCR) with different target genes have been described and provide powerful tools for rapid and specific detection and identification of

Cronobacter spp.²¹. The United States Food and Drug Administration (USFDA) has developed a new method for the detection of *Cronobacter* spp. in PIF. This method incorporates the chromogenic agars Brilliance Enterobacter Sakazakii Agar (Druggan-Forsythe-Iversen formulation) (DFI; Oxoid) and Enterobacter Sakazakii Plating Medium (ESPM; R&F Products Inc.) as well as the real-time PCR (qPCR) assay developed by Seo and Brackett²² targeting the *dnaG* from the macromolecular synthesis operon (MMS). This protocol successfully passed an AOAC pre-collaborative study and is in the process of further validation for the inclusion into the FDA's *Bacteriological Analytical Manual*²³. Although it is expected that laboratories from different countries will adopt this new protocol for PIF analysis, some laboratories may not have access to real-time PCR technology.

This study aimed at detecting the presence of *Cronobacter* spp. among Brazilian isolates previously identified as *E. sakazakii* by biochemical assays, comparing characteristics of 37 *Cronobacter* and non-*Cronobacter* isolates from different origins and evaluating the ISO/TS 22964:2006 methodology. This study also developed a conventional PCR protocol based on the pair of primers designed by Seo and Brackett²². This new protocol was evaluated for the identification of *Cronobacter* by including *Cronobacter* target as well as non-target strains and by comparison with the PCR protocol targeting *gluA*¹⁸.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains

A total of 37 strains were used in this study (Table 1 and 2). They were obtained from various sources and included isolates from clinical samples, PIF, PIF raw ingredient, PIF production environment, PIF handlers' hands and nipple, as well as reference strains of *Cronobacter* spp. and isolates previously identified as *E. sakazakii*/*Cronobacter* spp. from culture collections. Nineteen additional reference strains were used as negative controls in the PCR assays (Table 3). Stock cultures were maintained at -20 °C in brain heart infusion broth (BHI; Merck) containing 20% glycerol (Merck). Inocula for each experiment were prepared by transferring one loopful from the stock tube into 3 mL-fresh BHI broth and incubating at 35 °C for 24 hours, unless otherwise stated. For daily use, cultures were maintained at 4 °C on nutrient agar (Merck).

Table 1. Origin and phenotypic and molecular characterization of *Cronobacter* strains.

Supplying labs	Original code	Original identification	Source	Phenotypical behaviour					Detection by PCR of				Final identification	
				Conventional biochemical tests	API 20E (% match)	Vitek 32 (% match)	ID 32 (% match)	Biogroup	ZYM type ^a					
										gluA 1680 pb	V1/ V3 105 pb	dnaG 952 pb		78 pb
UCD ^b	CDC 1058-77	<i>C. malonaticus</i> (T) ^c	Clinical	<i>C. malonaticus</i>	<i>E. sakazakii</i> (51.1)/ <i>E. amnigenus</i> 1 (31.7)	<i>E. sakazakii</i> (61)/ <i>Kluyvera</i> sp. (22)	<i>E. sakazakii</i> (99.9)	9	1	+	+	+	+	<i>C. malonaticus</i>
UCD	3032	<i>C. turicensis</i> (T)	Clinical	<i>C. turicensis</i>	<i>E. sakazakii</i> (98.4)	<i>E. sakazakii</i> (98)	<i>E. sakazakii</i> (99.9)	16	2	+	+	+	+	<i>C. turicensis</i>
UCD	E 922	<i>C. sakazakii</i>	Clinical	<i>C. sakazakii</i>	<i>E. sakazakii</i> (51.1)/ <i>E. amnigenus</i> 1 (31.7)	<i>E. sakazakii</i> (98)	<i>E. sakazakii</i> (99.9)	2	3	+	+	+	+	<i>C. sakazakii</i>
UCD	E 785	<i>C. sakazakii</i>	Clinical	<i>C. sakazakii</i>	<i>E. sakazakii</i> (98.4)	<i>E. sakazakii</i> (98)	<i>E. sakazakii</i> (99.9)	1	4	+	+	+	+	<i>C. sakazakii</i>
UCD	CDC 996-77	<i>C. sakazakii</i>	Clinical	<i>C. sakazakii</i>	<i>E. sakazakii</i> (98.4)	<i>E. sakazakii</i> (98)	<i>E. sakazakii</i> (99.9)	3	5	+	+	+	+	<i>C. sakazakii</i>
UCD	CDC 3128-77	<i>C. sakazakii</i>	Clinical	<i>C. sakazakii</i>	<i>E. sakazakii</i> (51.1)/ <i>E. amnigenus</i> 1 (31.7)	<i>E. sakazakii</i> (97)	<i>E. sakazakii</i> (99.9)	11	6	+	+	+	+	<i>C. sakazakii</i>
UCD	HPB 2856	<i>C. sakazakii</i>	Clinical	<i>C. sakazakii</i>	<i>E. sakazakii</i> (98.4)	<i>E. sakazakii</i> (98)	<i>E. sakazakii</i> (99.9)	1	7	+	+	+	+	<i>C. sakazakii</i>
INCQS ^d	00597(ATCC ^c 29544)	<i>C. sakazakii</i> (T)	Clinical	<i>C. sakazakii</i>	<i>E. sakazakii</i> (98.4)	<i>E. sakazakii</i> (99)	<i>E. sakazakii</i> (99.9)	1	9	+	+	+	+	<i>C. sakazakii</i>
INCQS	00583(ATCC BAA 894)	<i>C. sakazakii</i>	Unknown	<i>C. sakazakii</i>	<i>E. sakazakii</i> (51.1)/ <i>E. amnigenus</i> 1 (31.7)	<i>E. sakazakii</i> (99)	<i>E. sakazakii</i> (99.9)	2	9	+	+	+	+	<i>C. sakazakii</i>
HCSC ^e	HPB 2871	<i>Cronobacter</i> spp.	Milk powder	<i>C. sakazakii</i>	<i>E. sakazakii</i> (98.4)	<i>E. sakazakii</i> (99)	<i>E. sakazakii</i> (99.9)	1	8	+	+	+	+	<i>C. sakazakii</i>
USP ^g	2 A	<i>Cronobacter</i> spp.	Milk powder	<i>C. malonaticus</i>	<i>E. sakazakii</i> (51.9)/ <i>E. amnigenus</i> 1 (30.8)/ <i>E. cloacae</i> (17)	<i>E. sakazakii</i> (96)	<i>E. sakazakii</i> (99.9)	9	9	+	+	+	+	<i>C. malonaticus</i>
USP	4 A	<i>Cronobacter</i> spp.	Milk powder	<i>C. sakazakii</i>	<i>E. sakazakii</i> (98.4)	<i>E. sakazakii</i> (99)	<i>E. sakazakii</i> (99.9)	1	9	+	+	+	+	<i>C. sakazakii</i>
HCSC	HPB 2875	<i>Cronobacter</i> spp.	Milk powder	<i>C. sakazakii</i>	<i>E. sakazakii</i> (51.9)/ <i>E. amnigenus</i> 1 (30.8)	<i>E. sakazakii</i> (98)	<i>E. sakazakii</i> (99.9)	2	9	+	+	+	+	<i>C. sakazakii</i>
HCSC	HPB 2876	<i>Cronobacter</i> spp.	Milk powder	<i>C. sakazakii</i>	<i>E. sakazakii</i> (51.9)/ <i>E. amnigenus</i> 1 (30.8)	<i>E. sakazakii</i> (98)	<i>E. sakazakii</i> (99.9)	2	9	+	+	+	+	<i>C. sakazakii</i>
UCD	E 782	<i>C. sakazakii</i>	Milk powder	<i>C. sakazakii</i>	<i>E. sakazakii</i> (98.4)	<i>E. sakazakii</i> (98)	<i>E. sakazakii</i> (99.9)	1	5	+	+	+	+	<i>C. sakazakii</i>
UCD	CFS 10	<i>C. sakazakii</i>	Raw ingredient	<i>C. sakazakii</i>	<i>E. sakazakii</i> (98.4)	<i>E. sakazakii</i> (99)	<i>E. sakazakii</i> (99.9)	8b	4	+	+	+	+	<i>C. sakazakii</i>
USP	3 A	<i>Cronobacter</i> spp.	Environmental	<i>C. sakazakii</i>	<i>E. sakazakii</i> (98.4)	<i>E. sakazakii</i> (99)	<i>E. sakazakii</i> (99.9)	1	9	+	+	+	+	<i>C. sakazakii</i>
UCD	CFS 237	<i>C. dublinensis</i> (T)	Environmental	<i>C. dublinensis</i>	<i>E. sakazakii</i> (99.9)	<i>P. agglomerans</i> (95)/ <i>E. sakazakii</i> (3)	<i>E. sakazakii</i> (99.9)	12	11	+	+	+	+	<i>C. dublinensis</i>
UCD	CFS 101	<i>C. sakazakii</i>	Environmental	<i>C. sakazakii</i>	<i>E. sakazakii</i> (51.1)/ <i>E. amnigenus</i> 1 (31.7)	<i>E. sakazakii</i> (74)/ <i>E. cloacae</i> (24)	<i>E. sakazakii</i> (99.9)	2	6	+	+	+	+	<i>C. sakazakii</i>
UCD	NCTC 9529	<i>C. gemonospecies</i> 1 (T)	Environmental	<i>C. gemonospecies</i> 1	<i>E. sakazakii</i> (98)	<i>E. sakazakii</i> (99)	<i>E. sakazakii</i> (99.9)	16c	12	+	+	+	+	<i>C. gemonospecies</i> 1

FUNED ^b	1390	<i>C. sakazakii</i>	Utensil (nipple)	<i>C. sakazakii</i>	<i>E. sakazakii</i> (98.4)	<i>E. sakazakii</i> (99)	<i>E. sakazakii</i> (99.9)	3	10	+	+	+	+	<i>C. sakazakii</i>
HCSC	HPB 2887	<i>Cronobacter</i> spp.	Unknown	<i>C. sakazakii</i>	<i>E. sakazakii</i> (98.4)	<i>E. sakazakii</i> (96)	<i>E. sakazakii</i> (99.9)	1	9	+	+	+	+	<i>C. sakazakii</i>
HCSC	HPB 2891	<i>Cronobacter</i> spp.	Unknown	<i>C. sakazakii</i>	Unacceptable profile	<i>E. sakazakii</i> (95)	<i>E. sakazakii</i> (99.9) (doubtful profile)	1	9	+	+	+	+	<i>C. sakazakii</i>
IOC ^c	IOC-PC	<i>Cronobacter</i> spp.	Unknown	<i>C. sakazakii</i>	<i>E. sakazakii</i> (98.4)/ <i>E. cloacae</i> (1.5)	<i>E. sakazakii</i> (99)/ <i>E. cloacae</i> (1)	<i>E. sakazakii</i> (99.9)	3	9	+	+	+	+	<i>C. sakazakii</i>
INCQS	00579(ATCC 51329)	<i>C. muytjensii</i>	Unknown	<i>C. muytjensii</i>	<i>E. sakazakii</i> (99.9)	<i>E. sakazakii</i> (99)	<i>E. sakazakii</i> (99.9)	15	10	+	+	+	+	<i>C. muytjensii</i>
INCQS	00115(ATCC 29044)	<i>C. sakazakii</i>	Unknown	<i>C. sakazakii</i>	<i>E. sakazakii</i> (97.3)	<i>E. sakazakii</i> (98)	<i>E. sakazakii</i> (99.9)	1	10	+	+	+	+	<i>C. sakazakii</i>
INCQS	00580(ATCC 12868)	<i>C. sakazakii</i>	Unknown	<i>C. sakazakii</i>	<i>E. sakazakii</i> (98.4)	<i>E. sakazakii</i> (98)	<i>E. sakazakii</i> (99.9)	1	9	+	+	+	+	<i>C. sakazakii</i>

^a - code of enzymatic profile in API ZYM; ^b - S. Fanning, Centre for Food Safety, University College Dublin, Belfield, Dublin 4, Ireland; ^c - type strain; ^d - Coleção de Culturas do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil; ^e - American Type Culture Collection; ^f - J. M. Farber, Bureau of Microbial Hazards, Health Canada, Ottawa, Canada; ^g - M. T. Destro, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Brazil; ^h - M. C. C. Silva, Laboratório Central de Saúde Pública, Minas Gerais, Brazil; ⁱ - M. D. Asensi, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil.

Table 2. Origin, phenotypic and molecular characterization of the Brazilian non-*Cronobacter* strains.

Supplying labs	Original code	Original identification	Source	Conventional biochemical tests	Phenotypical behavior			Detection by PCR of				Final identification
					API 20E (% match)	Vitek 32 (% match)	ID 32 (% match)	<i>gluA</i> 1680 pb	V1/V3 105 pb	<i>dnaG</i> 952 pb	78 pb	
UERJ ^a	A 1	<i>Cronobacter</i> spp.	Clinical	<i>E. cloacae</i>	<i>E. sakazakii</i> (51.1)/ <i>E. amnigenus</i> 1 (31.7)	<i>E. cloacae</i> (98)	<i>E. cloacae</i> (99.9)	-	-	-	-	<i>E. cloacae</i>
IOC ^b	D 2	<i>Cronobacter</i> spp.	Clinical	<i>E. cloacae</i>	<i>E. sakazakii</i> (99.9)	<i>E. cloacae</i> (97)/ <i>E. sakazakii</i> (2)	<i>E. cloacae</i> (99.9)	-	-	-	-	<i>E. cloacae</i>
IOC	501 M	<i>Cronobacter</i> spp.	Clinical	<i>E. cloacae</i>	<i>E. sakazakii</i> (98.4)	<i>E. cloacae</i> (97)/ <i>E. sakazakii</i> (2)	<i>E. cloacae</i> (99.9)	-	-	-	-	<i>E. cloacae</i>
IOC	8 F	<i>Cronobacter</i> spp.	Clinical	NC ^c	<i>Bordetella</i> / <i>Alcaligenes</i> / <i>Moraxella</i> spp.	<i>Acinetobacter lwoffii/junii</i> (99)	NC	-	-	-	-	NC
IOC	57 L	<i>Cronobacter</i> spp.	Clinical	<i>Enterobacter</i> spp.	<i>E. sakazakii</i> (86.6)/ <i>E. gergoviae</i> (11)	<i>E. cloacae</i> (70)/ <i>E. sakazakii</i> (15)	<i>E. gergoviae</i> (99.9)	-	-	-	-	<i>Enterobacter</i> spp.
UERJ	M 1	<i>Cronobacter</i> spp.	PIF ^d handler's hand	<i>Enterobacter</i> spp.	<i>Enterobacter asburiae</i> (82.3)	<i>E. cloacae</i> (98)	<i>E. asburiae</i> (99.9)	-	-	-	-	<i>Enterobacter</i> spp.
UERJ	M 3	<i>Cronobacter</i> spp.	PIF handler's hand	<i>E. cloacae</i>	<i>E. cloacae</i> (90.9)	<i>E. cloacae</i> (99)	<i>E. cloacae</i> (54.4)/ <i>E. asburiae</i> (45.4)	-	-	-	-	<i>E. cloacae</i>
UERJ	M 12	<i>Cronobacter</i> spp.	PIF handler's hand	<i>Enterobacter</i> spp.	<i>Enterobacter asburiae</i> (82.3)	<i>E. cloacae</i> (98)	<i>E. asburiae</i> (99.9)	-	-	-	-	<i>Enterobacter</i> spp.
USP ^e	5 A	<i>Cronobacter</i> spp.	Environmental	<i>E. cloacae</i>	<i>E. cloacae</i> (95)/ <i>E. sakazakii</i> (3)	<i>E. cloacae</i> (94)	<i>E. cloacae</i> (60.2)	-	-	-	-	<i>E. cloacae</i>
USP	N 1	<i>Cronobacter</i> spp.	Environmental	<i>E. helveticus</i>	<i>Escherichia vulneris</i> (66.2)/ <i>Buttiauxella agrestis</i> (44.2)/ <i>Pantoea</i> spp. (6.3)	<i>E. cancerogenus</i> (88)/ <i>P. agglomerans</i> (4)	<i>Escherichia vulneris</i> (66.2)/ <i>Buttiauxella agrestis</i> (44.2)/	-	-	-	-	<i>E. helveticus</i>

^a - A. C. F. Almeida & M. L. P. Queiroz, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brazil; ^b - M. D. Asensi, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil; ^c - Not Classified; ^d - Powdered Infant Formula; ^e - M. T. Destro, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de Sao Paulo, Brazil.

Table 3. Reference strains used as negative controls in PCR assays.

INCQSa Code	Original code	Microorganism
00073	ATCCb 8090	<i>Citrobacter freundii</i>
00145	ATCC 13048	<i>Enterobacter aerogenes</i>
00146	ATCC 23355	<i>Enterobacter cloacae</i>
00074	ATCC 13047	<i>Enterobacter cloacae</i>
00586	CDCc 6453	<i>Enterobacter gergoviae</i>
00310	ATCC 11775	<i>Escherichia coli</i>
00033	ATCC 25922	<i>Escherichia coli</i>
00507	CTCd 0182/CIP 79.32	<i>Klebsiella oxytoca</i>
00083	ATCC 4352	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
00147	ATCC 13883	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>subsp. pneumoniae</i>
00201	ATCC 14029	<i>Plesiomonas shigelloides</i>
00332	ATCC 29906	<i>Proteus mirabilis</i>
00106	ATCC 13315	<i>Proteus vulgaris</i>
00323	ATCC 29944	<i>Providencia rettgeri</i>
00113	ATCC 15175	<i>Pseudomonas putida</i>
00028	ATCC 10708	<i>Salmonella Choleraesuis</i>
00258	ATCC 13076	<i>Salmonella Enteritidis</i>
00150	ATCC 14028	<i>Salmonella Typhimurium</i>
00100	ATCC 13880	<i>Serratia marcescens</i>

^a - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; ^b - American Type Culture Collection; ^c - Center for Disease Control and Prevention; ^d - Coleção de Culturas Tropical.

Identification of *Cronobacter* spp. by PCR target genes detection

The study was first conducted using two groups of organisms, one identified as *Cronobacter* spp. (*E. sakazakii*) plus *Cronobacter* reference strains (Table 1); the other group was used as negative controls (Table 2).

The PCR protocols used were that from Hassan et al.²⁴ targeting the V1/V3 hypervariable region of the 16S rRNA gene and those from Lehner et al.²⁵ and Iversen et al.¹⁸ targeting *gluA*. It was also tested a conventional PCR method developed by this study using the qPCR primers designed by Seo and Brackett²² targeting *dnaG*. For this new protocol, DNA extraction was performed according to Kothary et al.²⁶ with modifications. Briefly, a single colony from a Tryptone Soy Agar (TSA; Difco) plate was transferred to 5 mL BHI broth and incubated at 37 °C on a shaker (150 rpm; Orbit-Shaker/Lab-Line) to obtain approximately 6 x 10⁸ CFU/mL (as previously determined by optical density experiments). From each culture, 2 mL-aliquots were centrifuged at 6,000 x g for 10 minutes, and pellets were re-suspended in 500 µL of sterile distilled water and heated at 100 °C for 15 minutes in a heating block (Dri-bath type 17600, Barnstead/Thermolyne). The aliquots were immediately

cooled and stored at -20 °C for further use. The PCR reactions (Invitrogen reagents) were carried out in a total volume of 50 µL containing 3 µL of DNA template, 1 x *Taq* polymerase buffer, 2.0 mM MgCl₂, 100 µM of each dNTP, 5 pmol of each primer and 2 U *Taq* polymerase. Reactions were carried out in a Peltier Thermal Cycler (MJ Research) using an initial denaturation step at 94 °C for 2 minutes, followed by 30 cycles of 94 °C for 30 seconds, 60 °C for 30 second, 72 °C for 30 second and a final elongation step at 72 °C for 4 minutes. PCR products were applied to a 2% TAE (wt/vol) agarose (Sigma) gel, and electrophoresis was carried out (PowerPacBasic/BioRad) at 80 V. After ethidium bromide staining, images were digitized with the Video Documentation System (Pharmacia Biotech) and analyzed with ImageMaster software (Amersham Pharmacia Biotech). All of the experiments were performed in duplicate and repeated on separate days.

Evaluation of *Cronobacter* spp. behavior using the ISO/TS 22964:2006 methodology

All 37 cultures were grown in 10 mL-buffered peptone water (BPW; Merck) at 37 °C for 18 hours, and an aliquot of 0.1 mL from each culture was inoculated into modified Lauryl Sulfate Tryptose broth with vancomycin (mLST/v)¹⁶ and incubated at 44 °C for 24 hours according to the ISO protocol. After incubation, the cultures were streaked onto Enterobacter Sakazakii Isolation Agar (ESIA; AES Chemunex), the chromogenic agar described in the current ISO technical specification for detection of *E. sakazakii*. Similarly, the cultures were also applied to Brilliance Enterobacter Sakazakii Agar (Druggan-Forsythe-Iversen formulation) (DFI; Oxoid) and Enterobacter Sakazakii Plating Medium (ESPM; R&F Products Inc.). The strains that showed no turbidity on mLST/v were streaked onto the surface of the solid media by a loopfull of growth from BPW. ESIA plates were incubated at 44 °C for 24 hours, and DFI and ESPM were incubated at 35 °C for 24 hours. Typical and atypical colonies from ESPM were streaked on Enterobacter Sakazakii Screening Medium (ESSM; R&F Products Inc.) to test for acid production from melibiose and sucrose. ESSM plates were incubated at 35 °C and observed after 6 and 24 hours. Tests for yellow pigment production were performed by streaking a loopful of the cultures onto Tryptone Soy Agar (TSA; Difco) plates. After incubation at 25 °C for 48 hours, plates were maintained at 25 °C under illumination for additional 72 hours.

Phenotypic tests

Phenotypic characterization was conducted according to Farmer et al.²⁷ and Iversen et al.²⁸. The biochemical tests performed were: motility at 37 °C, acid production from carbohydrate (D-sucrose, D-melibiose, D-raffinose, D-sorbitol, L-rhamnose, D-cellobiose, adonitol, myo-inositol, dulcitol and methyl- α -D-glucopyranoside), gas production from glucose and methyl- α -D-glucopyranoside, utilization of citrate as a sole carbon source, malonate utilization, MR-VP test, indole production and nitrate reduction. Presumptive *Cronobacter* speciation of strains received as *E. sakazakii* was conducted through the identification of corresponding biogroups, according to Iversen et al.¹. The miniaturized kits API 20E, API ZYM, ID 32E and the Vitek 32 system (bioMérieux) were also used according to the manufacturer's instructions.

Evaluation of sensitivity and specificity of the identification systems

The sensitivity and the specificity of the identification systems were determined by comparing results with the *gluA* PCR results¹⁸, which were considered in this study as a gold standard for *Cronobacter* spp. identification. Sensitivity and specificity were calculated according to Greenhalgh²⁹. Since *Cronobacter* and *E. sakazakii* are contaxic, the new nomenclature (*Cronobacter*) was used when comparing the results.

RESULTS

Identification of *Cronobacter* spp. by PCR target genes detection

Among the 37 cultures from the first group (Tables 1 and 2), 27 produced the expected fragment of 78 bp that is characteristic for *Cronobacter* spp.²² when the PCR protocol developed by this study was used (Table 1). However, along with the negative control strains, strains A1, D2, 501M, 8F, 57L, M1, M3, M12 5A and N1 (isolated in Brazil and sent to our laboratory after being biochemically identified as *E. sakazakii*) did not produce the expected amplicon (Table 2). Similar results were obtained for *gluA* using both pairs of primers^{18,25} and for the V1/V3 hypervariable region of the 16S rRNA gene²⁴, indicating consistency between the reference methods and the protocol proposed in this study.

The sensitivity and the specificity of the proposed protocol were 100% (Table 4). The same values were

observed for the protocol of Hassan et al.²⁴; however, this protocol showed repeatability problems in our hands (data not shown).

Cronobacter behaviour using ISO/TS 22964:2006 methodology

ISO/TS 22964:2006¹⁶ is the technical specification for the detection of *Cronobacter* spp. in milk powder, PIF and environmental samples collected from milk powder or infant formula plants. This method was published before the reclassification of *E. sakazakii* as *Cronobacter* spp. and is currently in use by several researchers and companies across the globe. In this study, test and reference strains of *Cronobacter* spp. were inoculated in mLST/v broth, and the ISO protocol was followed. Surface plating was performed on ESIA, DFI and ESPM agars; these media all exploit the α -glucosidase activity of *Cronobacter* spp. Typical and atypical colonies from ESPM were tested for acid production from melibiose and sucrose on the surface of ESSM, according to Restaino et al.³⁰. *Cronobacter* cultures are expected to give positive results for both carbohydrates.

In this study, all but two *Cronobacter* strains were able to grow well in the selective enrichment broth mLST/v (Table 4). Strains HPB 2856 and NCTC 9529 showed a very weak and almost imperceptible growth. Some non-*Cronobacter* strains were also able to grow in the selective enrichment broth, but only strain N1 (*Enterobacter helveticus*) produced characteristic colonies on the three chromogenic agars tested (Table 4). However, this isolate did not produce acid from sucrose on the ESSM medium. All *Cronobacter* spp. isolates and reference strains presented typical colonies (blue-black colonies with or without a clear halo) after a 24-hour incubation at 35 °C on ESPM medium, although the type strain of *Cronobacter* genomospecies 1 (NCTC 9529) showed poor growth with few small, blue-grey colonies with clear halos (data not shown). In this study, the 6-hour incubation period proposed by Restaino et al.³⁰ was not sufficient to detect the production of acid from melibiose on ESSM medium by six *Cronobacter* spp. strains (*C. sakazakii* ATCC 29544, ATCC 29004, CFS 10, HPB 2856, *C. turicensis* 3032 and *C. dublinensis* CFS 237), and the acid production from sucrose by five other isolates (*C. sakazakii* 4A, HPB 2887, ATCC 12868, IOC-PC and *C. malonaticus* CDC 1058-77) was very weak. This result can generate misidentification of an isolate. After additional 18 hours of incubation, all isolates

Table 4. Sensitivity and specificity of modified Lauryl Sulfate Tryptose broth/vancomycin (mLST/v), yellow pigment production on Tryptone Soy Agar (TSA), isolation culture media, phenotypic and molecular assays

Species	Growth in mLST/v ^a	Culture media				Production of yellow pigment on TSA ^b	Phenotypic assays				Molecular assays		
		DFI	ESIA	ESPM	ESSM		Conventional biochemical tests	API 20E	VITEK 32	ID 32E	gluA PCR	dnaG PCR	V1/V3 PCR
All <i>Cronobacter</i> spp. (positive results/ tested strains)	25/27	27/27	27/27	27/27	26/27	26/27	27/27	27/27	26/27	27/27	27/27	27/27	27/27
Other <i>Enterobacteriaceae</i> (positive results/ tested strains)	6/10	1/10	1/10	1/10	NA ^c	8/10	0/10	4/10	0/10	0/10	0/28	0/28	0/28
Non- <i>Enterobacteriaceae</i> strains (positive results/ tested strains)	NT ^d	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	0/1	0/1	0/1
Sensitivity (%)	93.1	100	100	100	96.4	96.4	100	100	96.4	100	100	100	100
Specificity (%)	62.5	90.9	90.9	90.9	NA	55.6	100	71.4	100	100	100	100	100

a - modified Lauryl Sulfate Tryptose broth/vancomycin (mLST/v); b - Tryptone Soy Agar; c - Not Applicable; d - Not Tested.

showed positive results for melibiose in this medium. The strain *C. sakazakii* HPB 2891 showed a negative result for acid production from sucrose even after the additional 18-hour incubation period (Table 4).

The isolation media used in this study, DFI, ESIA and ESPM, were 100% sensitive (Table 4), while ESSM was 96.4% sensitive. The specificities of the DFI, ESIA and ESPM agars were all 90.9% (Table 4).

Production of yellow pigment was detected in all but one strain of *Cronobacter* spp. (*C. sakazakii* CDC 996-77), which developed a cream-coloured colony (Table 4). All the non-*Cronobacter* isolates, with the exception of isolates 57L and 5A, showed yellow-pigmented colonies on TSA (Table 4), indicating the low specificity of this test.

Phenotypic characterization

All the isolates and reference strains were phenotypically assessed using conventional biochemical assays recommended by the ISO methodology and the commercial kits API 20E, ID 32E and the Vitek 32 system. The identification schemes proposed by Farmer et al.²⁷ and Iversen et al.²⁸ were also applied to the isolates, which were characterized into biogroups (Tables 1 and 2). Presumptive *Cronobacter* speciation was determined by correlating biogroups with species, according to Iversen et al.¹. The results given by the commercial tests (API 20E, Vitek 32 system and ID 32E) are presented using the former taxonomy (*E. sakazakii*) because the database for these kits had not been updated when this paper was prepared.

Using ID 32E, all *Cronobacter* strains were identified as *E. sakazakii* with percentage matches of 99.9% (Table 1), although strain HPB 2891 was designated as “doubtful profile”. The Vitek 32 system confirmed the

identity of all *Cronobacter* cultures except for the type strain *C. dublinensis* (CFS 237), which was misidentified as *Pantoea agglomerans*, with a percentage match of 95% and with only a 3% likelihood of being *E. sakazakii*. Most of the *Cronobacter* strains were correctly identified by the Vitek system, with values above 95%, except for the type strain of *C. malonaticus* (CDC 1058-77) and the *C. sakazakii* strain CFS 101, which showed percentage matches of 61% and 74% respectively (Table 1).

The results obtained with API 20E were, in some instances, in disagreement with the results of the conventional biochemical assays and with those of the other commercial kits. Strain HPB 2891 was considered by this kit’s database as an “unacceptable profile”. Two strains of *C. malonaticus* (type strain CDC 1058-77 and 2A) and six cultures of *C. sakazakii* (E922, CDC 3128-77, HPB 2875, HPB 2876, CFS 101 and ATCC BAA 894) presented very low percentage matches (51.1%) for *E. sakazakii* (Table 1). In addition, API 20E identified four non-*Cronobacter* strains (A1, D2, 501M e 57L) as *E. sakazakii*, most of them with high percentage values (Table 2).

Those strains confirmed as *Cronobacter* were subjected to enzymatic activity evaluation using the API ZYM (bioMérieux) kit. Twelve different enzymatic profiles were observed, and they were designated as “ZYM-types” 1 through 12 (Table 1). All strains showed α-glucosidase activity, characteristic for the genus. ZYM type 9 was the most prevalent, with 11 isolates (ten *C. sakazakii* and one *C. malonaticus*) showing this enzymatic profile. *C. turicensis* 3032, *C. dublinensis* CFS 237 and *C. genomospecies* 1 NCTC 9529 were the only strains classified as ZYM types 2, 11 and 12 respectively. *C. malonaticus* type strain (CDC 1058-77) was classified as the unique ZYM type 1 strain (Table 1), while the

other *C. malonaticus* strain (2A) was designated as ZYM type 9, similar to most of the strains evaluated in this study. *C. sakazakii* strains E922, HPB 2856 and HPB 2871 also presented unique profiles, designated as ZYM types 3, 7 and 8, respectively. The strain ATCC 51329 (*C. muytjensii*) showed the same enzymatic profile as two *C. sakazakii* strains (ATCC 29004 and isolate 1390).

The specificity and the sensitivity of the conventional biochemical assays and ID 32E were 100% (Table 4). The API 20E kit, frequently used by researchers and by food quality control/assurance laboratories for the identification of microorganisms present in PIF, showed 100% sensitivity but 71.4% specificity. On the other hand, the Vitek 32 system showed 100% specificity and 96.4% sensitivity (Table 4).

DISCUSSION

Cronobacter is a microbiological hazard associated with infant formula consumption and recognized as a cause of high case morbidity and mortality in neonates. The conventional methods for the detection of *Cronobacter* spp. are time-consuming and labor-intensive. There has also been a lack of consistency between results obtained with different detection and identification methods^{14,24}. Despite all of the disadvantages, these conventional methods have been widely used for the detection of this genus in PIF at many countries' entry-exit inspection ports and quarantine bureaus³¹.

This study used 37 strains, comprising isolates previously identified as *E. sakazakii*/*Cronobacter* spp. plus reference strains of *Cronobacter* to compare the results of the molecular assays (PCR detection of *dnaG*, *gluA* and V1/V3 hypervariable region of the 16S rRNA gene region) to phenotypic profiles obtained by ISO methodology, conventional biochemical assays and miniaturized kits (API 20E, ID 32E, the Vitek system and API ZYM).

During the PCR assays, 19 reference strains (Table 3) of species commonly misidentified as *Cronobacter* spp. (negative controls) were included to evaluate a conventional PCR protocol for *dnaG* gene detection using the primers designed by Seo and Brackett²². The original protocol has been used by several authors with consistent results^{18,19, 23,32-34}.

The proposed PCR protocol (*dnaG*) and the other PCR protocols (*gluA* and V1/V3) identified 27 cultures as *Cronobacter* spp. (Table 1), and these genes were not

detected in the strains used as negative controls. Results obtained using the new method, targeting *dnaG*, showed equivalence to the protocol targeting *gluA* (Tables 1, 2 and 4). The results indicated that this protocol was 100% sensitive and specific. The *gluA* protocol was chosen as the gold standard for this study because it was considered 100% sensitive and specific by Iversen et al.¹⁸.

Most of the strains isolated in Brazil were not confirmed as *Cronobacter* when the PCR protocols were used. According to the biochemical identification, they were classified among species commonly misidentified as *Cronobacter* (Table 2). One of these strains (8F) showed very low metabolic activity and could not be classified. Another strain (N1) was identified as a member of the recently described species *E. helveticus*³⁵. This species can be found in the same ecological niches as *Cronobacter*, such as dried food products and factory environments, and it yields presumptively positive colonies on chromogenic agars designed for *Cronobacter* detection. These results show that molecular methods are faster and more reliable than some phenotypic assays for *Cronobacter* identification.

In this essay, it was verified that the selective enrichment step of the ISO/TS 22964:2006 method can be inhibitory to some *Cronobacter* strains (*C. sakazakii* HPB 2856 and *C. genomospecies* I type strain NCTC 9529) (Table 4). Limitations of the mLST/v enrichment broth have been reported elsewhere^{17,36-38}. Further tests using regular LST formulation with and without vancomycin followed by incubation at 35 °C and 44 °C indicated that the inhibitory factor was the 44 °C temperature (data not shown). However, it is interesting to note that these strains were able to grow on ESIA at 44 °C. Thus, it may be a synergistic effect between the 44 °C temperature and the selective agent (sodium lauryl sulphate) in the culture medium. Proposals of new methodologies for *Cronobacter* spp. detection must consider the possible inhibitory effect of this temperature.

The chromogenic agars tested (ESIA, DFI and ESPM) showed equivalent performances, detecting all the *Cronobacter* isolates (Table 4). However, all three chromogenic agars supported the growth of the isolate N1 (*E. helveticus*), which also produced colonies typical of *Cronobacter* spp. on these media (Table 4). This isolate showed typical features of *Cronobacter* spp. in the selective enrichment and therefore could be presumptively identified as *Cronobacter*. However, the isolate did not produce acid from sucrose on ESSM agar and was not misidentified as *Cronobacter* by any of the identification

schemes used (Tables 2 and 4). DFI and ESPM agars were included in this study for performance evaluation because the new FDA protocol detection method, which is in process of validation²³, incorporates these media for the isolation of *Cronobacter* spp. colonies.

The use of ESSM as another tool for screening has to be evaluated with care. The 6-hour incubation period suggested by Restaino et al.³⁰ did not prove reliable in this study, with eleven (40.7%) *Cronobacter* isolates generating negative or doubtful results; a 24-hour incubation was necessary for consistent results. Iversen et al.¹⁸ had the opposite problem, as they found transient melibiose-positive results at 6 hours. Additionally, sucrose-negative isolates, such as HPB 2891 (Table 4), may not be identified. For this reason, ESSM agar was considered 96.4% sensitive. This possibility has to be taken into account when using a culture media that utilizes this carbohydrate as a marker for *Cronobacter* spp.

Cronobacter spp. was previously designated as “yellow-pigmented *E. cloacae*”. Based on this feature, the USFDA¹⁵ and the ISO method¹⁶ cite the use of yellow pigmentation as an indication of positive *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) isolates. In this study, detection of a non-yellow pigmented *Cronobacter* isolate (*C. sakazakii* CDC 996-77) and yellow-pigmented non-*Cronobacter* isolates (A1, D2, 501M, 8F, M1, M3, M12 and N1) shows that this criterion is unreliable (Table 4). Moreover, it is possible that the ability of the Brazilian isolates to produce yellow pigment may have contributed to the misidentification of these strains during presumptive identification.

As previously described¹⁸, the type strain of *C. muytjensii* (ATCC 51329) was the only *Cronobacter* culture that did not produce acid from methyl- α -D-glucopyranoside (data not shown). This strain developed typical colonies on the chromogenic agars, showed α -glucosidase activity detected by the commercial kits (ID 32E and API ZYM) and was positive for *gluA* by PCR assay. This result can be attributed to a possible difference between *Cronobacter* spp. in either specificity or inductility of the α -glucosidase enzyme and/or transport mechanism for the different glucopyranosides¹⁸.

In this study, no correlation between enzymatic profiles and *Cronobacter* species, biogroups or origin of the isolates could be determined. Except for *C. sakazakii* and *C. malonicus*, only one isolate from each species was tested, jeopardizing the comparison. Additional

studies using a higher number of strains from each species and/or biogroups would be required to evaluate a possible relationship.

A comparison of the results for the identification of *Cronobacter* spp. obtained with the commercial kits showed that ID 32E was 100% sensitive and specific. These results are similar to those reported elsewhere^{39,40} using the database version 3.0, available since the end of 2006. Reports of false-positive and false-negative results by ID 32E^{32,38} were obtained with the previous database.

In this study, the Vitek 32 system showed a specificity of 100% but a sensitivity of 96.4%, which is in contrast to Fanjat et al.⁴⁰, who reported a 100% sensitivity for the identification of *E. sakazakii* (*Cronobacter*) using the system. Low sensitivity represents false-negative results and may lead to problems in food safety (production/quality assurance) or in public health (pathogen identification) laboratories.

In this study, API 20E showed a sensitivity of 100%, but its specificity was only 71.4%, the lowest specificity among the tested kits. Although this is the most widely used miniaturized kit for confirmation of presumptive *Cronobacter* colonies, several reports of false-positive and false-negative results can be found^{18,30,32,38}. Therefore, the authors believe that the use of API 20E for the identification of *Cronobacter* should be evaluated with care, and ID 32E should be used preferentially.

Recently, Lampel and Chen²³ reported a new method devised by the FDA for the detection of *Cronobacter* spp. in PIF. According to these authors, the protocol is currently undergoing a collaborative validation study for final adoption into the FDA's *Bacteriological Analytical Manual*. This new method incorporates a bi-functional real-time PCR-based assay utilized as a screening tool and also for culture confirmation. FDA methodologies have been commonly adopted as official methods by many countries. However, the qPCR protocol may represent a technical barrier to those laboratories that do not have the financial, technical or physical resources to host the necessary equipment. Therefore, alternative molecular methods need to be considered for those laboratories, such as the use of the conventional PCR protocol targeting *dnaG* proposed in this study. Thus, the developed conventional PCR protocol has proven its usefulness and effectiveness and it can be a good alternative for those laboratories not able to perform qPCR assays.

CONCLUSION

Most of the Brazilian isolates previously identified as *Cronobacter* spp by phenotypic characterization were not confirmed by the PCR protocols used in this study. Thus, we propose the use of PCR protocols targeting *gluA* and *dnaG* to complement the detection or identification of *Cronobacter* spp. after traditional isolation and identification methods.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde – PAPES V/Fiocruz (403594/2008-1), by the Programa Técnico-Tecnologista (Tec-Tec) – FAPERJ/Fiocruz and by INCQS/Fiocruz/MS. The authors thank the Coleção de Culturas do INCQS for strain maintenance and the Brazilian researchers Victor Marin (INCQS/Fiocruz) for technical assistance during PCR assays, Angela C. F. Almeida and Mara L. P. Queiroz (Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brazil), Marise. D. Asensi (Instituto Oswaldo Cruz-IOC/Fiocruz), Maria C. C. Silva (Laboratório Central de Saúde Pública, Minas Gerais, Brazil) and Jeffrey M. Farber (Bureau of Microbial Hazards, Health Canada, Ottawa, Canada) and Seamus Fanning (Centre for Food Safety, University College Dublin, Belfield, Dublin, Ireland) for donating the strains. We deeply thank Franco Pagotto (Bureau of Microbial Hazards, Health Canada, Ottawa, Canada) and Carol Iversen (QS/Microbiological and Molecular Analytics, Nestlé Research Center, Switzerland) for comments and suggestions on the manuscript.

REFERENCES

- Iversen C, Mullane N, McCardell B, Tall BD, Lehner A, Fanning S et al. *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii* and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov., comb. nov., *Cronobacter malonaticus* sp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov., *Cronobacter genomospecies* 1, and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp. *dublinensis* subsp. nov., *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis* subsp. nov. and *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* subsp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2008;58(6):1442-7.
- Kuhnert P, Korczak BM, Stephan R, Joosten H, Iversen C. Phylogeny and prediction of genetic similarity of *Cronobacter* and related taxa by multilocus sequence analysis (MLSA). *Int J Food Microbiol*. 2009;136:152-8.
- Food and Agricultural Organization / World Health Organization – FAO/WHO. *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in powdered follow-up formulae. Meeting Report. (Microbiological Risk Assessment Series, 15). Rome; 2008.
- Lehner A, Stephan R. Microbiological, epidemiological and food safety aspects of *Enterobacter sakazakii*. *J Food Prot*. 2004;67:2850-7.
- Biering G, Karlsson S, Clark NC, Jónsdóttir KE, Lúdvígsson P, Steingrímsson Ó. Three cases of neonatal meningitis caused by *Enterobacter sakazakii* in powdered milk. *J Clin Microbiol*. 1989;27:2054-6.
- van Acker J, De Smet F, Muyldermans G, Bougateg A, Naessens, A, Lauwers, S. Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter sakazakii* in powdered milk formula. *J Clin Microbiol*. 2001;39:293-7.
- Himelright I, Harris E, Lorch V, Anderson M. *Enterobacter sakazakii* infections associated with the use of powdered infant formula – Tennessee, 2001. *MMWR*. 2002;61:298-300.
- Torres-Chavolla E, Ramirez-Cerda E, Gutiérrez-Rojo R. Isolation and identification of *Enterobacter sakazakii* in infant milk formulas. *Foodborne Pathog Dis*. 2007;4:164-8.
- Simmons BP, Gelfand MS, Hass M, Metts L, Ferguson J. *Enterobacter sakazakii* infections in neonates associated with intrinsic contamination of a powdered infant formula. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1989;10:398-401.
- Mullane N, Healy B, Meade J, Whyte P, Wall PG, Fanning S. Dissemination of *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) in a powdered milk protein manufacturing facility. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74:5913-7.
- Teramoto S, Tanabe Y, Okano E, Nagashima T, Kobayashi M, Etoh Y. A first fatal neonatal case of *Enterobacter sakazakii* infection in Japan. *Pediatr Int*. 2010;52(2):312-3.
- Chap J, Jackson P, Siqueira R, Gaspar N, Quintas C, Park J et al. International survey of *Cronobacter sakazakii* and other *Cronobacter* spp. in follow up formulae and infant foods. *Int J Food Microbiol*. 2009;136:185-8.
- Pagotto FJ, Farber, JM. *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*): Advice, policy and research in Canada. *Int J Food Microbiol*. 2009;136:238-45.
- Cawthorn D-M, Botha S, Witthuhn RC. Evaluation of different methods for the detection and identification of *Enterobacter sakazakii* isolated from South African infant formula milks and the processing environment. *Int J Food Microbiol*. 2008;127:129-38.
- United States Food and Drug Administration – USFDA. Isolation and enumeration of *E. sakazakii* from dehydrated powdered infant formula. 2002. Disponível em: [http://www.cfsan.fda.gov/~comm/mmesakaz.html].
- International Organization for Standardization / International Dairy Federation – ISO/IDF. Technical specification: milk and milk products – detection of *Enterobacter sakazakii*. ISO/TS 22964; IDF/RM 210;2006.
- Iversen C, Forsythe SJ. Comparison of media for the isolation of *Enterobacter sakazakii*. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73:48-52.
- Iversen C, Lehner A, Mullane N, Marugg J, Fanning S, Stephan R et al. Identification of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*). *J Clin Microbiol*. 2007;45:3814-6.
- Fox EM, Jordan KN. Towards a one-step *Enterobacter sakazakii* enrichment. *J Appl Microbiol*. 2008;105:1091-7.

20. Giammanco GM, Aleo A, Guida I, Mammina C. Molecular epidemiological survey of *Citrobacter freundii* misidentified as *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) and *Enterobacter hormaechei* isolated from powdered infant milk formula. *Foodborne Pathog Dis*. 2011;8(4):517-25.
21. Healy B, Cooney S, O'Brien S, Iversen C, Whyte P, Nally J et al. *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*): an opportunistic foodborne pathogen. *Foodborne Patholog Dis*. 2010;7:339-50.
22. Seo KH, Brackett RE. Rapid, specific detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula using a real-time PCR assay. *J Food Prot*. 2005;68:59-63.
23. Lampel KA, Chen Y. Method for the isolation and detection of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter*) from powdered infant formula. *Int J Food Microbiol*. 2009;136:179-84.
24. Hassan AA, Akineden Ö, Kress C, Estuningsih S, Schneider E, Usleber E. Characterization of the gene encoding the 16S rRNA of *Enterobacter sakazakii* and development of a species-specific PCR method. *Int J Food Microbiol*. 2007;116:214-20.
25. Lehner A, Nitzsche S, Breeuwer P, Diep B, Thelen K, Stephan R. Comparison of two chromogenic media and evaluation of two molecular based identification systems for *Enterobacter sakazakii* detection. *BMC Microbiol*. 2006;6-15.
26. Kothary MH, McCardell BA, Frazar CD, Deer D, Tall BD. Characterization of the zinc-containing metalloprotease encoded by *zpx* and development of a species-specific detection method for *Enterobacter sakazakii*. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73:4142-51.
27. Farmer III JJ, Asbury MA, Hickman FW, Brenner DJ. The *Enterobacteriaceae* Study Group. *Enterobacter sakazakii*, new species of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. *Int J Systematic Bacteriol*. 1980;30:569-84.
28. Iversen C, Lancashire L, Waddington M, Forsythe S, Ball G. Identification of *Enterobacter sakazakii* from closely related species: The use of Artificial Neural Networks in the analysis of biochemical and 16S rDNA data. *BMC Microbiol*. 2006;6-28.
29. Greenhalgh T. How to read a paper: papers that report diagnostic or screening tests. *BMJ*. 1997;315:540-3.
30. Restaino L, Frampton EW, Lionberg WC, Becker RJ. A chromogenic plating medium for the isolation and identification of *Enterobacter sakazakii* from foods, food ingredients and environmental sources. *J Food Prot*. 2006;69:315-22.
31. Ye Y, Wu Q, Yao L, Dong X, Wu K, Zhang J. A comparison of polymerase chain reaction and International Organization for Standardization Methods for determination of *Enterobacter sakazakii* contamination of infant formulas from Chinese mainland markets. *Foodborne Pathog Dis*. 2009;6:1229-34.
32. Drudy D, O'Rourke M, Murphy M, Mullane NR, O'Mahony R, Kelly L, et al. Characterization of a collection of *Enterobacter sakazakii* isolates from environmental and food sources. *Int J Food Microbiol*. 2006;110:127-34.
33. Mullane NR, Murray J, Drudy D, Prentice N, Whyte P, Wall PG et al. Detection of *Enterobacter sakazakii* in dried infant milk formula by cationic-magnetic-bead capture. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72:6325-30.
34. O'Brien S, Healy B, Negrodo C, Fanning S, Iversen C. Evaluation of a new one-step enrichment in conjunction with a chromogenic medium for the detection of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in powdered infant formula. *J Food Prot*. 2009;72:1472-5.
35. Stephan R, Van Trappen S, Cleenwerck I, Vancanneyt M, De Vos P, Lehner A. *Enterobacter turicensis* sp. nov. and *Enterobacter helveticus* sp. nov., isolated from fruit powder. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2007;57:820-6.
36. Guillaume-Gentil O, Sonard V, Kandhai MC, Marugg JD, Joosten H. A simple and rapid cultural method for detection of *Enterobacter sakazakii* in environmental samples. *J Food Prot*. 2005;68:64-9.
37. Iversen C, Druggan P, Forsythe SJ. A selective differential medium for *Enterobacter sakazakii*, a preliminary study. *Int J Food Microbiol*. 2004;96:133-9.
38. Iversen C, Druggan P, Forsythe SJ. A selective differential medium for *Enterobacter sakazakii*, a preliminary study. *Int J Food Microbiol*. 2004;96:133-9.
39. El-Sharoud WM, O'Brien S, Negrodo C, Iversen C, Fanning S, Healy B. Characterization of *Cronobacter* recovered from dried milk and related products. *BMC Microbiol*. 2009;9:24.
40. Fanjat N, Leclercq A, Joosten H, Robichon D. Comparison of phenotyping methods ID 32E and Vitek 2 Compact GN with 16S rRNA gene sequencing for the identification of *Enterobacter sakazakii*. *J Clin Microbiol*. 2007;45:2048-50.

Comparação das técnicas do número mais provável (NMP) e de filtração em membrana na avaliação da qualidade microbiológica de água mineral natural

Comparison of most probable number (MNP) and membrane filtration techniques for analyzing the natural mineral water microbiological quality

RIALA6/1429

Marcelo Luiz Lima BRANDÃO^{1,2*}, Carla de Oliveira ROSAS¹, Valéria de Mello MEDEIROS¹, Márcia Barbosa WARNKEN¹, Silvia Maria Lopes BRICIO¹, Ana Maria Luiz da SILVA³, Denise Rosane Perdomo AZEREDO²

*Endereço para correspondência: ¹Laboratório de Microbiologia de Produtos, Setor de Alimentos, Departamento de Microbiologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Av. Brasil, 4365, Mangueiras, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, CEP 21040-900. Tel.: (21)3865-5161. E-mail: marcelo.brandao@incqs.fiocruz.br

²Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Campus Rio de Janeiro

³Laboratório de Ensino e Pesquisa, Setor de Urinálise, Centro de Saúde Escola Germano Sinval Faria, Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz

Recebido: 05.05.2011 - Aceito para publicação: 15.02.2012

RESUMO

O consumo de água mineral tem sido associado a um estilo de vida saudável e à crença, por parte dos consumidores, de que esse produto é relativamente seguro. A RDC n. 275/05 determina os padrões microbiológicos para água mineral natural e água natural no Brasil. Este trabalho teve como objetivo comparar as técnicas de filtração em membrana e de número mais provável (NMP) pela avaliação da qualidade microbiológica de amostras de água mineral natural envasilhadas em garrafões de 20 litros, comercializadas no Município do Rio de Janeiro, Brasil. Das 31 amostras representativas (no total de 155 unidades amostrais) analisadas, 22 (70,97%) apresentaram-se insatisfatórias em virtude de ocorrência de coliformes termotolerantes em duas (6,45%) amostras, independentemente da técnica utilizada. A contagem de coliformes totais acima do limite especificado foi evidenciada em três amostras (9,68%), de enterococos em uma amostra (3,23%), de *P. aeruginosa* em 21 (67,74%) e de clostrídios sulfito redutores em duas amostras (6,46%). A técnica do NMP apresentou maior sensibilidade na detecção dos grupos de micro-organismos relacionados na resolução supracitada. Portanto, esta técnica demonstrou ser mais eficiente para executar o controle da qualidade microbiológica de água potável.

Palavras-chave. água mineral, qualidade microbiológica, filtração em membrana, número mais provável.

ABSTRACT

Mineral water consumption has been associated with a healthy lifestyle, and many consumers believe that this is a relatively safe product. In Brazil, the RDC no. 275/05 regulates the microbiological standards for mineral and natural waters. This study aimed at comparing the membrane filtration and the most probable number (MPN) techniques for analyzing the microbiological quality of natural mineral water samples bottled into 20-liter containers, commercialized in Rio de Janeiro, Brazil. Of 31 representative samples (a total of 155 units), 22 (70.97%) were unsatisfactory. Among these noncompliant samples, fecal coliforms were detected in two (6.45%). Total coliforms count above the established limit was observed in three samples (9.68%), being enterococci in one sample (3.23%); *P. aeruginosa* in 21 (67.74%) and sulfite-reducing clostridia in two (6.46%). The MPN technique showed highest sensitivity for detecting the microorganisms groups specified in the above mentioned regulation. Thus, the MPN technique proved to be mostly efficient and suitable for monitoring the microbiological quality of potable waters.

Keywords. mineral water, microbiological quality, membrane filtration, most probable number.

INTRODUÇÃO

A água mineral natural é obtida diretamente de fontes naturais ou por extração de águas subterrâneas, caracterizada pelo conteúdo definido e constante de determinados sais minerais, oligoelementos e outros constituintes considerando-se as flutuações naturais¹. Durante a penetração no solo, a água perde parte da carga bacteriana e matéria orgânica em suspensão. Ao emergir ou após captação, apresenta composição físico-química distinta, além de uma microbiota autóctone, em níveis baixos². Os micro-organismos predominantes são bacilos Gram-negativos, como as bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Flavobacterium* e *Moraxella/Acinetobacter*³.

O consumo de água mineral está associado a um estilo de vida saudável e à crença, por parte dos consumidores, de que se trata de um produto relativamente seguro^{4,5}. O aumento do consumo deste produto no Brasil se deu principalmente pela insatisfação do consumidor com a água dos sistemas públicos de abastecimento e pela falta de suprimentos de água potável segura durante viagens^{4,6,7}.

Com isso, a produção brasileira de água mineral envasada passou de 3,73 bilhões de litros em 2001 para 4,37 bilhões de litros em 2008. Neste mesmo ano, o Brasil foi o quarto consumidor mundial de águas engarrafadas⁸.

No Brasil, entre 1999 e 2008, foram notificados 343 surtos ocasionados por água contaminada, com a ocorrência de oito óbitos. Desses surtos, em 314 não houve especificação da origem da água, e outros 15 foram ocasionados devido ao consumo de água mineral⁹.

Água mineral natural não deve representar risco à saúde do consumidor¹⁰. Neste sentido, as esferas governamentais têm desenvolvido padrões de regulamentação para proteger a população de doenças de origem hídrica. Em 2005, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária publicou a RDC nº 275, que passou a determinar as características microbiológicas para água mineral natural e água natural. Este regulamento prevê, para amostras representativas, a ausência de *Escherichia coli* ou coliformes termotolerantes em cinco unidades amostrais e o limite de até 2,0 UFC/100 mL ou 2,2 NMP/100 mL em uma das cinco unidades para coliformes totais, enterococos, *Pseudomonas aeruginosa* e clostrídios sulfito redutores e/ou *Clostridium perfringens*¹⁰.

A RDC nº 275, de 22 de setembro de 2005, possibilita a utilização das técnicas de filtração em

membrana e do número mais provável (NMP) para a quantificação das bactérias citadas. As referidas técnicas são descritas no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*¹¹ e nas normas publicadas pela International Standardization Organization (ISO).

De acordo com o exposto, este trabalho teve como objetivo comparar duas técnicas de ensaio: a técnica de filtração em membrana e a técnica do NMP para os diferentes micro-organismos citados na legislação de água mineral, a partir da avaliação da qualidade microbiológica de amostras comercializadas em garrações de 20 litros no município do Rio de Janeiro. Os resultados obtidos neste estudo poderão indicar uma técnica mais sensível para a análise microbiológica de água mineral natural segundo os parâmetros legais.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Foram analisadas 31 amostras representativas de água mineral natural, não gaseificadas, comercializadas em garrações retornáveis de 20 litros, de 15 marcas distintas (codificadas pelas letras “A” até “O”), entre os meses de abril a dezembro de 2006, segundo os critérios preconizados pela RDC nº 275, de 22 de setembro de 2005¹⁰. Foram analisadas 7 amostras da marca “A”, 4 da marca “B”, 2 das marcas “C, D, E, F, H, J e L” e 1 das marcas “G, I, K, M, N e O”. A escolha das marcas foi de acordo com a disponibilidade no comércio do município do Rio de Janeiro durante o período de análises. Cada amostra era composta de 5 garrações com a mesma data de envase, sendo considerados do mesmo lote, perfazendo um total de 155 garrações. As análises foram realizadas no Setor de Alimentos do Departamento de Microbiologia do Instituto Nacional de Controle e Qualidade em Saúde – INCQS/Fiocruz.

Análises microbiológicas

Para cada grupo de micro-organismos, foram realizados ensaios utilizando as técnicas de filtração em membrana e NMP. Os ensaios de enumeração de coliformes totais, coliformes termotolerantes, enterococos e *Pseudomonas aeruginosa* foram realizados segundo a descrição no *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005)¹¹. A contagem de clostrídios sulfito redutores foi realizada de acordo com a norma ISO 6461:1986¹².

Enumeração pela técnica de filtração em membrana

Alíquotas de 100 mL de cada unidade amostral foram filtradas em sistema de filtração (Millipore) utilizando membrana estéril de acetato de celulose com 47 mm de diâmetro e 0,45 µm de porosidade. Após a filtração, cada membrana foi transferida para a superfície do meio de cultura sólido específico para cada micro-organismo citado. Para coliformes totais e termotolerantes, foi utilizado o ágar *M-Endo* (Difco), incubado a 35 ± 0,5 °C por 24 horas. As colônias características foram semeadas em caldo verde brilhante bile 2% lactose (VBBL-Merck), incubados a 35 ± 0,5 °C por 48 horas e em caldo EC (Merck), incubados em banho-maria a 44,5 ± 0,2 °C por 24 horas, para a confirmação de coliformes totais e termotolerantes, respectivamente. Os resultados foram expressos em número de unidades formadoras de colônias (UFC) em 100 mL, conforme o cálculo: $C = \sum_i (Z_i * K_i / n_i)$, onde: C = concentração de células em UFC/mL; Z_i = contagem das colônias separadas por características; K_i = total de colônias confirmadas de cada grupo característico; n_i = total de colônias testadas de cada grupo característico.

Para a contagem de enterococos, foi utilizado o ágar *mE* (Difco) incubado a 41 ± 0,5 °C por 48 horas. Após o período de incubação, a membrana foi transferida para uma placa contendo meio EIA, incubado a 41 ± 0,5 °C por 20 minutos. As colônias características foram submetidas aos testes de produção de catalase, coloração de Gram, utilização da esculina (Merck) e crescimento em caldo infusão cérebro-coração (BHI) com 6,5% de NaCl (Merck) a 45 ± 2 °C. O resultado foi expresso em número de UFC em 100 mL.

Para a enumeração de *P. aeruginosa*, foi utilizado o ágar M-PA (Difco) incubado a 41,5 ± 0,5 °C por 72 horas. As colônias características foram semeadas em ágar Milk (Difco) e incubadas a 35 ± 2 °C por 24 horas. O resultado foi expresso em número de UFC em 100 mL conforme o cálculo descrito anteriormente.

Para clostrídios sulfito redutores, foi utilizado o ágar sulfito-ferro (Merck) incubado a 37 ± 1 °C por 48 horas em atmosfera de anaerobiose com uso de gerador específico para este fim (Merck). Foram selecionadas para contagem as colônias negras. O resultado foi expresso como número de UFC de clostrídios sulfito redutores em 100 mL.

Técnica de NMP

Foram semeadas alíquotas de 10 mL de cada unidade amostral em 10 tubos contendo 10 mL de caldo

específico, em dupla concentração, para cada micro-organismo.

Para o teste presuntivo de coliformes, foi utilizado o caldo Lauril Sulfato Triptose (Merck), incubado a 35 ± 2 °C por 48 horas. Os testes confirmatórios foram realizados da mesma forma que na técnica de filtração em membrana. O número de coliformes totais e termotolerantes foram obtidos na tabela de NMP, baseado no número de tubos positivos do caldo VBBL e de caldo EC respectivamente, sendo os resultados expressos em NMP/100 mL.

Para enterococos, foi utilizado o caldo azida dextrose (Difco), incubado a 35 ± 2 °C por 48 horas. Os tubos que apresentaram crescimento foram semeados, pela técnica de esgotamento, em ágar PSE (Difco). As placas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 horas. A confirmação da presença de enterococos foi realizada com as mesmas provas descritas na técnica de filtração em membrana. O resultado foi expresso em NMP/100 mL, baseado no número de tubos de caldo azida dextrose que apresentaram resultado positivo nos ensaios confirmatórios.

Para o NMP de *P. aeruginosa*, foi utilizado o caldo asparagina, preparado por formulação¹¹, incubado a 35 ± 2 °C. Após 48 horas de incubação, os tubos foram avaliados em aparelho gerador de luz ultravioleta a 365 nm (Spectroline[®], Westbury, Nova York, EUA). Os tubos que apresentaram produção de pigmento fluorescente foram submetidos ao teste confirmatório em caldo acetamida, preparado por formulação¹¹, incubado a 35 ± 2 °C por 36 horas. O resultado foi expresso em NMP/100 mL conforme o número de tubos positivos que foram confirmados no caldo acetamida.

O NMP para clostrídios sulfito redutores foi realizado a partir da semeadura em caldo *differential reinforced clostridial medium* (DRCM) (Fluka). Os tubos foram incubados a 37 ± 1 °C em atmosfera de anaerobiose. Após o período de 48 horas, foram considerados positivos os tubos que apresentaram escurecimento do meio. O resultado foi expresso em NMP/100 mL, baseado no número de tubos positivos.

Avaliação da sensibilidade

Os resultados obtidos pelas técnicas de filtração em membrana e NMP na detecção de cada grupo de micro-organismo foram avaliados em relação a sua sensibilidade, como proposto por Greenhalgh¹³. Nesta avaliação, os resultados positivos obtidos por unidade

amostral em cada uma das técnicas empregadas foram considerados como resultados verdadeiros positivos.

O resultado da sensibilidade em percentual foi determinado conforme o cálculo:

$S(\%) = a / (a+b) \times 100$, onde: S = sensibilidade em percentual; a = verdadeiros positivos; b = falso negativos.

RESULTADOS

De 31 amostras analisadas, 22 (70,97%) apresentaram qualidade microbiológica insatisfatória e 4 (12,90%), qualidade microbiológica marginal, segundo os critérios da RDC n. 275/05¹⁰ (Tabela 1). Em relação às marcas analisadas, 7 (D, E, I, K, L, M e N) estavam em desacordo em 100% das amostras; 1 (A), em 85,71%; e 5 (B, C, F, H e J), em 50% das amostras. As marcas G e O e 1 amostra das marcas H e J apresentaram qualidade marginal, ou seja, apenas uma unidade amostral revelou-se entre os limites inferior (< 1,0 UFC ou 1,1 NMP) e superior (2,0 UFC ou 2,2 NMP) estabelecidos na RDC nº 275/05¹⁰ (Tabela 1).

A Tabela 2 apresenta a caracterização das amostras de diferentes marcas de água mineral natural segundo os parâmetros microbiológicos da RDC n. 275/05¹⁰. Foram consideradas insatisfatórias as amostras que apresentaram resultados acima dos limites estabelecidos na legislação supracitada em pelo menos uma das técnicas utilizadas. Duas amostras foram insatisfatórias (6,45%) devido à presença de coliformes termotolerantes, sendo uma analisada pela técnica do NMP e outra por filtração em membrana, porém com ausência de *E. coli* em ambas. Três amostras (9,68%) apresentaram contagem acima do limite especificado para coliformes totais pela técnica do NMP, e, destas, apenas uma foi detectada por filtração em membrana. Uma amostra (3,23%) foi insatisfatória devido a enterococos detectados apenas por filtração em membrana. Um total de 21 amostras (67,74%) apresentou contagem acima do limite especificado para *P. aeruginosa*, 17 (54,84%) pela técnica do NMP e 16 (51,61%) por filtração em membrana. Duas amostras (6,46%) foram insatisfatórias devido a clostrídios sulfito redutores, detectados apenas pela técnica do NMP (Tabela 2).

Quanto ao desempenho das técnicas utilizadas, a filtração em membrana apresentou menor sensibilidade em relação à técnica de NMP na enumeração de coliformes totais, *P. aeruginosa*, enterococos e clostrídios sulfito redutores; e igual sensibilidade na detecção de coliformes termotolerantes (Tabela 3). A sensibilidade

da técnica de NMP foi duas vezes maior que a da técnica de filtração em membrana na quantificação de coliformes totais e clostrídios sulfito redutores, e quatro vezes maior na quantificação de enterococos (Tabela 3). A sensibilidade da técnica de NMP para *P. aeruginosa* (71,2%) também foi maior que a da técnica de filtração em membrana (64,4%) (Tabela 3).

A Tabela 4 apresenta os micro-organismos detectados nas amostras de água mineral natural, analisadas pelas técnicas do NMP e/ou filtração em membrana. As demais unidades amostrais apresentaram resultado “< 1,1 NMP/100 mL” e “Ausência” ou “< 1,0 UFC/mL”.

DISCUSSÃO

A presença de coliformes, que podem ocorrer naturalmente em solos, águas e vegetais, indica a possível contaminação por fontes aéreas, infiltração do solo com águas pluviais ou contato do produto com superfícies que não foram sanificadas corretamente devido a falhas nas Boas Práticas de Fabricação (BPF)³. Os coliformes termotolerantes, quando presentes, apontam deficiência higiênico-sanitária e possível presença de patógenos³.

Os resultados obtidos neste estudo apontam para a importância do contínuo controle da qualidade microbiológica desses produtos. Das amostras analisadas, 5 (A2, A6, A7, D2 e J2) (16,13%) apresentaram-se contaminadas por coliformes totais, sendo que 2 destas (A2 e J2) (6,45%) estavam contaminadas com coliformes termotolerantes. O resultado encontrado foi similar ao de outros autores que avaliaram a qualidade microbiológica de água mineral comercializada em garrafas de 20 litros. Silva et al.¹⁴, ao analisarem 22 amostras, encontraram coliformes totais em 5 (22,7%) e coliformes termotolerantes em 1 amostra (4,5%). Farache Filho e Dias¹⁵, em 84 amostras analisadas, encontraram coliformes totais e termotolerantes em 13 (15,5%) e em 2 amostras (2,4%), respectivamente. Coelho et al.¹⁶ verificaram que, de 120 amostras analisadas, 46 (38,33%) apresentavam coliformes totais acima dos limites permitidos na legislação vigente, enquanto 12 (10%) estavam insatisfatórias devido à presença de coliformes termotolerantes.

Os enterococos, quando presentes, podem indicar contaminação fecal recente. Estas bactérias têm sido utilizadas junto com os coliformes termotolerantes para diferenciar a contaminação de origem fecal de humanos

Tabela 1. Caracterização microbiológica de amostras de água mineral natural envasadas em garrações de 20 lL, segundo a RDC nº 275/05 – ANVISA/MS

Marca e n. da amostra	Qualidade satisfatória (%)	Qualidade insatisfatória (%)	Qualidade marginal (%)
A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7	A1 (14,29%)	A2, A3, A4, A5, A6, A7 (85,71%)	- ^a
B1, B2, B3, B4	B1, B2 (50%)	B3, B4 (50%)	-
C1, C2	C1 (50%)	C2 (50%)	-
D1, D2	-	D1, D2 (100%)	-
E1, E2	-	E1, E2 (100%)	-
F1, F2	F1 (50%)	F2 (50%)	-
G	-	-	G (100%)
H1, H2	-	H2 (50%)	H1 (50%)
I	-	I (100%)	-
J1, J2	-	J2 (50%)	J1 (50%)
K	-	K (100%)	-
L1, L2	-	L1, L2 (100%)	-
M	-	M (100%)	-
N	-	N (100%)	-
O	-	-	O (100%)
Total (n = 31)	5 (16,13%)	22 (70,97%)	4 (12,90%)

^a- não detectada.

Tabela 2. Caracterização microbiológica de amostras de água mineral natural segundo os parâmetros estabelecidos na RDC nº 275/05 – ANVISA/MS, analisadas pelas técnicas do número mais provável (NMP) e filtração em membrana (FM)

Micro-organismos	Técnica de análise	N. de amostras com qualidade satisfatória	N. de amostras com qualidade insatisfatória [identificação](%)	N. de amostras com qualidade marginal [identificação](%)
Coliformes termotolerantes	NMP ^a	30	1 [A2] (3,23%)	N.A. ^c
	FM ^b	30	1 [J2] (3,23%)	
Coliformes totais	NMP	27	3 [A6, A7, D2] (9,68%)	1 [A2] (3,23%)
	FM	29	1 [A6] (3,23%)	1 [J2] (3,23%)
Enterococos	NMP	27	- ^d	4 [B3, D2, L2, J2] (12,90%)
	FM	30	1 [D2] (3,23%)	-
<i>P. aeruginosa</i>	NMP	13	17 [A2, A3, A5, A6, A7, B3, B4, D1, D2, E2, H2, I, K, L1, L2, M, N] (54,84%)	1 [H1] (3,23%)
	FM	14	16 [A3, A4, A5, A6, A7, C2, D1, D2, E1, E2, F2, I, K, L2, M, N] (51,61%)	1 [O] (3,23%)
Clostrídios sulfito redutores	NMP	25	2 [E1, F2] (6,46%)	4 [D2, E2, G, K] (12,90%)
	FM	27	-	4 [E2, G, J1, K] (12,90%)

^a- número mais provável; ^b- filtração em membrana; ^c- não se aplica; ^d- não detectada.

Tabela 3. Sensibilidade das técnicas de filtração em membrana e número mais provável na detecção de cada grupo de micro-organismo em amostras de água mineral natural

Técnica		Coliformes termotolerantes	Coliformes totais	<i>P. aeruginosa</i>	Enterococos	Clostrídios sulfito redutores
Filtração em membrana	Verdadeiro Positivo ^a	1	2	38	1	4
	Falso Negativo ^b	1	3	21	3	8
	Total	2	5	59	4	12
$S = a/(a+b) \times 100$		S = 50,0%	S = 40,0%	S = 64,4%	S = 25,0%	S = 33,3%
Número mais provável	Verdadeiro positivo ^a	1	4	42	4	8
	Falso negativo ^b	1	1	17	0	4
	Total	2	5	59	4	12
$S = a/(a+b) \times 100$		S = 50,0%	S = 80,0%	S = 71,2%	S = 100,0%	S = 66,7%

a= número de verdadeiro positivos; b= número de falso negativos; S= sensibilidade

Tabela 4. Carga microbiana detectada em amostras de água mineral natural (20 L), pelas técnicas do número mais provável e/ou filtração em membrana, conforme RDC n. 275/05 – ANVISA/MS

Amostra	Unidade analítica	Número mais provável (NMP/100 mL)	Filtração em membrana (UFC/100 mL)
Coliformes totais			
A2	2	2,2	< 1,0
A6	4	> 23	> 300
A7	5	3,6	< 1,0
D2	1	3,6	< 1,0
J2	1	< 1,1	2,0
Coliformes termotolerantes			
A2	2	1,1	Ausência
J2	1	< 1,1	2,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
A2	4	5,1	< 1,0
	5	> 23	< 1,0
	1	< 1,1	3,0
	2	1,1	< 1,0
A3	3	2,2	< 1,0
	4	< 1,1	5,0
	5	2,2	< 1,0
A4	3	< 1,1	4,0
	5	< 1,1	5,0
	2	9,2	137
A5	3	2,2	13
	4	5,1	11
	5	< 1,1	72
	1	2,2	3,0
A6	2	23	< 1,0
	3	9,2	< 1,0
	1	5,1	34
A7	2	> 23	> 300
	3	2,2	> 300
	5	< 1,1	272
B3	4	3,6	< 1,0
	3	12	< 1,0
B4	4	1,1	< 1,0
	5	12	< 1,0
C2	1	< 1,1	24
	4	< 1,1	18
	3	1,1	41
D1	4	1,1	> 300
	5	3,6	< 1,0
	1	> 23	< 1,0
D2	4	< 1,1	4,0
	5	< 1,1	5,0
E1	4	< 1,1	8,0
E2	3	2,2	124
	5	16,1	160

Amostra	Unidade analítica	Número mais provável (NMP/100 mL)	Filtração em membrana (UFC/100 mL)
F2	5	< 1,1	3,0
H1	5	2,2	< 1,0
H2	4	1,1	< 1,0
	5	1,1	< 1,0
	1	2,2	11
I	2	< 1,1	58
	4	> 23	93
	5	> 23	93
	1	16,1	100
K	4	2,2	< 1,0
	5	23	< 1,0
L1	1	1,1	< 1,0
	4	1,1	< 1,0
	3	> 23	48
L2	4	1,1	5,0
	5	> 23	50
M	4	> 23	118
	5	> 23	< 1,0
	1	2,2	19
	2	< 1,1	14
N	3	< 1,1	15
	4	< 1,1	31
	5	23	35
O	3	< 1,1	1,0
<i>Enterococcus</i>			
B3	5	2,2	< 1,0
D2	1	1,1	5,0
J2	5	2,2	< 1,0
L2	5	2,2	< 1,0
Clostrídios sulfíto redutores			
D2	2	1,1	< 1,0
	1	2,2	< 1,0
E1	3	3,6	< 1,0
	5	2,2	< 1,0
E2	1	1,1	< 1,0
	5	< 1,1	2,0
F2	2	16,1	< 1,0
G	1	1,1	< 1,0
	5	< 1,1	2,0
J1	5	< 1,1	2,0
K	4	2,2	< 1,0
	5	< 1,1	2,0

com a de outros animais de sangue quente¹¹. Bactérias do grupo enterococos foram detectadas em 4 amostras (B3, D2, J2 e L2) (12,90%), sendo que apenas a amostra D2 apresentou valores acima do limite permitido pela RDC n. 275/05¹⁰ (Tabela 2). Este resultado foi semelhante ao relatado por Silva et al.¹⁴, que, ao analisarem 22 amostras, encontraram estreptococos fecais em apenas uma (4,5%). Já Ritter e Tondo⁵, ao analisarem 15 amostras de garrações de 20 L de uma indústria localizada na Cidade de Novo Hamburgo-RS, não detectaram enterococos.

Os esporos de clostrídios estão amplamente distribuídos no ambiente, podendo estar presentes em material fecal de seres humanos e animais, em água residuária e no solo. Diferentemente das bactérias do grupo coliforme, os esporos sobrevivem na água por longos períodos, por serem mais resistentes que as formas vegetativas à ação de fatores químicos e físicos, sugerindo contaminação fecal remota¹². Esporos de clostrídios sulfito redutores foram encontrados em 7 amostras (D2, E1, E2, F2, G, J1 e K) (22,58%), sendo que apenas 2 (E1 e F2) (6,46%) apresentaram-se fora dos padrões descritos na legislação¹⁰ (Tabela 2). Outros autores obtiveram resultados inferiores. Silva et al.¹⁴ não detectaram clostrídios sulfito redutores em 22 amostras analisadas. Ritter e Tondo⁵, ao analisarem 15 amostras de garrações de 20 L de uma indústria localizada no município de Novo Hamburgo-RS, não detectaram clostrídios sulfito redutores.

O elevado índice de amostras contendo *P. aeruginosa* acima dos limites permitidos (67,74%) revela o risco do consumo desses produtos. Outros autores já relataram contaminação por *P. aeruginosa* neste mesmo tipo de produto. Silva et al.¹⁴, ao analisarem 22 amostras, encontraram *P. aeruginosa* em 11 (50%). Farache Filho e Dias¹⁵ constataram que, de 84 amostras analisadas, 8 (9,5%) apresentavam contaminação por *P. aeruginosa* acima dos limites estabelecidos na RDC n. 275/05¹⁰. Coelho et al.¹⁶, ao analisarem 120 amostras, encontraram 22 (18,33%) contaminadas com *P. aeruginosa*.

Pseudomonas aeruginosa é considerado um micro-organismo oportunista, podendo apresentar capacidade invasiva e toxigênica, com grande potencial de desenvolvimento de múltipla resistência aos agentes antimicrobianos. O consumo de água mineral contaminada com *P. aeruginosa* pode representar risco para determinados grupos com maior suscetibilidade a infecções, como crianças, idosos e imunossuprimidos¹⁷.

A característica de encapsulamento por *P. aeruginosa* lhe confere a capacidade de formar biofilmes

em equipamentos e embalagens plásticas¹⁷. Sua presença nas amostras analisadas sugere provável contaminação durante o engarrafamento e o armazenamento, visto que as embalagens são reutilizáveis, podendo, assim, contribuir em parte na carga microbiana do produto final, principalmente quando as etapas de lavagem e desinfecção são deficientes¹⁶. Dessa forma, água mineral em garração reutilizável de 20 litros apresenta maior risco de contaminação¹⁵.

As embalagens plásticas retornáveis devem ser submetidas a pré-lavagem antes da etapa de higienização automática (limpeza e desinfecção)¹. A higienização dessas embalagens tem sido um fator preocupante na indústria de águas envasadas⁵. Neste contexto, o Departamento Nacional de Produção Mineral (DNPM) publicou a Portaria n. 358, de 21 de setembro de 2009¹⁸, que disciplina o prazo de validade de embalagens reutilizáveis de 10 e 20 litros, que passou a ser de três anos, prazo no qual a embalagem suporta os desgastes decorrentes de sua manutenção e transporte.

Em relação às técnicas analíticas empregadas na rotina de análises, a técnica de filtração em membrana é altamente reprodutível; pode ser utilizada para análise de grandes volumes de amostra, no caso de amostras suspeitas de apresentarem agrupamentos celulares bacterianos, e geralmente necessita de um tempo de análise menor que o procedimento de NMP. O limite de detecção desta técnica é de 1,0 UFC por volume inoculado, sendo indicada para amostras com contagens abaixo do limite de detecção por outros procedimentos¹¹.

A técnica de NMP é um método estatístico, e os resultados são geralmente mais elevados que os provenientes de contagens em placas. Mesmo esta técnica não sendo muito precisa, ela permite uma melhor recuperação de micro-organismos pelo uso de meios líquidos seletivos ou diferenciais¹⁹. Os dados obtidos corroboram essa afirmativa, pois neste estudo foi observada maior sensibilidade da técnica na enumeração de coliformes totais, *P. aeruginosa*, enterococos e clostrídios sulfito redutores em relação à técnica de filtração em membrana.

CONCLUSÃO

A técnica do NMP apresentou maior sensibilidade do que a técnica de filtração por membrana para quatro dos grupos de micro-organismos (coliformes totais, enterococos, *P. aeruginosa* e clostrídios sulfito redutores)

relacionados na RDC n. 275/05¹⁰ e igual sensibilidade na detecção de coliformes termotolerantes. Sendo assim, esta técnica demonstrou ser mais eficiente para o controle da qualidade microbiológica de água mineral natural.

O estudo apresentou um elevado índice de amostras com qualidade insatisfatória (70,97%). Dentre estas, 21 (67,74%) foram devido à presença de *P. aeruginosa*. Atenção deve ser dada à reutilização dos garrafões de 20 litros, que, quando não higienizados de forma correta, podem acarretar contaminação bacteriana e facilitar a formação de biofilmes por *P. aeruginosa*.

Considerando-se o alto consumo de água mineral natural, ações de monitoramento devem ser adotadas a fim de garantir produtos seguros ao consumidor.

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC n. 173, de 13 de setembro de 2006. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Boas Práticas para Industrialização e Comercialização de Água Mineral Natural e Água Mineral. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, v. 178, 15 set 2006, Seção 1, p. 60.
2. Hiluy DJ, Perdigo GO, Aragao MAP, Peixoto TJ. Avaliação da qualidade microbiológica de águas minerais comercializadas em Fortaleza. *Hig Aliment*. 1994;8(33):17.
3. Kim H, Feng P. Bottled water. In: Downes FP, Ito K, organizadores. *Compendium of Methods for the Examination of Foods*. 4. ed. Washington: APHA; 2001. p. 573-6.
4. Jeena MI, Deepa P, Mujeeb Rahiman KM, Shanthi RT, Hatha AAM. Risk assessment of heterotrophic bacteria from bottled drinking water sold in Indian markets. *Int J Hyg Environ Health*. 2006;(209):191-6.
5. Ritter AC, Tondo EC. Avaliação microbiológica de água mineral natural e de tampas plásticas utilizadas em uma indústria da Grande Porto Alegre/RS. *Alim Nutr, Araraquara*. 2009;20(2):203-8.
6. Coelho DA, Silva PMF, Veiga SMOM, Fiorini J. E. Avaliação da qualidade microbiológica de águas minerais comercializadas em supermercados da cidade de Alfenas, MG. *Hig Aliment*. 2007;21(151):88-92.
7. Cardoso CC, Veiga SMOM, Nascimento LC, Fiorini JE, Amaral LA. Avaliação microbiológica de um processo de sanificação de galões de água com a utilização do ozônio. *Cienc Tecnol Aliment*. 2003;23(1):59-61.
8. Brasil. Ministério de Minas e Energia. Departamento Nacional de Produção Mineral. Fonseca DS. Água mineral. In: Rodrigues AFS, coordenador. *Economia mineral no Brasil*. Brasília: DNPM; 2009. p. 719-30. Disponível em: [http://www.dnpm.gov.br/conteudo.asp?IDSecao=68&IDPagina=1461].
9. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. Surtos de DTA ocasionados por água. [acesso 2010 out 16]. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/surtos_agua_10.pdf].
10. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC n. 275, de 22 de setembro de 2005. Regulamento Técnico de Características Microbiológicas para Água Mineral Natural e Água Natural. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, v. 184, 23 set 2005, Seção 1, p. 377.
11. Eaton AD, Clesceri LS, Rice EW, Greenberg AE, organizadores. *Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater*, 21. ed. Washington: APHA; 2005.
12. International Organization for Standardization – ISO. Norma ISO 6461 – Water Quality – Detection and enumeration of the spores of sulfite-reducing anaerobes (clostridia): Part 1 – Method by enrichment in a liquid medium; Part 2 – Method by membrane filtration, 1. ed. 1986.
13. Greenhalgh, T. How to Read a Paper – Papers That Report Diagnostic or Screening Tests. *BMJ*. 1997;315(7107):540-3.
14. Silva MEZ, Santana RG, Guilhermetti M, Camargo Filho I, Endo EH, Ueda-Nakamura T, et al. Comparison of the bacteriological quality of tap water and bottled mineral water. *Int J Hyg Environ Health*. 2008;(211):504-9.
15. Farache Filho A, Dias MFF. Qualidade microbiológica de águas minerais em galões de 20 litros. *Alim Nutr, Araraquara*. 2008;19(3):243-8.
16. Coelho MIS, Mendes ES, Cruz MCS, Bezerra SS, Silva RPP. E. Avaliação da qualidade microbiológica de águas minerais consumidas na região metropolitana de Recife, estado de Pernambuco. *Acta Sci, Health Sci*. 2010;32(1):1-8.
17. Lincopan N, Trabelsi LR. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Trabelsi LR, Alterthum F, editores. *Microbiologia*. São Paulo: Atheneu; 2005. p. 359-68.
18. Brasil. Ministério de Minas e Energia. Departamento Nacional de Produção Mineral. Portaria n. 358, de 21 de setembro de 2009. Altera a Portaria n. 387, de 19 de setembro de 2008. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, v. 181, 22 set 2009, Seção 1, p. 51.
19. Jay MJ. Métodos de Cultura, Microscopia e Amostragem. In: JAY MJ. *Microbiologia de alimentos*. Porto Alegre: Artmed; 2005. p. 199-221.

Pesquisa de enterobactérias em chocolates

Detection of enterobacteria in chocolates

RIALA6/1430

Érika Marques REOLON, Aline Regina Barbosa SANTOS, Vanessa Eliane MOREIRA, Maristela da Silva do NASCIMENTO*

*Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas/SP, Brasil. Tel. (19) 3743-1815; Fax: (19) 3743-1812. E-mail: mnascimento@ital.sp.gov.br

Recebido: 16.11.2010 - Aceito para publicação: 10.01.2012

RESUMO

O chocolate é um dos produtos responsáveis pelos maiores surtos de salmonelose em humanos, contudo pouco se sabe sobre a presença de agentes enteropatogênicos em chocolate produzido no Brasil. Neste contexto, este trabalho pesquisou a presença de enterobactérias totais, coliformes, *Escherichia coli* e *Salmonella* em 65 amostras de chocolate (22 ao leite, 22 branco, 17 meio amargo e 4 em pó) comercializadas em Campinas/SP. As amostras apresentaram valores médios de pH entre 5,8 e 7,5 e atividade de água entre 0,31 e 0,59. Não foram isolados coliformes termotolerantes, *E. coli* e *Salmonella* nas amostras analisadas. Porém, enterobactérias totais foram detectadas em 22,7% das amostras de chocolate ao leite e branco e em 11,7% das amostras de chocolate meio amargo. Os coliformes totais foram isolados, respectivamente, em 13,6% e 4,5% das amostras de chocolate ao leite e branco. Enterobactérias totais e coliformes não foram detectados nas amostras de chocolate em pó. A contaminação encontrada reforça a necessidade de implementação de rigoroso programa de boas práticas de fabricação pelas indústrias processadoras de chocolate para garantir a segurança microbiológica dos produtos manufaturados.

Palavras-chave. cacau, chocolate, *Salmonella*, *Escherichia coli*.

ABSTRACT

Chocolate is one product responsible for causing major outbreaks of salmonellosis in humans, although little is known about the presence of enteropathogens in chocolate produced in Brazil. In this context, the present study investigated the occurrence of total enterobacteria, coliforms, *Escherichia coli* and *Salmonella* in 65 samples of chocolate (22 milk chocolate, 22 white chocolate, 17 dark chocolate and 4 chocolate powder) marketed in Campinas/SP. The samples showed mean values of pH from 5.8 to 7.5 and water activity from 0.31 to 0.59. No fecal coliform, *E. coli* and *Salmonella* were isolated from the analyzed samples. Nevertheless, total enterobacteria were detected in 22.7% of milk and white chocolate and in 11.7% of dark chocolate samples. Total coliforms were isolated from 13.6% and 4.5% of milk and white chocolate samples, respectively. Neither total enterobacteria nor total coliforms were detected in chocolate powder samples. These findings reinforce the need for implanting a strict program of good manufacturing practices for chocolate processing to ensure the microbiological safety of these products.

Keywords. cocoa, chocolate, *Salmonella*, *Escherichia coli*.

INTRODUÇÃO

O chocolate é um produto à base de cacau muito apreciado e amplamente consumido em todo o mundo, especialmente por crianças. Em 2007, a produção mundial de chocolate ultrapassou os 4 bilhões de toneladas, sendo os seis maiores produtores Estados Unidos, Alemanha, Reino Unido, Brasil, França e Itália¹.

A qualidade do chocolate depende primordialmente da qualidade do cacau, de sua composição físico-química e características sensoriais. Sob o aspecto de saúde pública, os micro-organismos que podem afetar adversamente a qualidade do chocolate são os enteropatógenos, como *Salmonella*.

A União Europeia² destaca o chocolate entre os produtos responsáveis pelos maiores surtos de salmonelose em humanos. No Brasil, entre 1999 e 2007, foram reportados 13 surtos de doenças de origem alimentar relacionadas ao consumo de chocolate, totalizando 122 casos, sem registro de óbito. Desses, 2 tiveram seu agente etiológico identificado como *Salmonella* e envolveram 29 pessoas³.

A baixa atividade de água (0,3 a 0,5) e o alto teor de gordura (50%) no chocolate dificultam a multiplicação de enteropatógenos. Contudo, ao mesmo tempo, propiciam o aumento da resistência térmica^{4,5} e podem contribuir para a redução da dose infectante do patógeno. No caso de *Salmonella*, a literatura reporta doses de 1,1 a 2,8 UFC/g⁶.

As matérias-primas à base de cacau não são os únicos ingredientes que podem introduzir *Salmonella* no chocolate. Entretanto, de acordo com Cordier⁷, as amêndoas de cacau seriam a principal fonte de contaminação de *Salmonella* para esse tipo de produto. A International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF)⁸ considera essencial a verificação rotineira da presença deste patógeno nos ingredientes derivados do cacau. Quando esta prática não for possível, análises de *Enterobacteriaceae* totais e coliformes podem fornecer informações sobre as condições higiênico-sanitárias dos produtos e processos. Esses micro-organismos são amplamente utilizados na indústria de alimentos como indicadores de higiene de processo e podem ser monitorados em paralelo para verificar as condições gerais de eficácia.

Apesar do conhecimento da atuação de *Salmonella* como agente etiológico de doenças de origem alimentar transmitidas por chocolate, pouco se sabe

sobre a presença desse patógeno e outras enterobactérias em chocolate produzido no Brasil. Portanto, o objetivo deste estudo foi pesquisar a ocorrência de enterobactérias totais, coliformes, *Escherichia coli* e *Salmonella* em chocolates comercializados em Campinas/SP.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Foram analisadas 65 amostras de chocolates de 19 marcas comerciais diferentes, sendo 22 amostras de chocolate ao leite, 22 de chocolate branco, 17 de chocolate meio amargo e 4 de chocolate em pó. As amostras foram coletadas no comércio varejista de Campinas/SP entre agosto de 2009 e julho de 2010.

Análises Microbiológicas

As análises microbiológicas foram realizadas segundo metodologia da Food and Drug Administration⁹.

Para contagem de enterobactérias, foi utilizado ágar Vermelho Violeta Bile Glicose (VRBG), com incubação a 35 °C por 24 horas. Os resultados foram expressos em logaritmo de unidade formadora de colônia por grama (log UFC/g), e o limite de detecção do método foi de 1,0 log UFC/g.

Para coliformes totais, termotolerantes e *Escherichia coli*, o teste presuntivo foi realizado em Lauril Sulfato Tryptose. A confirmação de coliformes totais foi feita em caldo Verde Brilhante Bile, com incubação a 35 °C por 48 horas. Para coliformes termotolerantes, foi utilizado caldo EC incubado em banho-maria a 44,5 °C por 24 horas. A confirmação de *Escherichia coli* foi realizada a partir dos tubos de Caldo EC positivos (com produção de gás), utilizando o Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB), e posteriormente as provas bioquímicas de indol, Voges-Proskauer, Vermelho de Metila e citrato. Os resultados foram expressos em logaritmo de número mais provável por grama (log NMP/g), e o limite de detecção foi de 0,48 log NMP/g.

Para pesquisa de *Salmonella*, foi realizado pré-enriquecimento em leite em pó desnatado reconstituído a 10%, suplementado com verde brilhante. Para o enriquecimento seletivo, foram empregados os caldos Rappaport-Vassiliadis (RV) e Tetracionato (TT), e para a etapa de plaqueamento os ágar Sulfato de Bismuto (BS), Entérico de Hecktoen (HE) e Xilose Lisina Desoxicolato (XLD). A confirmação bioquímica foi realizada utilizando-se primeiramente Ágar Tríplice Açúcar Ferro

inclinado (TSI) e Ágar Lisina Ferro inclinado (LIA). As colônias que apresentaram reações típicas em um ou ambos os testes foram submetidas a confirmação sorológica e provas bioquímicas complementares (Teste de Urease, Vogues-Proskauer, Indol e β -galactosidase). Os resultados foram expressos como presença ou ausência em 25 g de produto.

Análises físico-químicas

As amostras foram submetidas a análises físico-químicas de determinação de pH e atividade de água. Para a análise de pH, 10 g das amostras foram triturados e adicionados a 100 mL de água deionizada. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas por 20 minutos em misturador, e a leitura foi feita em pHmetro calibrado¹⁰.

A atividade de água de cada amostra foi determinada em duplicata, com o auxílio de um higrômetro (Aqua Lab 3TE, Braseq, Brasil). As amostras foram maceradas, levadas a estufa de 25 °C para estabilização da temperatura e, então, submetidas a leitura.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 mostra os resultados médios referentes à determinação do pH e da atividade de água de 65 amostras de chocolate de 19 diferentes marcas coletadas no varejo de Campinas/SP. As amostras de chocolate ao leite apresentaram atividade de água média de 0,44 e pH de 6,5. No chocolate branco, foram verificados atividade de água de 0,44 e pH de 6,7. Para o chocolate meio amargo, foram obtidos atividade de água de 0,42 e pH de 6,1. A atividade de água das amostras de chocolate em pó foi de 0,49, com pH de 7,1, valores ligeiramente superiores aos observados para as amostras em barra.

Tabela 1. Determinação de pH e atividade de água em chocolates comercializados em Campinas/SP

Produto	pH*	Atividade de água*
Chocolate ao leite	6,5 ± 0,2	0,44 ± 0,07
Chocolate meio amargo	6,1 ± 0,4	0,42 ± 0,07
Chocolate branco	6,7 ± 0,1	0,44 ± 0,06
Chocolate em pó	7,1 ± 0,2	0,49 ± 0,04

* Média ± desvio padrão.

A baixa atividade de água (< 0,60) induz consumidores e indústrias a considerarem o chocolate um produto de baixo risco microbiológico. Contudo, apesar de limitar o desenvolvimento microbiano, esta

condição não impede a sobrevivência de bactérias no produto¹¹.

Existem escassos relatos na literatura sobre a contaminação de chocolate por membros da família *Enterobacteriaceae*, como coliformes e *Salmonella*. Torres-Vitela et al.¹² realizaram no México um estudo no qual foram analisadas 44 amostras de chocolates embalados e 56 de chocolates não embalados quanto à presença de *Salmonella* e coliformes. O estudo revelou a presença de coliformes em 30% das amostras, e *Salmonella* em duas amostras de chocolate embalado. Barrera et al.¹³ analisaram 30 amostras de chocolate comercializado na Espanha. Não detectaram *Salmonella*, porém duas amostras (6,7%) apresentaram *E. coli*.

Neste estudo, nenhuma das 65 amostras analisadas apresentou contaminação por coliformes termotolerantes, *E. coli* e *Salmonella*, estando, portanto, de acordo com a legislação vigente¹⁴. Porém, apesar da ausência de *Salmonella*, as amostras apresentaram contaminação por enterobactérias totais e coliformes totais. Cinco (22,7%) das 22 amostras de chocolate ao leite apresentaram enterobactérias totais, com contagem média de 1,7 log UFC/g e máxima de 3,6 log UFC/g, e 13,6% (3/22) das amostras continham coliformes totais (1,1 log NMP/g). As amostras de chocolate branco apresentaram o mesmo percentual de contaminação que o chocolate ao leite por enterobactérias (22,7%), com contagem média de 1,2 log UFC/g; com relação aos coliformes totais, apenas 1 amostra (4,5%) apresentou contagem acima do limite de detecção do método (0,6 log NMP/g). Dentre as 17 amostras de chocolate meio amargo analisadas, 2 (11,7%) apresentaram contaminação por enterobactérias (1,4 log UFC/g), e em nenhuma foram detectados coliformes totais. Já nas amostras de chocolate em pó, não foi observada contaminação por nenhum grupo microbiano avaliado (Tabela 2).

A detecção de membros da família *Enterobacteriaceae* em 20% das amostras com contagem superior à recomendada pelo ICMSF⁸, ou seja, ≥ 1 log UFC/g, indica a ocorrência de alguma falha nos programas de qualidade, no processo térmico ou na sanitização. Condições que permitam a contaminação e a permanência de enterobactérias totais e coliformes no produto acabado também possibilitam uma eventual contaminação por patógenos como *Salmonella*. Este fato preocupa do ponto de vista de saúde pública, visto que falhas de limpeza e de Boas Práticas de Fabricação já foram identificadas como causa de surtos de salmonelose

Tabela 2. Pesquisa de enterobactérias em chocolates comercializados em Campinas/SP

Tipo de Chocolate	Contaminação microbiológica									
	Enterobactérias totais		Coliformes totais		Coliformes termotolerantes		<i>Escherichia coli</i>		<i>Salmonella</i>	
	Amostras positivas (%)	Contagem (log UFC/g)*	Amostras positivas (%)	Contagem (log NMP/g)**	Amostras positivas (%)	Contagem (log NMP/g)**	Amostras positivas (%)	Contagem (log NMP/g)**	Amostras positivas (%)	Presença em 25 g
Ao leite	22,7	1,7 ± 1,1	13,6	1,1 ± 0,8	0	< 0,5	0	< 0,5	0	Ausente
Meio amargo	11,7	1,4 ± 0,1	0	< 0,5	0	< 0,5	0	< 0,5	0	Ausente
Branco	22,7	1,2 ± 0,3	4,5	0,6	0	< 0,5	0	< 0,5	0	Ausente
Em pó	0	< 1,0	0	< 0,5	0	< 0,5	0	< 0,5	0	Ausente

* Unidade formadora de colônia. ** Número mais provável.

veiculados por chocolate^{6,15}. Além disso, outro agravante a ser considerado pelas indústrias processadoras na implantação e na manutenção de programas de qualidade são as características apresentadas pela *Salmonella* neste tipo de produto, como baixa dose infectante (1 UFC/g)⁶, alta resistência térmica⁵ e longa permanência no ambiente e no produto¹⁶.

CONCLUSÃO

O controle tanto da matéria-prima quanto do processo é considerado essencial na prevenção de patógenos em chocolate. Apesar da ausência de *Salmonella*, 20% das amostras apresentaram contaminação por enterobactérias. Baseado neste contexto, fica claro que as indústrias processadoras de chocolate devem manter um rigoroso programa de boas práticas de fabricação para garantir a segurança microbiológica dos produtos.

REFERÊNCIAS

1. ICCO (International Cocoa Organization) Annual Report 2007/2008. [acesso 2012 jul 12]. Disponível em: [http://www.icco.org].
2. EC (European Commission). *Salmonella* in Foodstuffs. Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health, 2003. [acesso 2006 nov 22]. Disponível em: [http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scv/out66_en.pdf].
3. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consolidação de surtos e emergências em saúde pública. COVEHMS. Sistema de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. [acesso 2009 jun 20]. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br].
4. Podolak R, Enache H, Stone W, Black DG, Elliot P. Sources and Risk Factors for Contamination, Survival, Persistence, and Heat Resistance of *Salmonella* in Low – Moisture Foods. *J Food Prot*. 2010;73(10):1919-36.
5. Izurieta WP, Komitopoulou E. Effect of moisture on *Salmonella* spp. heat resistance in cocoa and hazelnut shells. *Food Res Int*. 2011; doi:10.1016/j.food.res.2011.09.024.
6. Werber D, Dreesman J, Feil F, Treeck UV, Fell G, Ethelber GS. International outbreak of *Salmonella* Oranienburg due to German chocolate. *BMC Infect Diseases*. 2005;5:7-17.
7. Cordier JL. HACCP in the chocolate industry. *Food Control*. 1994;5:171-5.
8. International Commission on Microbiological Specifications for Foods – ICMSE, Microorganisms in Foods 8 – Use of data for assessing process control and product acceptance. Nova York: Springer; 2011.
9. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual Online, 2005. [acesso 2008 jan 15]. Disponível em: [http://www.cfsan.fda.gov/ebam/bam-5.html].
10. Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 4. ed. Brasília: Anvisa; 2005. p. 104-5.
11. Hiramatsu R, Matsumoto M, Sakae K, Miyazaki Y. Ability of shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. to survive in a desiccation model system and in dry foods. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71:6657-63.
12. Torres-Vitela R, Escartin EF, Castillo A. Risk of Salmonellosis Associated with Consumption of Chocolate in Mexico. *J Food Prot*. 1995;58(5):478-81.
13. Barrera MC, Blanco MJ, Agut M. Análisis microbiológico de tabletas de chocolate y cacao en polvo. *Alimentaria*. 2001;38(326):71-4.
14. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, 10 jan 2001. Seção 1, n. 7-E, p. 45-53.
15. HPA (Health Protection Agency). National increase in human *Salmonella* infections in England and Wales: March to June 2006. *CDR Weekly*. 2006;16(26):1-2.
16. Komitopoulou E, Peñaloza W. Fate of *Salmonella* in dry confectionery raw materials. *J Appl Microbiol*. 2009;106:1892-900.

Ocorrência de fungos e aflatoxinas em grãos de milho

Occurrence of fungi and aflatoxins in corn kernels

RIALA6/1431

Larissa Fatarelli BENTO¹, Maria Aparecida Braga CANEPPELE^{2*}, Maria Cristina de Figueiredo e ALBUQUERQUE³, Leimi KOBAYASTI⁴, Carlos CANEPPELE², Patrícia de Jesus ANDRADE¹

*Endereço para correspondência: ²Núcleo de Tecnologia em Armazenagem, Departamento de Agronomia, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT. Rua 46, n. 129, Boa Esperança, CEP 78068-748. Tel.: (65) 3615-8613, fax: (65) 3615-8609. E-mail: canepele@terra.com.br.

¹Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT.

³Laboratório de Sementes, Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT.

⁴Laboratório de Fitopatologia, Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT.

Recebido: 06.10.2011 - Aceito para publicação: 20.01.2012

RESUMO

Os danos causados por fungos em grãos de milho consistem na redução da qualidade nutritiva e interferência na classificação comercial, representando um risco para a segurança alimentar. Com o objetivo de identificar e quantificar os fungos detectados e verificar a ocorrência de aflatoxinas em grãos de milho armazenados, foram analisadas 84 amostras, referentes às safras 2009 e 2010, provenientes de diferentes municípios localizados nas regiões Norte, Sul, Leste e Oeste do estado de Mato Grosso. A determinação dos fungos foi realizada por meio da técnica de incubação em papel filtro (*Blotter test*), e a detecção e quantificação das aflatoxinas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Foram identificados os gêneros dos fungos *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Nigrospora*, *Epicocum*, *Rhizopus*, *Cercospora* e *Curvularia*. Os grãos de milho apresentaram contaminação fúngica principalmente por *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* em ambas as safras analisadas. Nas 84 amostras analisadas, a ocorrência de aflatoxinas foi evidenciada em 19,04% das amostras da safra 2009, e 23,80% da safra 2010 apresentaram contaminação cujos valores variaram de 1 µg/kg a 108,7 µg/kg.

Palavras-chave. patógenos, micotoxinas, sanidade.

ABSTRACT

Fungi contamination in corn kernels is responsible for causing a reduction in nutritional quality, besides it interferes with the commercial classification and poses a risk for food security. The objective of this study was identifying and quantifying the occurrence of fungi and determining the aflatoxins in corn kernels freshly harvested and stored. Eighty-four samples, corresponding to 2009 and 2010 crops, were collected from different municipalities located in the North, South, East and West regions of the State of Mato Grosso. The fungi were determined by incubation technique using blotter test on filter paper, and the aflatoxins detection and quantification were performed by high performance liquid chromatography (HPLC). Genera of fungi *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Nigrospora*, *Epicocum*, *Rhizopus*, *Curvularia*, and *Cercospora* were identified. The corn kernels of both crops were mainly contaminated with *Fusarium*, *Aspergillus* and *Penicillium*. In 84 samples, the occurrence of aflatoxins was evidenced in 19.04% of corns from 2009 crop, and 23.80% of samples of 2010 crop showed contamination ranging from 1 µg/kg to 108,7 µg/kg.

Keywords. pathogens, mycotoxins, health.

INTRODUÇÃO

Os grãos de milho podem ter sua qualidade comprometida direta ou indiretamente pela infecção fúngica e pela produção de micotoxinas, que ocasionam danos à saúde tanto humana quanto animal^{1,2}.

Geralmente, a infecção e a deterioração dos grãos podem ocorrer ainda no campo, agravando-se durante as operações de colheita, transporte, secagem, beneficiamento e armazenamento, resultando na redução da qualidade sanitária, física e nutricional dos grãos e seus derivados^{3,4}. Entre os prejuízos causados pelos fungos está o emboloramento visível, a descoloração, o odor desagradável, a perda de matéria seca, o aquecimento, as mudanças químicas e nutricionais, além da produção de compostos tóxicos, as micotoxinas^{3,5}. Essa contaminação pode fazer com que grãos tornem-se impróprios para o consumo humano e animal, resultando em grandes perdas econômicas.

Dentre os vários fungos responsáveis pela deterioração de grãos na pré-colheita e, depois, durante o armazenamento, destacam-se os do gênero *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. Esses fungos, além de causarem severos danos aos grãos, são conhecidos também pelo seu elevado potencial em produzir micotoxinas⁶.

As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos por fungos filamentosos, que, quando ingeridos, são prejudiciais à saúde humana e animal⁶⁻⁸, além de apresentarem elevada atividade mutagênica, carcinogênica e teratogênica^{9,10}.

Para a agricultura, já foram identificadas mais de quinhentas micotoxinas¹¹. Entretanto, as de maior importância são responsáveis pelos maiores índices de contaminação de grãos, sementes e outros alimentos, como: as aflatoxinas produzidas por fungos do gênero *Aspergillus*, como *A. flavus* e *A. parasiticus*; as ocratoxinas produzidas por algumas espécies do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*; e as fusariotoxinas, que possuem como principais representantes os tricotecenos, a zearalenona e as fumonisinas, produzidas por diversas espécies do gênero *Fusarium*^{4,11}.

Os fungos toxigênicos em alimentos, em particular de maior prevalência no milho, apontam a predominância dos fungos dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*^{2,6,12}. Os principais fatores que favorecem o crescimento desses micro-organismos em cereais armazenados são: alta umidade relativa do ar, teor de água do substrato e temperatura de armazenamento^{3,4,11}.

Com a abertura do mercado chinês e de outros mercados para importação de carne suína e de aves, com um controle de qualidade mais rígido pelas indústrias com a matéria-prima utilizada, pesquisas avaliando a contaminação fúngica e a produção de micotoxinas em grãos e alimentos são importantes para que sejam tomadas medidas para prevenção desta infecção, evitando riscos alimentares.

O presente trabalho teve por objetivo identificar e quantificar a incidência de fungos e verificar a ocorrência de aflatoxinas em grãos de milho armazenados, provenientes de diferentes municípios, localizados nas regiões Norte, Sul, Leste e Oeste do estado de Mato Grosso.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das Amostras

Foram avaliadas 84 amostras de grãos de milho, provenientes de unidades armazenadoras de diferentes municípios das regiões Norte, Sul, Leste e Oeste do estado de Mato Grosso, referente às safras 2009 e 2010. Essas unidades foram selecionadas por representarem a capacidade média estática de cada município.

O processo de amostragem foi baseado em normas estabelecidas pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) para grãos de milho armazenados a granel. Amostragens foram realizadas após as etapas de limpeza e secagem, quando os grãos já apresentavam o período de trinta dias de armazenamento, com o auxílio de um calador e em vários pontos da massa de grãos. As amostras coletadas, de 5,0 kg cada, foram homogeneizadas e divididas em frações de 1,0 kg, as quais foram acondicionadas em sacos de papel craft, identificadas e enviadas ao laboratório para análises posteriores. Essas amostras foram armazenadas em câmara fria, a $\pm 17^\circ\text{C}$ e 50% UR, durante todo o período de condução dos experimentos.

Todas as amostras, antes de serem armazenadas em câmara fria, já apresentavam teores de água considerados seguros para o armazenamento de grãos de milho, abaixo de 13%.

Identificação fúngica dos grãos de milho

A microbiota fúngica dos grãos foi determinada pelo teste de sanidade, pelo método de incubação em papel filtro (Blotter Test), segundo a metodologia proposta por Neergaard, modificada, com restrição

hídrica por Machado et al.¹³. Para cada amostra de milho, foram utilizadas 8 subamostras de 25 grãos. Esses grãos foram desinfestados superficialmente com hipoclorito de sódio a 2% por dois minutos e lavados em água destilada esterilizada. Em seguida, os grãos foram colocados de forma equidistantes em placas de Petri, contendo duas folhas de papel de filtro umedecidas com solução de cloreto de sódio (NaCl) a -1,0 MPa. As placas foram incubadas em temperatura de 22 ± 2 °C, por sete dias, em câmara de germinação. A identificação dos fungos foi realizada com auxílio de microscópios ótico e estereoscópico, e a quantificação de sua incidência foi expressa em porcentagem.

Os dados de quantificação dos fungos foram submetidos aos testes de Lilliefors ($p < 0,05$), para verificar se os valores seguiram a distribuição normal, e de Cochran e Bartlett ($p < 0,05$), para verificar a homogeneidade de variâncias. As médias foram submetidas a análise de variância e comparadas estatisticamente pelo teste de Scott & Knott ($p < 0,05$) utilizando o software SAEG 5.0.

Detecção e quantificação de aflatoxinas totais em grãos de milho

A extração e a quantificação das aflatoxinas (B_1 , B_2 , G_1 e G_2) foram feitas segundo Mallmann et al.¹⁴. As aflatoxinas foram quantificadas e identificadas pela metodologia automatizada de extração e purificação em fase sólida e de derivação com auxílio de um sistema automatizado de amostras (ASPEC XL) acoplado a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A extração foi realizada juntando-se 50 gramas de amostra moída com 100 mL de acetonitrila/água por 5 minutos em liquidificador a 13.600 rpm. Posteriormente, filtrou-se a solução em papel filtro nº 4 e fez-se a secagem de 5 mL com vácuo a 65 °C em tubo de ensaio. Rediluiu-se o substrato com 500 µL de acetonitrila/água (84:16 v/v), levando-o ao ASPEC XL programado para realizar a clarificação das amostras. A fase móvel foi composta de água/metanol/acetonitrila (77:21:2 v/v/v) com fluxo de 1 mL por minuto; a coluna cromatográfica RP C18 5 µm (150 × 4,6 mm) em temperatura constante de 45 °C e detecção sob fluorescência com comprimento de onda de 365 e 455 nm para excitação e emissão, respectivamente. O registro cromatográfico era computadorizado e integrado pelo programa Borwin. A identificação das toxinas foi realizada pelo tempo de retenção, e a quantificação, realizada pela área das toxinas. A eluição das aflatoxinas G_1 , B_1 , G_2 e B_2 ocorreu aos 5, 7, 12 e 17

minutos, com limites de quantificação de 0,7, 0,4, 1,3 e 0,4 µg/kg, e coeficiente de recuperação de 101,2%, 93,2%, 58,9% e 63,2%, respectivamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A identificação dos patógenos revelou uma porcentagem de grãos com incidência fúngica variando de 0% a 100%, em ambas as safras 2009 e 2010 (Figuras 1 e 2), prevalecendo *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* como gêneros mais importantes envolvidos na produção de micotoxinas.

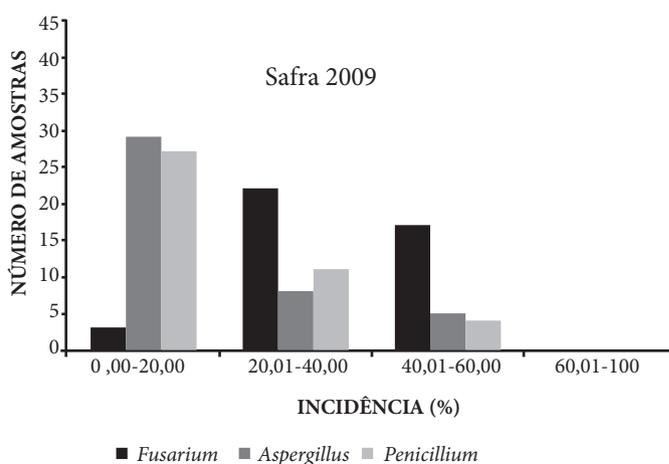


Figura 1. Incidência fúngica em 42 amostras de grãos de milho provenientes de diferentes municípios do estado de Mato Grosso, safra 2009.

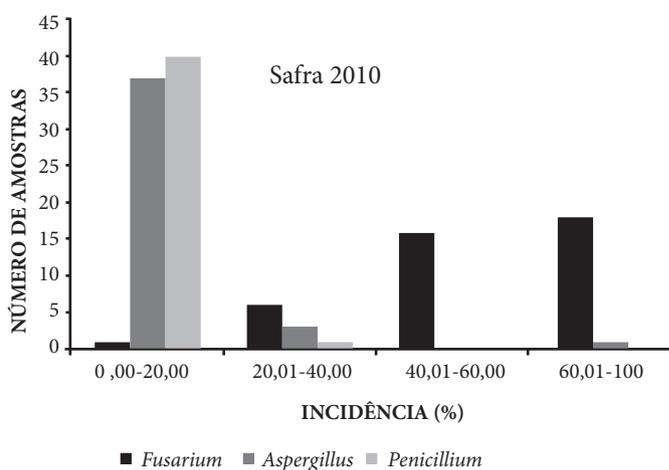


Figura 2. Incidência fúngica em 42 amostras de grãos de milho provenientes de diferentes municípios do estado de Mato Grosso, safra 2010.

Outros trabalhos avaliando a microbiota fúngica e espécies produtoras de micotoxinas em grãos de milho em diferentes regiões do Brasil apontaram a predominância dos mesmos gêneros^{5,15-19}. Os fatores abióticos, tais como o teor de umidade nos grãos de milho, a atividade de água, a precipitação e a temperatura do ar, foram determinantes para o nível da incidência fúngica.

Além da incidência de *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp., em menor proporção viu-se a incidência de fungos dos gêneros *Cladosporium*, *Nigrospora*, *Epicoccum*, *Rhizopus*, *Cercospora* e *Curvularia* nas amostras das safras 2009 e 2010.

De acordo com as Figuras 1 e 2, também pode-se notar uma variação na incidência entre os três gêneros de fungos. As análises dos grãos de milho das safras 2009 e 2010 evidenciaram que a incidência de *Aspergillus* e *Penicillium* ficou concentrada nas faixas de 0-20% e 20-40% de contaminação, respectivamente. Para *Fusarium*, a incidência ficou concentrada na faixa de 20-40% e 40-60% (safra 2009) e 40-60% e 60-100% (safra 2010), indicando um potencial de contaminação relativamente maior das amostras por este gênero.

O *Fusarium* é considerado um fungo de campo, que invade os grãos e sementes durante o amadurecimento, em que as condições de temperatura e umidade são mais elevadas, favoráveis para seu desenvolvimento. Entretanto, não se desenvolvem durante o armazenamento, exceto ocasionalmente em grãos de milho armazenados com alto teor de umidade e/ou que foram reumidificados²⁰. Como as amostras já apresentavam um teor de água considerado seguro para o armazenamento, a contaminação por *Fusarium* ocorreu ainda no campo, o que justifica a incidência desse gênero.

A maior incidência do gênero *Fusarium*, seguido de *Aspergillus* e *Penicillium*, em grãos de milho foi

evidenciada também em outras pesquisas^{5,15,19}, diferindo de outras investigações em que a ordem de incidência desses três gêneros e a proporção de contaminação verificadas foram outras, como demonstram os trabalhos de Adebajo et al.²¹, Asêvedo et al.²², Pozzi et al.²³ e Orsi et al.¹⁶.

Os fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são considerados fungos de armazenamento, que necessitam de teores de umidade entre 13% e 18%, sendo sua incidência pouco frequente durante o crescimento da planta no campo e nos grãos recém-colhidos^{3,4,24}. As amostras da safra 2009 e 2010 apresentaram contaminação por esses gêneros, sugerindo que os mesmos possam ter contaminado os grãos ainda no campo, já que as amostras armazenadas apresentavam teores de água desfavoráveis para seu desenvolvimento. A presença desses fungos são indicadores de deterioração de sementes e grãos, além da possibilidade de produção de micotoxinas^{25,26}.

A identificação de espécies fúngicas contaminantes é um importante sinalizador da presença de micotoxinas nos substratos e indica o caminho para prevenir sua produção²³, assim como para evitar riscos alimentares.

Aflatoxinas

Os resultados das análises de aflatoxinas (B₁+B₂+G₁+G₂) nas 84 amostras de grãos de milho das diferentes regiões do estado de Mato Grosso mostraram 21,4% de contaminação positiva para aflatoxinas (Tabela 1).

Na safra 2009, foi detectada a presença de aflatoxinas totais em 8,3% das amostras da região Norte, 25% da região Sul, 16,7% da região Leste e 33,33% da região Oeste. Os níveis de contaminação variaram de 1 a 12,2 µg/kg de aflatoxina B₁, de 1 a 1,1 µg/kg de aflatoxina B₂ e as aflatoxinas G₁ e G₂ não foram detectadas. Em todas as regiões, a soma dos níveis de aflatoxinas observadas

Tabela 1. Ocorrência de aflatoxinas em grãos de milho em municípios de diferentes regiões de Mato Grosso, safras 2009 e 2010

Região	Saфра	Nº amostras/ região	Nº amostras positivas	Ocorrência de aflatoxinas (µg/kg)			
				AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂
Norte	2009	12	1	12,2	ND	ND	ND
	2010	11	0	ND	ND	ND	ND
Sul	2009	12	3	2,7-3,8	1-1,1	ND	ND
	2010	11	0	ND	ND	ND	ND
Leste	2009	12	2	1	ND	ND	ND
	2010	10	7	8,3-84,1	1-4,6	4,8-22,6	1-1,8
Oeste	2009	6	2	1,9-4	ND	ND	ND
	2010	10	3	2,4-7,1	1	1-5,3	ND

ND = Não detectado

($B_1 + B_2 + G_1 + G_2$) ficou abaixo do limite oficial (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) permitido pelo Ministério da Saúde/Anvisa²⁷ e pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)²⁸ para alimentos destinados ao consumo humano. Esse limite é comparável aos estabelecidos por outros países e recomendado pela Organização para Alimentação e Agricultura²⁹.

Na safra 2010, não foi detectada presença de aflatoxinas totais nas amostras das regiões Norte e Sul. Na região Oeste, 30% das amostras apresentaram aflatoxinas totais com baixos níveis de contaminação. No entanto, na região Leste, 58,33% das amostras apresentou ocorrência de aflatoxinas, em níveis que ultrapassaram de forma significativa o limite máximo permitido pela legislação (Tabela 1).

No Brasil, outros trabalhos também relataram a ocorrência de aflatoxinas em milho e seus derivados, com porcentagens de contaminação variáveis de 1,5% a 100% e níveis de 0,1 a 1.500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ³⁰⁻³³, embora resultados de outras pesquisas não tenham evidenciado a presença destas toxinas, mesmo quando era observado o crescimento de fungos toxigênicos^{15,24,34}.

Dos diferentes fatores que podem influenciar o crescimento de fungos toxigênicos e a produção de aflatoxinas, a umidade relativa, a temperatura e o teor de água são reportados como os principais^{3,4,15}. Considerando-se que os grãos de milho analisados encontravam-se com teores de água definidos como seguros para o armazenamento após etapas de beneficiamento, a incidência do fungo aflatoxigênico e a produção de aflatoxinas nos grãos de milho ocorreram devido a infecção no campo.

Esse fato foi constatado por Cortês et al.³⁵, quando 28,57% das amostras de milho retiradas de lavouras do estado de Mato Grosso apresentavam nível médio de aflatoxinas de 12,35 $\mu\text{g}/\text{kg}$, indicando que o milho no ponto de colheita já apresentava contaminação por aflatoxinas. Ramos et al.³⁶ avaliaram a ocorrência natural das aflatoxinas (B_1 , B_2 , G_1 e G_2) em grãos de milho do estado de Goiás (Jataí, Montividiu e Goiânia) e verificaram que os grãos já apresentavam aflatoxinas em níveis de 0 a 277,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de B_1 , de 0 a 14 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de B_2 , de 0 a 34,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de G_1 , e não foi detectada a aflatoxina G_2 . Marques et al.¹⁹ analisaram a incidência de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* e as contaminações com micotoxinas em grãos de cinco híbridos comerciais de milho em função da umidade de colheita, e observaram que a produção de aflatoxinas

ocorreu em grãos ainda nas espigas, no campo, devido a condições ambientais favoráveis aos patógenos.

Com a abertura de novos mercados para exportação e produção de alimentos, a preocupação com riscos alimentares e com o desenvolvimento de patologias, a qualidade sanitária da matéria-prima produzida – como exemplo, o milho – torna-se prioritária e necessária.

CONCLUSÃO

Grãos de milho com boa condição física também podem apresentar contaminação por fungos de potencial toxigênico.

A contaminação dos grãos foi devida principalmente aos fungos dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*.

A presença do fungo aflatoxigênico e a produção de aflatoxinas ocorreram a partir da infecção dos grãos de milho em condições de campo.

Os níveis de contaminação das amostras pela aflatoxina B_1 foram maiores em relação às aflatoxinas B_2 , G_1 e G_2 .

As amostras da região Leste safra 2010 apresentaram níveis de contaminação acima do limite oficial (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) permitido pelo Ministério da Saúde/Anvisa e o MAPA.

AGRADECIMENTOS

À Associação dos Produtores de Soja e Milho do Estado de Mato Grosso (Aprosoja), pela concessão de auxílio financeiro à pesquisa.

À CAPES, pela concessão de bolsa de fomento.

REFERÊNCIAS

1. Farias AX, Robb CF, Bittencourt AM, Andersen PM, Corrêa TB. Contaminação endógena por *Aspergillus* spp. em milho pós-colheita no estado do Paraná. *Pesq Agropec Bras*. 2000;35(3):617-21.
2. Kumar V, Basua MS, Rajendranb TP. Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. *Crop Protec*. 2008;27:891-905.
3. Lazzari FA. Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações. 2. ed. Curitiba: edição do autor; 1997.
4. Scussel VM. Micotoxinas em alimentos. Florianópolis: Insular; 1998.
5. Almeida AP, Correa B, Mallozzi MAB, Sawazaki E, Soares LMV. Mycoflora and aflatoxin/fumonisin production by fungal isolates from freshly harvested corn hybrids. *Braz J Microbiol*. 2000;31(4):321-6.

6. Sweeney MJ, Dobson ADW. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *Int J Food Microbiol*. 1998;43:141-58.
7. Shotwell OL, Hesseltine CW, Stubblefield RD, Crenson WG. Production of aflatoxin on rice. *App Microbiol*. 1966;14(3):425-8.
8. Diener UL, Cole RJ, Sanders TH, Payne GA, Lee LS, Klich MA. Epidemiology of aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. *Ann Rev Phytopathol*. 1987;25:249-70.
9. International Agency on Research on Cancer (IARC). Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon: IARC; 1993. v. 56.
10. Wangikar PB, Dwivedi P, Sinha N, Sharma AK, Telang AG. Effects of aflatoxin B1 on embryo fetal development in rabbits. *Food Chem Toxicol*. 2005;43:607-15.
11. Mallmann CA, Dilkin P. Micotoxinas e micotoxicoses em suínos. Santa Maria: edição do autor; 2007.
12. Kawashima LM, Soares LMV. Incidência de fumonisina B1, aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, ocratoxina A e zearalenona em produtos de milho. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2006;26(3):516-21.
13. Machado JC, Oliveira JA, Vieira MGGC, Alves MC. Controle da germinação de sementes de soja em testes de sanidade pelo uso da restrição hídrica. *Rev Bras Sementes*. 2003;25(2):77-81.
14. Mallmann CA, Almeida CAA, Mostardeiro C. Automation of the analytical procedure for simultaneous determination of aflatoxins AFB1, AFB2, AFG1 and AFB2. *In: Congresso Internacional de Micotoxinas e Ficotoxinas*, 2000. São Paulo.
15. Dilkin P, Mallmann CA, Santurio JM, Hickmannet JL. Classificação macroscópica, identificação da microbiota fúngica e produção de aflatoxinas em híbridos de milho. *Ciênc Rural*. 2000;30(1):137-41.
16. Orsi RB, Correa B, Possi CR, Schammas EA, Nogueira JR, Dias SMC et al. Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize. *J Stor Prod Res*. 2000;36:75-87.
17. Tanaka MAS, Maeda JA, Plaza IHAZ. Microflora fúngica de sementes de milho em ambientes de armazenamento. *Sci Agric*. 2001;58(3):501-8.
18. Santin JA, Reis EM, Matsumura ATS, Moraes MG. Efeito do retardamento da colheita de milho na incidência de grãos ardidos e de fungos patogênicos. *Rev Bras Milho e Sorgo*. 2004;3(2):182-92.
19. Marques OJ, Vidigal-Filho PS, Dalpasquale VA, Scapim CA, Pricinotto LF, Machinski M. Incidência fúngica e contaminações por micotoxinas em grãos de híbridos comerciais de milho em função da umidade de colheita. *Act Scient Agro*. 2009;31(4):667-75.
20. Márcia BA, Lazzari FA. Monitoramento de fungos em milho em grão, grits e fubá. *Ciênc Tecnol Aliment*. 1998;18(4):363-7.
21. Adebajo LO, Idowu AA, Adesanya OO. Mycoflora and mycotoxins production in Nigerian corn and corn-based snacks. *Mycopathol*. 1994;126:183-92.
22. Asevédo IG, Gambale W, Corrêa B. Mycoflora and aflatoxigenic species of *Aspergillus* spp. isolated from stored maize. *Rev Microbiol*. 1994;25(1):46-50.
23. Pozzi CR, Corrêa B, Gambale W, Paula CR, Chacon-Reche NO, Meirelles MCA. Post-harvest and stored corn in Brazil: mycoflora interaction, abiotic factors and mycotoxins occurrence. *Food Addit Contam*. 1995;12:313-9.
24. Pezzini V, Valduga E, Cansinai RL. Incidência de fungos e micotoxinas em grãos de milho armazenados sob diferentes condições. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2005;64(1):91-6.
25. Miller JD. Fungi and Mycotoxins in Grain: Implications for Stored Product Research. *J Stor Prod. Res*. 1995;31:1-16.
26. Cruz JC, Karam D, Monteiro MAR, Magalhaes PC. A cultura do milho. 1ª ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo; 2008.
27. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. *Diário Oficial [da] União*. Brasília, 9 mar 2011. Seção I, p. 66.
28. Brasil. Ministério da Agricultura do Abastecimento e da Reforma Agrária. Portaria n. 183, de 21 de março de 1996. Adota Regulamento Técnico do Mercosul sobre limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, amendoim e milho, aprovado pela Resolução do Grupo Mercado Comum do Sul n. 56/94. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, 25 mar 1996, Seção I, p. 4929.
29. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Regulamentos a nível mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones en el año 2003. Disponível em: [<http://www.fao.org/docrep/007/y5499s/y5499s00.HTM>].
30. Caldas ED, Silva SC, Oliveira JN. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. *Rev Saúde Pública*. 2002;36(3):319-23.
31. Piedade FS, Fonseca H, Gloria EM, Domingues MAC, Piedade SMS, Barbin D. Distribution of aflatoxins in corn fractions visually segregated for defects. *Braz J Microbiol*. 2002;33:250-4.
32. Gloria EM, Ciacco CF, Lopes JF, Ericsson C, Zochi SS. Distribution of aflatoxin contamination in maize samples. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2004;24(1):79-83.
33. Sekiyama BL, Ribeiro AB, Machinski PA, Machinski M. Aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in maize-based food products. *Braz J Microbiol*. 2005;36(3):289-94.
34. Nicácio MAS, Prado G, Linardi VR. Determinação de aflatoxina e identificação da microbiota fúngica em milho (*Zea mays*) pós-colheita. *Rev Arq Inst Biol*. 1995;38(3):851-7.
35. Cortes NA, Cassetari Neto D, Correa B. Ocorrência de aflatoxinas em milho produzido pelo sistema tradicional de cultivo, em comunidades de agricultura familiar, no estado de Mato Grosso. *Hig Alimentar*. 2000;14(77):16-25.
36. Ramos CRBA, Brasil EM, Geraldine RM. Contaminação por aflatoxinas em híbridos de milho cultivados em três regiões do estado de Goiás. *Pesq Agropec Tropic*. 2008;38(2):95-102.

Seleção de fungos isolados do ambiente com atividade lipolítica

Isolation and selection of lipolytic enzymes-producing fungi

RIALA6/1432

Michelle Cardoso COIMBRA^{1*}, Thiago Okubo Procópio PINTO¹, Vinicius D'ARCADIA CRUZ², Pedro de OLIVA NETO²

*Endereço para correspondência: ¹Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, SP, CEP 15054-000, Brasil. Tel.: (17) 3221-2200. E-mail: mi_ccoimbra@yahoo.com.br

² Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Assis, SP, Brasil

Recebido: 15.02.2011 - Aceito para publicação: 16.02.2012

RESUMO

Neste estudo, foram isolados e selecionados os micro-organismos produtores de enzimas lipolíticas, e foi avaliada sua ação sobre diferentes substratos. A enzima foi produzida pela fermentação semissólida com farelo de trigo a 50% de umidade e 120 horas de incubação a 35 °C. A atividade da lipase foi medida por titulação utilizando-se um sistema de reação composto por 4 mL de tampão acetato 50 mM, pH 5,6, 1 g de substrato e 1 mL de extrato bruto enzimático. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de ácido graxo. Os substratos testados foram creme de leite, óleo de soja e gordura de coco. Foram isoladas 33 linhagens de fungos, separadas em quatro grupos (A, B, C e D) de acordo com extratos enzimáticos. Os fungos do grupo C apresentaram os maiores valores para atividade lipolítica, sendo de 10,41 e 9,49 µmol/mL no creme de leite; 8,96 e 7,51 µmol/mL no óleo de soja; e 8,52 e 8,14 µmol/mL na gordura de coco. A técnica empregada neste trabalho foi eficiente para efetuar o isolamento de fungos filamentosos com elevada atividade lipolítica. O estudo das linhagens de fungos será relevante para possíveis aplicações biotecnológicas.

Palavras-chave. lipases, fungos, fermentação em estado sólido.

ABSTRACT

This study aims at isolating and selecting the lipolytic enzymes-producing microorganisms, and at assessing its effect on different substrates. The enzyme production was performed by solid state fermentation with wheat bran for 120 hours of incubation at 35 °C and 50% moisture. The lipase activity was measured by titration using a reaction system consisted of 4 mL of 50 mM acetate buffer, pH 5.6, 1 g of substrate and 1 mL of crude enzyme extract. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme required to liberate 1 µmole of fatty acid. The substrates were dairy cream, soybean oil and coconut fat. Thirty-three fungi strains were isolated, which were separated into four groups (A, B, C and D) according to enzymatic extracts. The group C showed the highest values for lipase activity, which were 10.41 and 9.49 µmole/mL in dairy cream, 8.96 and 7.51 µmole/mL in soybean oil and 8.52 and 8.14 µmole/mL in coconut fat. The assay employed in this study showed to be an effective technique for isolating filamentous fungi with high lipolytic activity. Study on fungi lineages and isolates will be crucial for biotechnology purposes.

Keywords. fungi, lipases, solid state fermentation.

INTRODUÇÃO

As lipases (glicerol éster hidrolases, E.C. 3.1.1.3) são enzimas hidrolíticas que atuam na interface orgânica aquosa catalisando as reações de hidrólise de triacilglicerídeos, resultando na formação de diacilglicerídeos, moacilglicerídeos, ácidos graxos e glicerol¹. No entanto, dependendo das condições reacionais, como baixa concentração de água, as lipases podem também catalisar a síntese de mono, di ou triacilgliceróis a partir de ácidos graxos e glicerol². Muitas lipases são ativas em presença de solventes orgânicos, onde elas catalisam um grande número de reações, incluindo esterificação, transesterificação, acilação regioseletiva de glicóis e mentóis e síntese de peptídeos³.

As lipases são consideradas excelentes biocatalisadores em numerosos processos industriais nas mais diversas áreas, tais como alimentos, processos farmacêuticos, formulação de detergentes, oleoquímica, agroquímica, cosméticos, manufatura de papéis, couro, entre outras. Ainda podem ser ferramentas úteis na fabricação de biossensores para utilização em análises clínicas, análises de alimentos, análises químicas, de contaminação ou poluição de ambientes. Além disso, as lipases têm sido utilizadas em terapias enzimáticas e tratamento de dejetos, efluentes e esgoto⁴.

Nos últimos anos, as lipases têm assumido um lugar de destaque no mercado de enzimas, evidenciado pelo aumento da quantidade de informações relatadas na literatura, que atinge uma média de mil publicações por ano. Após proteases e amilases, as lipases são consideradas o terceiro grande grupo em volume de vendas, movimentando bilhões de dólares. O mercado mundial de enzimas aumentou de forma estável, de US\$ 1,0 bilhão em 1995 para US\$ 1,5 bilhões em 2000 e para US\$ 2,2 bilhões em 2006. Uma pesquisa da BBC estimou que a venda global chegaria a US\$ 2,7 bilhões no final de 2012⁵. Tal fato deve-se principalmente a sua versatilidade de aplicações, que as torna especialmente atraentes em aplicações industriais⁶.

As lipases são largamente encontradas na natureza em animais, plantas e micro-organismos. As lipases microbianas são mais utilizadas industrialmente, por apresentarem uma série de vantagens em comparação com as de origem animal e vegetal, uma vez que são enzimas extracelulares em sua grande maioria: são facilmente separadas do micélio por filtração ou centrifugação, o processo pode ser facilmente conduzido, possuem alta velocidade de síntese e alto rendimento

de conversão de substrato em produto⁷. Além disso, são enzimas termoestáveis e apresentam versatilidade e simplicidade na manipulação ambiental e genética de sua capacidade produtiva¹.

No caso da produção de lipases por fermentação em estado sólido (FES), a utilização de resíduos agroindustriais como suporte para o desenvolvimento do micro-organismo pode ainda reduzir os custos de operação⁸. A seleção de um suporte adequado para a FES é essencial para o bom desempenho do processo. O uso de resíduos agroindustriais, além de representar fontes alternativas, ajuda a minimizar problemas ambientais causados por sua deposição⁹.

Embora os estudos científicos tenham se concentrado mais na aplicação destas enzimas, alguns grupos de pesquisa se dedicam também ao isolamento de micro-organismos produtores de lipases, em busca de novas enzimas com diferentes especificidades de substrato¹⁰.

Hoje, conhece-se um grande número de micro-organismos produtores de lipases, entretanto os micro-organismos conhecidos são um percentual ainda muito baixo da biodiversidade estimada como potencialmente produtora de enzimas em geral e que ainda não foi caracterizada: de 0,2% a 0,6% de bactérias e aproximadamente 5% para fungos. Um método útil para obter novos biocatalisadores é o isolamento de micro-organismos de fontes naturais, seguido de testes de rastreio para identificar a capacidade enzimática desejada, e seleção das melhores performances¹¹.

O presente trabalho teve como objetivo isolar e selecionar micro-organismos produtores de enzimas lipolíticas, bem como avaliar sua ação sobre diferentes substratos: creme de leite de origem bovina, óleo de soja e gordura de coco.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolamento dos micro-organismos

A coleção fúngica foi obtida distribuindo-se, por vários pontos da cidade de Assis, estado de São Paulo, Brasil, amostras de tecido de algodão embebidas em diferentes substratos obtidos no comércio local: creme de leite da marca Líder ou óleo de soja da marca Soya. Após um mês, os micro-organismos que cresceram em cada tecido foram isolados em placas de Petri contendo o meio ágar batata dextrosado (PDA) pela técnica de esgotamento por estrias e incubados a 25 °C por 48 horas.

As diferentes colônias de fungos isoladas em cada placa de Petri foram repicadas em tubos contendo o meio PDA e, após um período de incubação de 72 horas a 25 °C, armazenadas em geladeira a 5 °C para formação da coleção de cultura, na qual cada micro-organismo foi identificado por duas letras iniciais (MM) e um número. A coleção de cultura foi mensalmente repicada em tubos inclinados para a manutenção das colônias.

Preparação do extrato enzimático bruto de lipase

O extrato bruto foi preparado por fermentação semissólida, inoculando-se 1 mL de suspensão de esporos, obtida por adição de 5 mL de água estéril às culturas de cada fungo da coleção de cultura, em um balão de Erlenmeyer de 500 mL contendo meio composto por farelo de trigo com 50% de umidade, previamente esterilizado em autoclave a 121 °C e pressão de 1 atm por 15 minutos. A inoculação foi feita em duplicata. Findo o tempo de incubação de 120 horas a 37 °C, o meio recebeu 200 mL de água destilada e foi agitado por 30 minutos de modo suave, para evitar a inativação da enzima. Após a agitação, o extrato foi filtrado a vácuo em papel Whatman n. 1 e utilizado como fonte de enzima¹².

Determinação da atividade enzimática da lipase

A atividade da lipase foi medida utilizando-se um sistema de reação composto por 4 mL de tampão em acetato 50 mM, pH 5,6, 1 g de substrato (óleo de soja, gordura de coco ou creme de leite) e 1 mL de extrato bruto enzimático. A mistura foi incubada em balão de Erlenmeyer de 100 mL e mantida a 30 °C por 60 minutos a 130 rpm. As análises para cada extrato enzimático/substrato foram feitas em duplicatas.

A reação foi paralisada pela adição de 15 mL de solução de acetona-etanol 1:1 (v/v), e os ácidos graxos liberados foram titulados contra solução KOH 0,05 N, utilizando-se fenolftaleína como indicador. Foi utilizado como branco a mistura de reação em tempo zero.

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de ácido graxo nas condições de ensaio. O cálculo da atividade enzimática da lipase no substrato óleo de soja foi feito a partir de uma curva-padrão de ácido oleico *versus* mililitros de KOH 0,05 N. No substrato creme de leite, foi determinada uma curva-padrão de ácido caproico titulada contra KOH 0,05 N; e, para o substrato gordura de coco, foi utilizada curva-padrão de ácido láurico titulada contra KOH 0,05 N¹³.

Determinação do teor de proteína

A determinação da concentração de proteína nos extratos enzimáticos brutos obtidos foi feita pela análise de micro-Kjeldahl, segundo método 13.011 da AOAC¹⁴, que se baseia na determinação do nitrogênio total (NT).

Tratamento estatístico

Os resultados foram obtidos em duplicatas, e as médias dos valores da atividade enzimática dos diversos extratos enzimáticos foram comparadas pela análise estatística multivariada de agrupamento, “Cluster analysis”, separando os extratos em grupos homogêneos. Posteriormente, foi feita uma comparação dos grupos por substrato, utilizando análise gráfica por Box-plot, a fim de se descobrir quais são os extratos enzimáticos que possuem melhor atuação em um maior número de substratos¹⁵. Para realização das análises, foi utilizado o software estatístico Minitab v. 14.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isoladas 33 linhagens de fungos, de diversos pontos da cidade de Assis, que formaram a coleção fúngica estudada no presente trabalho. Esses micro-organismos foram testados quanto à capacidade de hidrolisar creme de leite, óleo de soja e gordura de coco, pela produção de lipase extracelular.

Extratos de todas as linhagens estudadas apresentaram atividade lipolítica frente aos substratos avaliados, o que se deve ao fato de os fungos terem sido isolados de meios ricos em gordura, exigindo que o micro-organismo produzisse a enzima lipase para sua multiplicação. Dessa forma, o próprio meio de isolamento funcionou como uma pré-seleção de linhagens fúngicas dotadas de metabolismo capaz de sintetizar enzimas lipolíticas.

Os diversos extratos enzimáticos foram comparados pela análise estatística multivariada de agrupamento, “Cluster Analysis”, separando os extratos em grupos homogêneos de ação enzimática semelhante. Para realizar a análise de agrupamentos, foram realizados os algoritmos de Ward (Figura 1) e “Complete Linkage”. Em ambos os resultados, as linhagens fúngicas foram reunidas em quatro grupos, mostrando estabilidade na análise. Para comprovar a eficácia dos agrupamentos, foram realizados a análise de variância e o teste de Tukey ao nível de 5%, que confirmaram a diferença entre os quatro grupos de fungos.

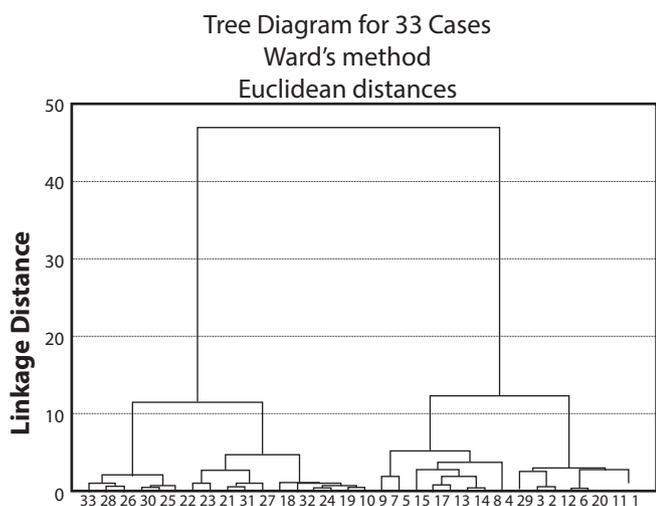


Figura 1. Algoritmo de Ward para análise de agrupamentos

De acordo com a Figura 1, as 33 linhagens fúngicas estudadas foram separadas em quatro grupos homogêneos, que são mostrados a seguir:

- Grupo A: MM 22, MM 25, MM 26, MM 28, MM 30, MM 33.
- Grupo B: MM 9, MM 10, MM 16, MM 18, MM 19, MM 21, MM 24, MM 23, MM 27, MM 31, MM 32.
- Grupo C: MM 4, MM 5, MM 7, MM 8, MM 13, MM 14, MM 15, MM 17.
- Grupo D: MM 1, MM 2, MM 3, MM 6, MM 11, MM 12, MM 20, MM 29.

Após a análise de agrupamentos, foi confeccionado o gráfico Box-plot (Figura 2) para caracterizar os quatro grupos de acordo com a atividade enzimática de cada um, mostrando quais extratos possuem melhor atuação nos substratos.

Como pode ser observado na Figura 2, o grupo C apresenta extratos enzimáticos com maior atividade de lipase em todos os substratos, seguido dos grupos D e B. O grupo A é formado por fungos que apresentaram atividade enzimática mais baixa, também em todos os substratos analisados. Pelo gráfico, também é possível inferir que, nos diferentes grupos, as lipases produzidas pelas linhagens fúngicas apresentaram maior especificidade frente ao substrato creme de leite e menor especificidade com o substrato gordura de coco.

A Tabela 1 apresenta a análise de variância e o teste de Tukey ao nível de significância de 5% para as médias das atividades enzimáticas correspondentes a cada um dos quatro grupos listados anteriormente.

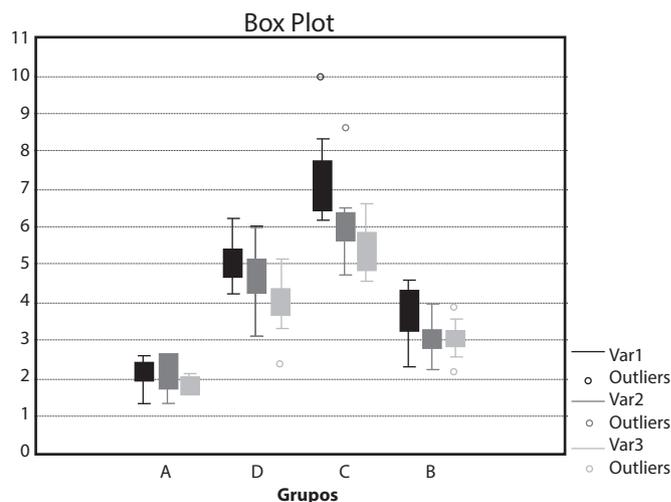


Figura 2. Gráfico Box-plot das médias das atividades enzimáticas das linhagens fúngicas (Var 1 – Creme de leite; Var 2 – Óleo de soja; Var 3 – Gordura de coco)

Tabela 1. Médias das atividades enzimáticas dos grupos A, B, C e D de linhagens fúngicas isoladas em Assis, SP

Grupo	Creme de leite		Óleo de soja		Gordura de coco	
	Média	Desvio-padrão	Média	Desvio-padrão	Média	Desvio-padrão
A	2,10 ^e	0,44	2,1 ^e	0,53	1,78 ^e	0,24
B	2,85 ^f	0,83	3,04 ^e	0,44	2,98 ^f	0,51
C	7,28 ^g	1,27	6,22 ^f	1,13	5,38 ^g	0,72
D	5,23 ^h	0,70	4,88 ^g	0,69	4,20 ^h	0,59

e, f, g, h – em cada substrato, médias de atividade enzimática seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os dados da tabela confirmam que o grupo C apresentou maior atividade enzimática frente a todos os substratos, porém a ação lipolítica desses fungos é a menos homogênea entre todos os grupos, uma vez que os desvios-padrões das médias do grupo C têm os valores mais altos. O grupo de ação enzimática mais homogênea foi o A, como se pode verificar pelos desvios-padrões com os valores mais baixos. As médias mostradas na Tabela 1 também confirmam que o grupo A teve a menor ação lipolítica frente a todos os substratos.

Para determinar o teor de proteínas do extrato bruto, foram selecionadas, dentro do grupo C, as duas linhagens fúngicas que se mostraram mais eficientes na produção de enzimas lipolíticas específicas para cada substrato. Sendo assim, os fungos testados para o substrato creme de leite foram o MM 7 e MM 5; para

o óleo de soja, os fungos MM 4 e MM 13; por fim, para gordura de coco, os fungos MM 15 e MM 17.

Os fungos mais eficientes na hidrólise do creme de leite tiveram sua origem de seleção em tecido contendo o substrato creme de leite. Já os fungos que apresentaram maior atividade lipolítica no óleo de soja foram isolados de tecido contendo óleo de soja. O substrato gordura de coco não foi utilizado para o isolamento de micro-organismos no presente projeto, fato que possivelmente explica a menor atuação desses fungos na hidrólise da gordura de coco. Os fungos MM5, MM7, MM15 e MM 17 foram isolados do substrato creme de leite, e os fungos MM 4 e MM 13, do substrato óleo de soja.

Como demonstra a Tabela 2, os fungos selecionados mantiveram, na nova fermentação, a mesma atividade enzimática observada na primeira etapa do projeto, mostrando-se realmente eficazes na hidrólise dos substratos creme de leite, óleo de soja e gordura de coco.

Tabela 2. Determinação da atividade enzimática das linhagens fúngicas selecionadas em novo processo de fermentação

Substratos	Fungos	Repetições	µmol/mL	Média	Desvio-padrão
Creme de leite	MM 5	a	9,16	9,49	0,47
		b	9,83		
	MM 7	a	9,99	10,41	0,59
		b	10,83		
Óleo de Soja	MM 4	a	8,78	8,96	0,26
		b	9,15		
	MM 13	a	7,51	7,51	0,00
		b	7,51		
Gordura de coco	MM 15	a	8,52	8,52	0,00
		b	8,52		
	MM 17	a	8,07	8,14	0,11
		b	8,22		

Em estudo sobre produção de lipase por *Aspergillus* spp. realizado por Costa¹², a atividade enzimática do extrato bruto quanto ao substrato óleo de oliva foi de 8,4 µmol/mL e, quanto ao substrato gordura de coco, de 13,8 µmol/mL. Cruz¹³ avaliou a ação da linhagem *Aspergillus* spp. n. 1.068 em creme de leite de vaca, obtendo atividade enzimática frente a esse substrato de 8,16 µmol/mL. Em ambos os estudos, os valores encontrados foram semelhantes aos elucidados no presente trabalho.

A produção de lipase por *Geotrichum candidum* tem sido amplamente relatada na literatura, dada sua

especificidade de hidrólise de acilgliceróis contendo ácidos graxos de cadeia longa com dupla ligação na posição 9¹⁶. O valor relatado para o extrato bruto de uma cepa de *Geotrichum* spp. foi de 6,22 U/mL, após fermentação em meio líquido composto de farinha de soja e trigo em pó como fontes de carbono e extrato de levedura e NH₄NO₃ (nitrato de amônio) como fonte de nitrogênio¹⁷. Todos os extratos enzimáticos brutos selecionados neste trabalho apresentaram ação lipolítica superior, com melhor eficiência na hidrólise de gorduras.

Determinação do teor de proteína

O teor de proteínas totais presentes nos extratos enzimáticos brutos das linhagens selecionadas foi determinado pelo método de micro-Kjeldahl. A partir desses dados, também foi possível calcular a atividade específica da enzima. Os valores de proteína bruta e a atividade específica da enzima estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Determinação do teor de proteínas totais e atividade específica dos extratos enzimáticos brutos

Fungos	Repetições	Proteína (%)	Média	Desvio-padrão	Atividade específica (U/mg)
MM 5	a	1,37	1,58	0,30	0,60
	b	1,79			
MM 7	a	1,88	1,84	0,06	0,56
	b	1,79			
MM 4	a	1,31	1,60	0,40	0,56
	b	1,88			
MM 13	a	1,76	1,62	0,21	0,46
	b	1,47			
MM 15	a	1,67	1,71	0,05	0,50
	b	1,74			
MM 17	a	1,83	1,87	0,05	0,43
	b	1,90			

A partir da Tabela 3, é possível observar que o teor de proteínas presentes nos extratos enzimáticos brutos não variou muito de um fungo para outro. A média de todos os extratos foi de 1,7 % de proteínas brutas, com pequeno desvio-padrão de 0,12. Essa média é semelhante à encontrada por Pastore et al.¹⁰ em seu estudo sobre a produção de lipase por *Rhizopus* spp. – o teor de proteínas no extrato enzimático bruto apontado neste trabalho foi de 2,3 %.

Quanto aos dados de atividade específica da lipase, pode-se observar na Tabela 3 que os valores

obtidos por todos os fungos foram próximos, sendo que o melhor resultado foi o da linhagem MM 5, com atividade específica de 0,6 U/mg. Esse valor é superior ao encontrado por Carvalho et al.¹⁸, que avaliaram lipases obtidas de cepas fúngicas após 72 horas de fermentação em meio de cultivo líquido, e as maiores atividades específicas foram de 0,56 U/mg, 0,42 U/mg e 0,33 U/mg.

CONCLUSÃO

O isolamento de fungos filamentosos com elevada atividade lipolítica pode ser feito utilizando-se a técnica empregada neste trabalho, fato comprovado pela eficiência do resultado de seleção e pela relevância da especificidade do substrato utilizado como fonte de nutrientes no isolamento dos micro-organismos, uma vez que os fungos selecionados em um tipo específico de substrato apresentaram maior especificidade para a hidrólise do tipo de gordura constituinte deste mesmo substrato.

A pesquisa permitirá o estudo das linhagens isoladas para possíveis aplicações biotecnológicas em reações de esterificação, transesterificação e interesterificação de óleos e gorduras.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fapesp pela concessão de bolsa de iniciação científica.

REFERÊNCIAS

1. Sharma R, Chisti Y, Banerjee UC. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol Adv*. 2001;19:627-62.
2. Maia MMD, Heasley A, Morais MMC, Melo EHM, Morais Junior MA, Ledingham WM, et al. Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. *Biores Technol*. 2001;76:23-7.
3. Zhang J, Hau Z, Yao C, Yu Y. Purification and properties of a lipase from a *Bacillus* strain for catalytic resolution of (R)-Naproxen. *J Mol Catalysis B Enzymatic*. 2002;18:205-14.
4. Sun SY, Xu Y, Wang D. Novel minor lipase from *Rhizopus chinensis* during solid-state fermentation: Biochemical characterization and its esterification potential for ester synthesis. *Biores Technol*. 2009;100:2607-12.
5. BBC Research. [acesso 2010 out 21]. Disponível em: [www.bccresearch.com/report/BIO030E.html. 2010].
6. Hasan F, Shah AA, Hameed A. Industrial applications of microbial lipases. *Enz Microb Technol*. 2006;39(2):235-51.
7. Leal MCMR. Utilização de enzimas hidrolíticas no tratamento de resíduos da indústria de laticínios [dissertação de mestrado]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2000.
8. Dominguez A, Costas M, Longo MA, Sanromán A. A novel application of solid state culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica*. *Biotech Letters*. 2003;25:1225-9.
9. Kalogeris E, Iniotaki F, Topakas E, Christakopoulos P, Kekos D, Macris BJ. Performance of an intermittent agitation rotating drum-type bioreactor for solid-state fermentation of wheat straw. *Biores Technol*. 2003;86:207-13.
10. Pastore GM, Costa VSR, Koblitz MGB. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus spp*. *Cienc Tecnol Aliment*. 2003;23:135-40.
11. Schäfer T, Borchert TW, Nielsen VS, Skagerlind P, Gibson K, Wenger K, et al. Industrial enzymes. *Adv Biochem Engin Biotechnol*. 2007;105:59-131.
12. Costa MC. Produção, purificação e caracterização de lipase de *Aspergillus spp*. [dissertação de mestrado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 1996.
13. Cruz VA. Produção biotecnológica de metilcetonas por *Aspergillus spp*. e caracterização do processo fermentativo. [dissertação de mestrado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2001.
14. AOAC. Official methods of analysis of the AOAC International. Washington; 1984.
15. Frei F. Introdução à análise de agrupamentos: teoria e prática. São Paulo: Editora da Unesp; 2006.
16. Sugihara A, Shimada Y, Nakamura M, Nagao T, Tominaga Y. Positional and fatty acid specificities of *Geotrichum candidum* lipase. *Protein Eng*. 1994;7:585-8.
17. Macedo GA, Park YK, Pastore GM. Partial purification and characterization of an extracellular lipase from a newly isolated strain of *Geotrichum spp*. *Rev Microbiol*. 1997;28(2):90-5.
18. Carvalho PO, Calafatti AS, Marassi M, Silva DM, Contesini FJ, Bizaco R. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. *Quim Nova*. 2005;28(4):614-21.

Avaliação da eficácia da água sanitária na sanitização de alfaces (*Lactuca sativa*)

Evaluation of the efficacy of sodium hypochlorite in sanitization of lettuce (*Lactuca sativa*)

RIALA6/1433

Hugo de Sousa SANTOS¹, Maria Christina Sanches MURATORI², Ana Luísa Alves MARQUES³, Verbena Carvalho ALVES³, Francisco das Chagas CARDOSO FILHO⁴, Amilton Paulo Raposo COSTA², Maria Marlúcia Gomes PEREIRA², Carlos Alberto da Rocha ROSA⁵

*Endereço para correspondência: ²Departamento de Morfofisiologia Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí. Campus de Socopo, CEP 64049-350, Teresina, PI. E-mail: chrismuratori@uol.com.br.

¹Núcleo de Estudos, Pesquisa e Processamento de Alimentos (NUEPPA), Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí.

³Curso de Medicina Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí.

⁴Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí.

⁵Núcleo de Micotoxicologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Recebido: 10.11.2010 - Aceito para publicação: 17.01.2012

RESUMO

Neste estudo, foi avaliado se a forma doméstica de utilização da água sanitária é eficiente para higienizar as alfaces (*Lactuca sativa*). Para tanto, foram analisadas 28 amostras de alfaces adquiridas diretamente em um supermercado no município de Teresina, PI. As amostras foram lavadas em água corrente e, na sequência, apanhadas ao acaso para formar quatro grupos, os quais foram utilizados nos diferentes tempos de tratamentos por imersão em solução de água sanitária com 200 ppm de cloro ativo: zero (controle), 15, 30 e 45 minutos. Após o tratamento, foram realizadas as análises microbiológicas: enumeração de coliformes totais, coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* (EC); contagem de bactérias heterotróficas mesófilas (CBH) e de fungos (F). A solução de água sanitária com 200 ppm de cloro ativo reduziu a carga microbiana inicial de bactérias heterotróficas, coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* após 15 minutos de imersão, entretanto não foi eficiente para diminuir a carga de coliformes totais, fungos filamentosos e leveduras. Concluiu-se que a forma doméstica de utilização da água sanitária, recomendada em cartilhas distribuídas aos consumidores brasileiros, não é eficiente para higienizar as alfaces contaminadas com coliformes, fungos e/ou *Escherichia coli*.

Palavras-chave. coliformes, verduras, leveduras, higiene, qualidade.

ABSTRACT

In this work it was evaluated if the domestic use of bleach is effective to rightly sanitize lettuce leaves (*Lactuca sativa*). Aiming this, it was analyzed twenty-eight samples of refrigerated lettuce obtained directly in a supermarket in the city of Teresina, State of Piauí. The samples were washed in flowing water and, subsequently, picked randomly to form four groups to be used in the immersion time treatment in bleach solution in 200 ppm of active chlorine: zero (control), 15, 30 and 45 minutes. Then, the microbiological analyses were made: enumeration of total coliforms, thermotolerant coliforms and *Escherichia coli* (EC); counting of mesophilic heterotrophic bacteria (HBC) and fungi (F). The bleach solution in 200 ppm of active chlorine reduces the initial microbial load of heterotrophic bacteria, thermotolerant coliforms and *Escherichia coli* in lettuce leaves after 15 minutes of immersion. However, it was not effective to reduce the amount of total coliforms, filamentous fungi and yeasts. Therefore, the domestic use of bleach, recommended by charts distributed to Brazilian consumers, is not effective to rightly sanitize lettuce leaves infected by coliforms, fungi and *Escherichia coli*.

Keywords. coliforms, vegetables, yeast, hygiene, quality.

INTRODUÇÃO

A alface (*Lactuca sativa*) é considerada a hortaliça folhosa mais comercializada no Brasil, sendo considerada uma cultura hortícola de grande consumo. Devido a seu baixo valor calórico, está presente em diversas dietas, o que favorece bastante seu consumo de maneira geral, constituindo-se em componente imprescindível nas saladas dos brasileiros¹.

Recomenda-se o consumo diário de hortaliças, pois fornecem inúmeros benefícios ao organismo e colaboram para o desenvolvimento e a regulação orgânica do corpo, devido ao elevado teor de vitaminas e minerais. A alface destaca-se por fornecer principalmente carotenoides, que no organismo são precursores de vitamina A, e pelo seu teor significativo de fibras, que contribui para a prevenção de desordens intestinais².

Apesar do aumento do consumo de hortaliças devido à preocupação com a saúde e o interesse por uma vida mais saudável³, principalmente as hortaliças folhosas constituem fonte potencial de micro-organismos patogênicos, contribuindo para a elevação do número de casos de doenças veiculadas por alimentos⁴. Frank e Takeushi⁵ alertam que vegetais frescos, especialmente alface, foram identificados como veículos de bactérias patogênicas relevantes para a saúde pública, tais como *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *E.coli* enteropatogênica, *E.coli* enterotoxigênica e *E.coli* enterohemorrágica (por exemplo, *E.coli* O157:H7), além de protozoários, parasitas e vírus da hepatite A⁶.

A contaminação da alface é um fator limitante para sua comercialização, sendo diversas as causas que podem levar à presença de elevada carga microbiana nesse produto, tais como condições sanitárias desfavoráveis nas áreas rurais e urbanas, que favorecem a ocorrência de contaminação e transformam os vegetais em veículos de transmissão de patógenos⁷. Desse modo, pode-se afirmar que os riscos microbianos que afetam a segurança dos alimentos podem estar presentes em qualquer ponto da cadeia produtiva, como o cultivo, a colheita, a lavagem, o armazenamento, o transporte, a comercialização e, finalmente, a mesa do consumidor⁸. Outros fatores importantes que podem também representar uma grande fonte de contaminação e disseminação de micro-organismos nesse alimento são a prática do uso de adubo orgânico, a utilização de águas contaminadas para irrigação, o transporte feito

em engradados abertos e a falta de higiene pessoal no momento da manipulação dos alimentos⁹. As alfaces *in natura* são amplamente consumidas em residências; desta forma, é importante buscar meios para reduzir a contaminação microbiana inicial. A lavagem em água corrente de boa qualidade pode reduzir em até 90% a carga microbiana dos vegetais¹⁰, porém não é suficiente para manter a contaminação em níveis seguros, sendo essencial a aplicação de uma etapa de sanitização com agentes antimicrobianos¹¹. A prática de sanitização deve ser usada como complementação das Boas Práticas de Produção (BPP) para reduzir a níveis seguros a presença de micro-organismos patogênicos no alimento¹², sendo que em hortaliças este processo é considerado uma etapa crítica na segurança do consumo¹³.

Entende-se como água sanitária as soluções aquosas à base de hipoclorito de sódio ou cálcio, que apresentam teor de cloro ativo entre 2,0 a 2,5% p/p e que podem conter apenas hidróxido de sódio ou cálcio, cloreto de sódio ou cálcio e carbonato de sódio ou cálcio como estabilizante. Deve ser fabricada com água potável, sem adição de corantes, fragrâncias, sequestrantes, tensoativos ou quaisquer outras substâncias. Pode ter ação como alvejante e de desinfetante de uso geral¹⁴, sendo que os compostos à base de cloro são biocidas de amplo espectro de ação, que reagem com as proteínas da membrana das células microbianas, interferindo no transporte de nutrientes e promovendo a perda de componentes celulares¹⁵. Por ser um produto de baixo custo, eficiente e com ampla aplicação popular, a água sanitária é o sanitizante mais utilizado para higienização de alimentos em residências.

A legislação recomenda que o tempo de contato para desinfecção de ambientes e superfícies inanimadas é no mínimo 10 minutos¹⁴, porém não menciona o período necessário para desinfecção de alimentos.

Baruffaldi et al.¹⁶ avaliaram que o tratamento químico, com solução de hipoclorito de sódio de 40 ppm de cloro livre, de folhas de alface por um período de exposição de 10 minutos mostrou-se eficaz do ponto de vista parasitológico. Fontana¹⁷ recomenda que 15 minutos em soluções de hipoclorito a 50 a 200 ppm são suficientes para obtenção dos efeitos sanitizantes para coliformes.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) recomenda, em cartilhas para manipuladores de alimentos, que, após lavagem em água corrente, as folhas de alfaces permaneçam imersas em solução de água

clorada a 200 ppm (uma colher de sopa para um litro de água) por 10 minutos para que possam ser consumidas com segurança¹⁸.

As indicações de desinfecção de alfaces em água sanitária devem ser estudadas para comprovar a eficácia das recomendações institucionais em rotinas caseiras. Deste modo, este trabalho objetivou avaliar se a forma doméstica de utilização da água sanitária é eficiente para higienizar adequadamente as alfaces.

MATERIAL E MÉTODOS

De janeiro a junho de 2008, foram analisadas 28 amostras de alfaces (*Lactuca sativa*), refrigeradas, adquiridas diretamente em um supermercado no município de Teresina-PI, o qual foi escolhido por fornecer verduras em condições aparentemente adequadas de higiene. Semanalmente, foi adquirida uma amostra de alface crespa, coletada do balcão refrigerado do supermercado e acondicionada em saco plástico de primeiro uso, sendo em seguida encaminhada ao Laboratório de Controle Microbiológico de Alimentos do Núcleo de Ensino, Pesquisas e Processamento de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí.

As amostras de alface foram retiradas dos sacos plásticos, e as folhas, removidas do talo para lavagem em água corrente. Na sequência, as folhas foram distribuídas ao acaso para formarem quatro grupos, utilizados para avaliar diferentes tempos de imersão em solução de água sanitária a 200 ppm de cloro ativo (uma colher de sobremesa, que corresponde a 8,0 mL, para 1,0 L de água), conforme recomendado pela Anvisa¹⁸. A marca de água sanitária utilizada apresentava registro no Ministério da Saúde, estava dentro do prazo de validade e trazia informação no rótulo sobre concentração entre 2,0 e

2,5% de cloro livre¹⁴. Para efeito de cálculos, neste estudo, considerou-se que a água sanitária utilizada continha 2,0% de cloro ativo.

O projeto foi desenvolvido em sistema fatorial 4x7 (quatro tempos de imersão em solução de água sanitária com sete repetições), formado por períodos de imersão das folhas de alfaces em zero (grupo controle, T0), 15, 30 e 45 minutos (T1, T2, T3) em solução de água sanitária.

As folhas de alface ficaram completamente imersas na solução com água sanitária em recipientes plásticos, sem agitação, simulando o preparo doméstico, pelo tempo de contato estabelecido para cada tratamento (zero-controle, 15, 30 e 45 minutos de imersão). Decorrido o tempo de contato estabelecido para cada tratamento, foram feitas as seguintes análises microbiológicas recomendadas pela legislação vigente¹⁹: enumeração de coliformes totais (a 35 °C), de coliformes termotolerantes (a 45 °C) e de *Escherichia coli* (EC) pelo método dos tubos múltiplos²⁰; contagem de bactérias heterotróficas mesófilas, conforme recomenda Mourton²¹, e de fungos em placas Petrifilm YM, segundo as instruções do fabricante.

Após a obtenção dos resultados, os valores das contagens foram transformados em log₁₀, correlacionados e submetidos a análise de variância e aplicação do teste de SNK para comparação das médias utilizando o Pacote Estatístico Sigma Stat²². O nível de significância utilizado em todos os testes foi p < 0,05.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados observados indicaram que imergir as folhas de alfaces por 15 minutos em solução de água sanitária a 200 ppm é suficiente para reduzir significativamente (p < 0,05) a carga de bactérias heterotróficas, de coliformes termotolerantes e de

Tabela 1. Resultados médios e desvio padrão das análises microbiológicas em amostras de alfaces comercializadas em Teresina-PI, submetidas a diferentes tempos de imersão em solução de cloro a 200 ppm

Tempo de imersão	Bactérias heterotróficas mesófilas (UFC/g)	Fungos filamentosos e leveduras (UFC/g)	Coliformes totais (NMP/g)	Coliformes termotolerantes (NMP/g)	<i>Escherichia coli</i> (NMP/g)
0,0 minuto (controle -T0)	5,49 ^a ± 0,54	3,91 ^a ± 0,86	3,08 ^a ± 0,56	1,27 ^a ± 0,91	0,88 ^a ± 0,94
15 minutos (T1)	4,04 ^b ± 0,89	2,08 ^a ± 0,25	2,25 ^a ± 1,12	0,73 ^b ± 0,70	0,20 ^b ± 0,37
30 minutos (T2)	3,69 ^b ± 1,14	1,94 ^a ± 1,10	1,68 ^a ± 0,80	0,53 ^b ± 0,56	0,30 ^b ± 0,34
45 minutos (T3)	3,88 ^b ± 0,73	2,49 ^a ± 0,53	2,32 ^a ± 0,81	0,79 ^b ± 0,80	0,43 ^b ± 0,57

^{a, b} = letras iguais, resultados semelhantes na mesma coluna; UFC/g = unidade formadora de colônia; NMP/g = número mais provável; ppm = partes por milhão

Escherichia coli. Entretanto, os tratamentos avaliados não foram eficazes para reduzir a população inicial de coliformes totais, de fungos filamentosos e leveduras. Não houve diferença ($p > 0,05$) entre os tempos de imersão T1, T2 ou T3, e, portanto, aumentar o tempo de contato com a solução de água sanitária não reduziu significativamente as cargas microbianas presentes nas alfaces (Tabela 1).

Foi possível observar a redução de até dois ciclos logarítmicos nos resultados microbiológicos das amostras de alface que ficaram imersas em solução de água clorada a 200 ppm de cloro ativo (Tabela 1), diferentemente de outros estudos^{11,12,15,24,25}, os quais verificaram que a água sanitária não foi eficaz para inativar completamente a carga microbiana presente nos vegetais analisados.

López-Gálvez et al.²⁵ argumentam que a baixa eficiência do hipoclorito pode estar relacionada à localização das células bacterianas, que podem estar protegidas nos estômatos teciduais das folhas de alface, o que talvez dificulte a exposição ao sanitizante. Deste modo, apesar de lavadas e sanitizadas com solução de água sanitária, as alfaces poderiam ainda veicular micro-organismos e, dessa forma, representariam um veículo de transmissão de doenças^{4,5,12}.

De modo geral, as alfaces comercializadas em Teresina são fornecidas por agricultores locais e hortas comunitárias e são cultivadas diretamente no solo, condições que favorecem a ocorrência de contaminações e, por consequência, a transmissão de patógenos^{7,9}. Além disso, a contaminação observada nas alfaces também pode ser decorrente da manipulação pós-colheita⁸.

Segundo Beuchat et al.¹⁰, a lavagem das folhas de alface reduz mecanicamente até 90% da carga microbiana presente. Porém, neste experimento, antes de serem imersas na solução de água sanitária a 200 ppm de cloro ativo, por tempo variado, as folhas de alface foram lavadas em água corrente e, ainda assim, apresentaram contagens de bactérias heterotróficas de 5,49 UFC/g em \log_{10} , verificada no grupo controle (T0). A utilização de sanitizante conforme recomendam alguns autores^{11,13,18,23} não foi suficiente para reduzir a contaminação de alfaces por bactérias. Embora não tenha sido pesquisada a presença de *Salmonella* spp., foi encontrada *E. coli*, que também é uma enterobactéria, a qual, dependendo do sorotipo, pode causar doenças transmitidas por alimentos.

Devido a informações nutricionais e à globalização, recentemente, os habitantes de Teresina passaram a utilizar mais vegetais em suas dietas diárias,

que, segundo Oliveira e Marchini², são fontes de fibras e proporcionam vida saudável³. Os teresinenses consomem com frequência alface crua em suas refeições diárias, principalmente na forma de saladas. Esta forma de consumo é semelhante à relatado por Fernandes et al.¹ nas demais regiões brasileiras. Diante disso, a eficiência dos processos de sanitização torna-se importante para garantir a segurança dos consumidores.

CONCLUSÃO

A utilização de solução de água sanitária com 200 ppm de cloro ativo reduziu a carga microbiana inicial de bactérias heterotróficas mesófilas, coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* presente em folhas de alfaces após 15 minutos de imersão. No entanto, este mesmo tratamento não foi eficaz para coliformes totais e fungos. Os dados sugerem que a forma doméstica de utilização da água sanitária, recomendada pelas cartilhas distribuídas para consumidores brasileiros, não é eficiente para higienizar adequadamente, isto é, reduzir a carga de micro-organismos a níveis mínimos e seguros para alfaces consumidas *in natura*.

AGRADECIMENTOS

Ao Núcleo de Estudos, Pesquisa e Processamento de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias da UFPI, pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Fernandes AA, Martinez HEP, Pereira PRG, Fonseca MCM. Produtividade, acúmulo de nitrato e estado nutricional de cultivares de alface, em hidroponia, em função de fontes de nutrientes. *Horticult Bras*. 2002;20(2):195-200.
2. Oliveira JED, Marchini JS. Ciências nutricionais. São Paulo: Sarvier; 1998.
3. Rosa CCB, Martins MLL, Folly MM. Avaliação microbiológica de hortaliças provenientes de hortas comunitárias de Campos dos Goytacazes, RJ. *Hig Aliment*. 2007;19(134):75-80.
4. Buck JW, Walcott RR, Beuchat LR. Recent trends in microbiological safety on fruits and vegetables. *Plant Manag Network*. 2003 [acesso 20 out 2010]. Disponível em: [http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Documents/2003/MicrobiologicalSafety.pdf].
5. Frank JF, Takeushi K. Direct observation of *Escherichia coli* O157:H7 inactivation on lettuce leaf using confocal scanning laser microscopy. In: Tuijtelars et al., organizadores. Food microbiology and food safety into the next millenium. Proceedings of 17th International Conference of International Committee on Food Microbiology and Hygiene (ICFMH), Vindhoven, Holanda. Set 1999, p. 795-7.

6. Nascimento MS, Silva N, Okazaki MM. Avaliação comparativa da eficácia de cloro, vinagre, ácido acético e ácido peracético na redução da população de micro-organismos aeróbios mesófilos em verduras e frutas. *Rev Net-DTA Online*. 2003;3(6):224-30.
7. Rodrigues CS. Contaminação microbiológica em alface e couve comercializadas no varejo de Brasília-DF. [trabalho de conclusão de curso]. Brasília (DF): Universidade de Brasília; 2007.
8. Ranthum MA. Subnotificação e alta incidência de doenças veiculadas por alimentos e seus fatores de risco: causas e consequências no município de Ponta Grossa-PR. [dissertação de mestrado]. Rio de Janeiro (RJ): Escola Nacional de Saúde Pública; 2002.
9. Pacheco MASR, Fonseca YSK, Dias HGG, Cândido VLP, Gomes AHS, Armelin IM, et al. Condições higiênicas-sanitárias de verduras e legumes comercializados no CEAGESP de Sorocaba-SP. *Hig Aliment*. 2002;16(101):50-5.
10. Beuchat LR, Farber JM, Garret FH, Harris IJ, Parish ME, Suslow TV, et al. Standardization of a method to determine the efficacy of sanitizers in inactivating human pathogenic microorganisms on raw fruit and vegetables. *J Food Protect*. 2001;64(7):1079-84.
11. Nascimento MS, Silva N. Tratamentos químicos na sanitização de morango (*Fragaria vesca* L.). *Braz J Food Technol*. 2010;13(1):11-7.
12. Nascimento AR, Filho Mouchreck JE, Bayma AB, Marques CMP. Sanitização de saladas *in natura* oferecidas em restaurantes *self-service* de São Luís-MA. *Hig Aliment*. 2002;16(16):92-3.
13. Santos YTO. Qualidade sanitária das hortaliças em um distrito sanitário de Salvador-BA e eficiência das soluções antimicrobianas sobre linhagens de *Escherichia coli*. [dissertação de mestrado]. Salvador (BA):Universidade Federal da Bahia; 2007.
14. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC n. 55, de 10 de novembro de 2009. Aprova Regulamento Técnico que estabelece os requisitos mínimos para o registro de produtos saneantes categorizados como água sanitária e alvejantes à base de hipoclorito de sódio e hipoclorito de cálcio. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, 13 nov 2009, Seção 1, p. 42-43.
15. Vanetti MCD. Controle microbiológico e higiene no processamento mínimo. Encontro Nacional sobre Processamento mínimo de frutas e hortaliças, 2. 2000, Viçosa. Palestras... Viçosa: UFV; 2000. p. 44-51.
16. Baruffaldi R, Penna TCV, Machoshvili IA, Abe LE. Tratamento químico de hortaliças poluídas. *Rev Saúde Pública*. 1984;18(3):225-34.
17. Fontana N. Atividade antimicrobiana de desinfetantes utilizados na sanitização de alface. [trabalho de conclusão de curso]. Santa Maria: Centro Universitário Franciscano/Unifra; 2006.
18. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. Cartilha. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 16 set 2004.
19. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos e seus anexos I e II. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 10 jan 2001, Seção 1, n. 7-E, p. 45.
20. Kornacki JL, Johnson JL. Enterobacteriaceae, coliforms and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: Downes FP, Ito K. *Compendium of Methods Microbiological Examination of Foods*. Washington: American Public Health Association; 2001. p. 652.
21. Mourton RD. Aerobic plate count. In: Downes FP, Ito K. *Compendium of Methods Microbiological Examination of Foods*. Washington: American Public Health Association; 2001. p. 652.
22. Sigma Stat for windows version 1.0. Jandel Corporation, 1994.
23. Lund DG, Petrini LA, Aleixo JAG, Rombaldi CG. Uso de sanitizantes: redução da carga microbiana em mandioca minimamente processada. *Ciênc Rural*. 2005;35(6):1431-5.
24. Srebernich SM. Utilização do dióxido de cloro e do ácido peracético como substitutos do hipoclorito de sódio na sanitização do cheiro-verde minimamente processado. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2007;27(4):744-50.
25. López-Gálvez F, Gil MI, Truchado P, Selma MV, Allende A. Cross-contamination of fresh-cut lettuce after a short-term exposure during pre-washing cannot be controlled after subsequent washing with chlorine dioxide or sodium hypochlorite. *Food Microbiol*. 2010;27(2):199-204.

Caracterização e compostos bioativos do óleo da castanha-de-cutia (*Couepia edulis*)

Physical-chemical characterization of bioactive compounds of the oil from cutia nut (*Couepia edulis*)

RIALA6/1434

Tainara COSTA-SINGH¹, Thiago Bergler BITENCOURT², Neuza JORGE^{1*}

*Endereço para correspondência: ¹Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista. Rua Cristóvão Colombo, 2265, CEP: 15054-000, São José do Rio Preto, SP. Tel.: (17) 3221-2257. E-mail: njorge@ibilce.unesp.br.

²Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal da Fronteira do Sul, Campus Laranjeiras do Sul.

Recebido: 10.08.2011 - Aceito para publicação: 24.01.2012

RESUMO

O óleo da castanha-de-cutia (*Couepia edulis*) foi extraído por prensagem a frio e caracterizado físico-quimicamente por meio de métodos analíticos padrão para óleos e gorduras. Foram avaliados o teor de ácidos graxos livres, os índices de acidez, de peróxidos, de iodo, de refração e de saponificação e a matéria insaponificável. A estabilidade oxidativa foi determinada com o uso do equipamento Rancimat; o perfil de ácidos graxos, por cromatografia gasosa e por ressonância magnética nuclear de prótons (RMN-¹H) por espectrometria. A análise da composição de tocoferóis foi realizada em cromatografia líquida de alta eficiência, e dos compostos fenólicos totais, por espectrofotometria UV-Vis. Por se tratar de óleo prensado a frio, os resultados dos índices de acidez e de peróxidos confirmaram a estabilidade das amostras prensadas, uma vez que o processo não interfere na qualidade do óleo. Quanto à composição química de ácidos graxos, evidenciaram-se maior percentual de ácidos graxos insaturados, aproximadamente 52,78%, e a presença de ácidos graxos conjugados. O óleo apresentou ainda relevante teor de compostos fenólicos totais, os quais constituem fonte viável de α - e γ -tocopheróis. Por ser fonte de compostos bioativos, há perspectivas de uso do óleo da castanha-de-cutia como matéria-prima para indústrias químicas e farmacêuticas.

Palavras-chave. características físico-químicas, estabilidade oxidativa, cromatografia gasosa, RMN-¹H, tocoferóis.

ABSTRACT

The oil from cutia nut (*Couepia edulis*) was extracted by cold pressure, and it was physical-chemically characterized by standard analytical methods for oils and fats. This work evaluated: the free fatty acids contents; acid, peroxide, iodine, saponification, and refraction index values; and the unsaponifiable fractions. The oxidative stability was determined by using Rancimat equipment, and fatty acid profile by gas chromatography and proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (¹H NMR). The analysis of tocopherols composition was performed by high efficiency liquid chromatography, and the total phenolic compounds by spectrophotometry. Being a cold-pressed oil, the results of free fatty acid and peroxide confirmed the stability of the pressed samples, as the process did not cause effect on the oil quality. As for the fatty acid chemical composition, we found a high percentage of unsaturated fatty acids, approximately 52.78%, and the occurrence of conjugated fatty acids. Also, the oil showed a relevant total phenolic compound content. It means that it constitutes a viable source of α - and γ -tocopherols. Being a source of bioactive compounds, there is a favorable outlook for using the oil of cotia nut as a raw material for chemical and pharmaceutical industries.

Keywords. physical-chemical characteristics, oxidative stability, gas chromatography, ¹H NMR, tocopherol.

INTRODUÇÃO

Compostos bioativos são constituintes extras nutricionais e ocorrem tipicamente em pequenas quantidades nos alimentos. O estudo desses compostos bioativos inspirou o conceito de alimentos funcionais. Segundo Day et al.¹, alimento funcional seria qualquer alimento, natural ou processado, que, além de seus nutrientes, possua componentes adicionais que atuem no metabolismo e na fisiologia humana, promovendo efeitos benéficos à saúde, retardando o aparecimento de doenças crônico-degenerativas e melhorando a qualidade e a expectativa de vida das pessoas. No Brasil, o Ministério da Saúde, por meio da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), regulamentou os alimentos funcionais.

Há grande demanda comercial por óleos vegetais ricos em compostos benéficos para a saúde, devido ao interesse dos consumidores pela redução do risco de doenças e pela promoção da saúde por meio da melhoria na dieta. Esses compostos benéficos incluem tocoferóis, carotenoides, compostos fenólicos e composição especial em ácidos graxos, como alto conteúdo de ácidos graxos mono e poli-insaturados.

Os ácidos graxos linoleico (C18:2 n-6) e α -linolênico (C18:3 n-3) são recomendados há muito tempo na alimentação diária, já que estão relacionados a importantes eventos fisiológicos, como câncer, trombose, artrite e outros processos inflamatórios e oxidativos. Nos últimos anos, também tem sido recomendado o consumo de óleos vegetais ricos em ácido graxo monoinsaturado oleico (C18:1 n-9). Tal fato tem incentivado pesquisas por novas fontes de óleos e azeites vegetais que atendam a essas recomendações de composição³.

Os tocoferóis estão presentes de forma natural na maioria dos óleos vegetais. Existem quatro tipos: α -, β -, γ -, e δ -tocoferol, sendo o α -tocoferol o mais abundante nos alimentos e o de maior atividade biológica como vitamina E. A atividade antioxidante dos tocoferóis se deve principalmente a sua capacidade de doar seus hidrogênios fenólicos aos radicais livres lipídicos, inibindo a oxidação. Contudo, tem sido notado que a atividade dos tocoferóis *in vitro* depende também de muitas outras possíveis reações paralelas, que são drasticamente afetadas pelas suas concentrações relativas, temperatura e luz, tipo de substrato e por outras espécies químicas atuando como pró-oxidantes e sinergistas no sistema^{4,5}.

Os compostos fenólicos têm recebido atenção nos últimos anos por sua ação antioxidante, inibindo a

peroxidação lipídica e a atividade de lipoxigenase *in vitro*. Esses compostos desempenham um papel importante, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Antioxidantes fenólicos funcionam como sequestradores de radicais livres, doando um átomo de hidrogênio a um radical lipídico, e algumas vezes como quelantes de metais. Os produtos intermediários, formados pela ação desses antioxidantes, são relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático apresentado por tais substâncias. A eficiência do antioxidante fenólico é determinada pelos grupos funcionais presentes e pela posição que ocupam no anel aromático^{6,7}.

A flora brasileira é uma das mais ricas fontes de novas substâncias bioativas, e a vasta diversidade de tradições a ela associadas é apenas um reflexo desse imenso potencial, além de uma valiosa ferramenta no estudo e na exploração de seus recursos⁸. A castanha-de-cutia (*Couepia edulis* Prance), pertencente à família Chrysobalanaceae, é uma espécie endêmica da região central da Amazônia. Trata-se de um fruto fibroso, ovoides alongado, de cor pardo-escuro, formado de casca espessa, lisa e dura, mas esponjosa, que encerra uma castanha com envoltório escuro, quase preto, envolvendo a amêndoa de cor branca. O peso médio de um fruto é 82 g, e o de uma amêndoa é 15,5 g. As amêndoas têm sabor similar ao da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*), ainda que a textura seja um pouco mais branda. O grande potencial da espécie é como produtora de óleo, pois sua amêndoa produz cerca de 73% de óleo usado pelos moradores locais como matéria-prima para produção de sabão caseiro e na culinária, além do uso de suas amêndoas assadas como alimento. O óleo extraído das amêndoas é claro, inodoro e utilizado para cozinhar. Além disso, o óleo dessa castanha pode ser aproveitado também na indústria de tintas e vernizes^{9,10}.

O estudo detalhado da composição do óleo extraído das castanhas-de-cutia irá contribuir com os profissionais da área de alimentos para uma adequada orientação dietética, bem como na obtenção de dados que possam ser utilizados em tabelas de ácidos graxos, compostos fenólicos e tocoferóis de sua fração lipídica. A obtenção de dados referentes à composição de alimentos amazônicos tem sido estimulada com o objetivo de reunir informações atualizadas, confiáveis e adequadas à realidade nacional. O presente trabalho teve como objetivo determinar, no óleo extraído das castanhas-de-cutia (*Couepia edulis*), as características físico-químicas,

o perfil de ácidos graxos, os teores de tocoferóis, a atividade de vitamina E e a concentração de compostos fenólicos totais, visando a uma possível utilização para fins alimentícios ou industriais.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

No presente trabalho, foram utilizadas castanhas-de-cutia provenientes do Norte do Brasil, região de clima tropical. Três lotes da amostra foram colhidos em Manaus, no estado do Amazonas, no mês de março de 2010.

Imediatamente após o recebimento, as castanhas foram descascadas e selecionadas para remoção de sujidades provenientes das cascas e separação das que sofreram injúrias. Em seguida, foram secas por aproximadamente 72 horas, em bandejas, à temperatura ambiente (30 °C), a fim de reduzir o teor de umidade para valor abaixo de 10%. Os lotes de castanhas foram homogeneizados, acondicionados em embalagens a vácuo, devidamente rotulados e armazenados sob refrigeração (5 ± 1 °C).

As amostras de óleo foram obtidas por meio de processo físico de extração a frio por prensa hidráulica Tecnal, Modelo TE-098, em temperatura ambiente, com pressão inicial de três toneladas e final de 12 toneladas. Depois, foram acondicionadas em vidro âmbar, inertizadas com nitrogênio gasoso e armazenadas a -18 °C para análises posteriores.

Métodos

- Ácidos graxos livres, expressos como ácido oleico, pelo método Cd 3d-63 da AOCS¹¹.
- Índice de acidez, expresso em mg NaOH.g⁻¹, calculado multiplicando-se a quantidade de ácidos graxos livres por 1,99¹².
- Índice de peróxidos, expresso em milequivalentes de oxigênio ativo contidos em um quilograma de óleo, conforme método Cd 8b-90 proposto pela AOCS¹¹.
- Índice de iodo, expresso em gramas de iodo absorvido por 100 gramas de amostra, determinado pelo método Cd 1-25 AOCS¹¹.
- Índice de refração, de acordo com o método Cc 7-25 AOCS¹¹. A leitura foi feita na escala que resulta diretamente no índice de refração absoluto a 40 °C.
- Índice de saponificação, definido pela quantidade em miligramas de hidróxido de potássio necessária para saponificar um grama de óleo ou gordura, segundo método Cd 3c-91 AOCS¹¹.
- Matéria insaponificável, correspondente à quantidade total de substâncias dissolvidas nos óleos e gorduras, que após saponificação com álcalis foram insolúveis em solução aquosa, mas solúveis em solventes, de acordo com o método Ca 6b-53 AOCS¹¹.
- Índice de estabilidade oxidativa, conforme método Cd 12b-92 proposto pela AOCS¹¹, utilizando o Rancimat a 100 °C, com fluxo de ar de 20 L.h⁻¹, 3 g de amostra e volume de água destilada de 60 mL nos frascos contendo os eletrodos.
- Perfil de ácidos graxos, por cromatografia gasosa a partir das amostras transesterificadas com hidróxido de potássio metanólico em n-hexano, segundo método Ce 2-66 da AOCS¹¹. Para a determinação analítica, segundo metodologia adaptada de Ce 1-62 da AOCS¹¹, utilizou-se um cromatógrafo gasoso equipado com detector de ionização de chama, sistema de injeção *split* de aproximadamente 1:30 e amostrador automático. Os compostos foram separados em coluna capilar de sílica fundida CP-Sil 88, de 60 m de comprimento, com diâmetro interno de 0,25 mm e espessura de filme de 0,20 µm. A temperatura inicial da coluna foi 90 °C (durante quatro minutos), programada para alcançar 195 °C com incremento de 10 °C . min⁻¹, sendo, então, mantida em isoterma por 16 minutos. A temperatura do injetor foi 230 °C, e do detector, 250 °C. O gás de arraste foi o hidrogênio. Os ácidos graxos foram identificados de acordo com os tempos de retenção, e a quantificação foi feita por normalização da área (%). Utilizou-se como padrão uma mistura composta de 37 ésteres metílicos de ácidos graxos (Supelco, Bellefonte, USA), de C4:0 a C24:1, com pureza entre 99,1% e 99,9%.
- Espectroscopia por ressonância magnética (RMN-H¹), empregando espectrômetro AC BRUCKER a 400 MHz em temperatura ambiente. Utilizou-se CDCl₃ como solvente, e todos os deslocamentos químicos foram citados em relação ao tetrametilsilano (TMS), usando-se a convenção positiva *downfield*. Os sinais de hidrogênio da amostra foram comparados aos relatados na literatura.

- Composição de tocoferóis, determinada pelo método AOCS Ce 8-89¹¹. A análise foi realizada por cromatografia líquida com detector de fluorescência marca TSP, modelo FL2000, de acordo com as seguintes condições: coluna de sílica 250 x 4,6 mm, com poro de 5 µm; fase móvel composta por n-hexano: álcool isopropílico (99,5:0,5 v/v); fluxo de 1,2 mL.min⁻¹ e comprimento de onda para excitação em 290 nm e para emissão em 330 nm. A quantificação foi realizada por padronização externa com base nas áreas dos picos, utilizando padrões de α-, β-, γ- e δ-tocoferol, sendo expressos em mg.kg⁻¹ de óleo.
- Atividade de vitamina E, representada como equivalente de α-tocoferol, foi calculada utilizando-se fator de correção 1,0 para o teor de α-tocoferol, enquanto as concentrações de β- e γ-tocoferol foram multiplicadas por 0,25, e para a quantidade de δ-tocoferol foi utilizado o fator de correção 0,01. Os isômeros β-, γ- e δ-tocoferóis foram calculados com menor fator de correção, a fim de evitar a supervalorização do equivalente de α-tocoferol¹³.
- Compostos fenólicos totais, por espectrofotometria UV-Vis utilizando reagente de Folin-Ciocalteu, e curva-padrão de ácido gálico conforme método descrito por Singleton e Rossi¹⁴. A cor azul produzida pela redução do reagente de Folin-Ciocalteu pelos fenólicos foi medida espectrofotometricamente no comprimento de onda de 765 nm, e os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por grama de óleo (mg EAG.g⁻¹). A extração dos compostos fenólicos foi realizada utilizando solvente metanol de acordo com o método proposto por Parry et al.².

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização físico-química

Os valores médios obtidos pelas análises físico-químicas realizadas no óleo extraído da castanha-de-cutia são mostrados na Tabela 1. A porcentagem de ácidos graxos livres e o índice de acidez estão relacionados com a ocorrência de hidrólise no óleo. O índice de acidez é definido como o número de miligramas de KOH necessário para neutralizar um grama de amostra. Dessa forma, é comumente utilizada uma simples relação entre os dois parâmetros: índice de acidez = 0,503% dos ácidos graxos livres¹². A porcentagem de ácidos graxos livres

apresentada pelo óleo da castanha-de-cutia foi 0,35%, valor inferior ao limite de 5% adotado para alguns óleos vegetais brutos, como os óleos de milho, de coco, de babaçu e de palma, conforme a resolução RDC n. 270 da ANVISA¹⁵, que estabelece o regulamento técnico para óleos vegetais.

A Comissão Codex Alimentarium¹⁶ determina como parâmetro de qualidade, para óleos brutos, acidez máxima de 4,0 mg KOH.g⁻¹, enquanto a Resolução RDC nº 270 da ANVISA¹⁵ determina, para óleos refinados, o máximo de 0,6 mg KOH.g⁻¹. No óleo analisado, observou-se índice de acidez de 0,69 mg NaOH.g⁻¹, apresentando valor dentro do permitido tanto para óleos brutos quanto para refinados, indicando sua boa qualidade.

Tabela 1. Características físico-químicas do óleo da castanha-de-cutia

Característica	Valor
Ácidos graxos livres (%)	0,35 ± 0,01
Índice de acidez (mg NaOH.g ⁻¹)	0,69 ± 0,01
Índice de peróxidos (meq.kg ⁻¹)	0,02 ± 0,01
Índice de iodo (g I ₂ .100 g ⁻¹)	90,67 ± 1,09
Índice de refração (40 °C)	1,4763 ± 0,0002
Índice de saponificação (mg KOH.g ⁻¹)	187,73 ± 0,89
Matéria insaponificável (%)	0,38 ± 0,01
Estabilidade oxidativa (horas)	1,54 ± 0,02

Valores médios ± erro padrão da média de determinações em triplicata

Em óleos extraídos de castanha-do-brasil, Ferreira et al.¹⁷ obtiveram baixos valores de índice de acidez (0,207 mg KOH . g⁻¹) e ácidos graxos livres (0,104%), indicando um mínimo grau de lipólise desenvolvida nesses óleos devido à atividade enzimática. Queiroga Neto et al.¹⁸ analisaram o óleo da castanha-do-gurgueia, obtendo valores de ácidos graxos livres de 0,6%.

A medida do índice de peróxidos em óleos é utilizada como um indicador dos estágios iniciais de oxidação lipídica. A Comissão Codex Alimentarium¹⁶ estipula, para óleos refinados e brutos, valores máximos de índice de peróxidos de 10 e 15 meq.kg⁻¹, respectivamente. O teor de peróxidos encontrado no óleo da castanha-de-cutia foi 0,02 meq.kg⁻¹, valor inferior ao limite, mostrando tratar-se de um óleo de boa qualidade.

Em estudo realizado com a castanha-do-gurgueia, Queiroga Neto et al.¹⁸ encontraram teor de peróxidos de 0,72 meq.kg⁻¹, enquanto Vanhanen e Savage¹⁹, analisando óleo industrializado de nozes, encontraram índice de peróxidos de 0,97 meq.kg⁻¹.

Os índices de iodo e refração, ambos relacionados com o grau de insaturação do óleo, foram de 90,67 g

I_2 , 100 g⁻¹ e 1,4763, respectivamente. Esses valores são semelhantes aos do óleo de arroz, cujo índice de iodo está entre 90 e 115 g I_2 .100 g⁻¹, e o de refração, a 40 °C, entre 1,467 e 1,477¹⁶. Chaves et al.²⁰ encontraram índice de iodo de 66,3 g I_2 .100⁻¹ g para a amêndoa-de-chichá (*Sterculia striata*).

O índice de saponificação foi de 187,73 mg KOH.g⁻¹, o que indica que o óleo da castanha-de-cutia é formado por ácidos graxos de peso molecular semelhante ao da maioria dos óleos vegetais, como os de soja, canola, girassol, cujos índices de saponificação, segundo a ANVISA¹⁵, são superiores a 181 mg KOH.g⁻¹.

Com relação ao teor de matéria insaponificável, a porcentagem encontrada para o óleo da castanha-de-cutia foi de 0,38%, indicando a presença de pequenas quantidades de substâncias como esteróis, tocoferóis, pigmentos e hidrocarbonetos.

Kornsteiner, Wagner e Elmadfa¹³ estudaram as características dos óleos de diferentes castanhas e nozes, reportando teores de matéria insaponificável desde 0,27%, para o óleo da avelã, até 0,52%, para a castanha-do-brasil, enquanto os óleos da noz e da noz-pecã continham 0,33 e 0,38%, respectivamente.

Pela Comissão Codex Alimentarium¹⁶, o limite máximo de matéria insaponificável para os óleos de girassol, soja, coco e algodão é 1,5%. Já para os óleos de canola e uva, 2%; e, para o óleo de milho, 2,8%. Tendo por bases esses valores, o óleo analisado apresenta teores de matéria insaponificável de acordo com valor aceito para óleos comestíveis.

Ainda pela Tabela 1, verifica-se que a estabilidade oxidativa do óleo foi de 1,54 horas nas condições estudadas. A estabilidade oxidativa faz uma avaliação do estado de oxidação dos óleos e gorduras e é uma determinação importante a nível industrial. Trata-se de um parâmetro comparativo muito utilizado no controle de qualidade de matérias-primas e de processos para se avaliarem diferentes tipos de óleos, bem como na determinação da eficiência da adição de antioxidantes. A estabilidade oxidativa é expressa pelo “período de indução” da reação, ou seja, o tempo necessário para se atingir um ponto crítico de oxidação.

Araín et al.²¹ encontraram para o óleo de arroz 3,62 horas de estabilidade oxidativa, sob 110 °C de temperatura e fluxo de ar de 20 L.h⁻¹. Amaral et al.²², caracterizando o óleo de seis cultivares de nozes (*Juglans regia*), obtiveram estabilidade oxidativa, sob as mesmas condições deste estudo, oscilando entre 2,7 e 3,4 horas.

Perfil de ácidos graxos

A Tabela 2 apresenta o perfil de ácidos graxos do óleo da castanha-de-cutia. O óleo mostrou-se composto principalmente por ácidos graxos insaturados (52,78%), dos quais 40,39% são monoinsaturados e 12,39% poli-insaturados. Dentre os monoinsaturados, destacou-se o ácido oleico, correspondendo a 39,04%. Já entre os ácidos graxos poli-insaturados, houve predominância do ácido linoleico (12,39%). A presença de ácido linoleico em teores adequados é fundamental, uma vez que se trata de um ácido graxo essencial. Entre os ácidos graxos saturados, o ácido palmítico apresentou-se em quantidades significativas (31,20%). No entanto, há uma quantidade significativa (9,2%) de ácidos graxos não identificados, podendo estar incluídos neste percentual componentes como ácidos graxos conjugados, que não podem ser identificados pelo padrão utilizado na cromatografia gasosa, o que justificaria a baixa estabilidade oxidativa encontrada.

Tabela 2. Perfil de ácidos graxos do óleo da castanha-de-cutia

Ácidos graxos	Valor médio (%)*
C16:0 (palmítico)	31,20 ± 0,13
C18:0 (esteárico)	6,36 ± 0,01
C20:0 (araquídico)	0,54 ± 0,01
Total de saturados	38,1 ± 0,05
C16:1	1,27 ± 0,01
C18:1 (oleico)	39,04 ± 0,03
Total de monoinsaturados	40,39 ± 0,02
C18:2 (linoleico)	12,39 ± 0,03
Total poli-insaturados	12,39 ± 0,03
NI	9,20 ± 0,09
Saturados/insaturados	1/1,39
Ácido oleico/linoleico	1/0,32

*Valores médios ± erro padrão da média de determinações em triplicata. NI: não identificados.

A composição em ácidos graxos aqui apresentada assemelha-se à encontrada pelo estudo de Chaves et al.²⁰, realizado com o óleo da amêndoa-de-chichá (*Sterculia striata*), e de Luzia, Bertanha e Jorge²³, com óleo de sementes de pitanga (*Eugenia uniflora* L). Nos referidos trabalhos, os conteúdos de ácido oleico foram de 35,9% e 38,01%; e de linoleico, de 12,0% e 13,61%, respectivamente. Esses valores são próximos ao perfil de ácidos graxos do óleo de palma, que apresenta teores de ácido oleico entre 36% e 44% e ácido linoleico entre 9% e 12%¹⁶.

RMN-H1

O espectro do óleo da castanha-de-cutia apresenta sinais similares aos dos ácidos oleico e linoleico,

predominantes no óleo analisado. A Figura 1 apresenta o espectro de RMN- H^1 para o óleo da castanha-de-cutia. O espectro de RMN- H^1 do óleo mostra claramente duas regiões distintas: sinais na região entre 2,77 e 0,90 ppm correspondem aos hidrogênios das cadeias alquílicas dos ácidos graxos saturados e insaturados. Os sinais situados na região de 6,36 e 5,24 ppm representam hidrogênios olefínicos, que estão presentes nos ácidos oleico e linoleico. Esses resultados (deslocamentos químicos) foram comparados a compostos semelhantes na literatura e em banco de dados científicos.

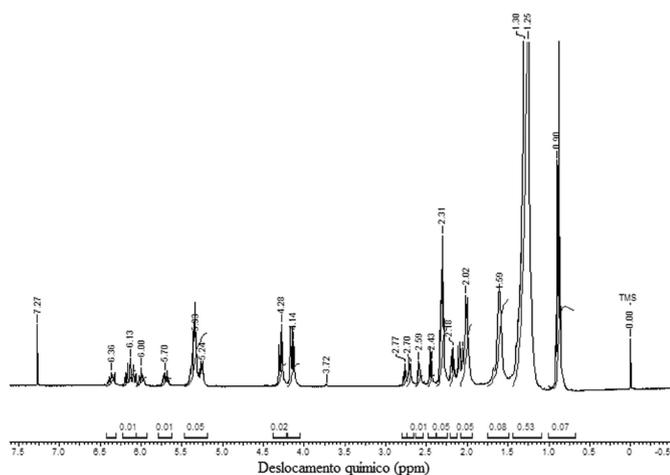


Figura 1. Espectro de RMN- H^1 (400 MHz) do óleo da castanha-de-cutia, utilizando $CDCl_3$ como solvente

O sinal em 0,9 ppm é referente aos hidrogênios da metila; os sinais entre 1,4 e 1,2 ppm são atribuídos aos hidrogênios de grupos metileno das cadeias alifáticas; entre 1,7 e 1,5 ppm, aos hidrogênios do carbono γ do éster; entre 2,1 e 1,9 ppm, aos hidrogênios ligados aos carbonos β da dupla ligação entre carbonos; entre 2,3 e 2,2 ppm, aos hidrogênios de carbonos β do éster; entre 4,3 e 4,1 ppm, aos hidrogênios ligados aos carbonos do glicerol; entre 5,26 e 5,2, ao hidrogênio ligado ao carbono de éster; entre 5,4 e 5,3, aos hidrogênios ligados aos carbonos que formam duplas ligações; e, finalmente, entre 6,4 a 5,7, ao sistema de dienos conjugados. No entanto, os sinais em 2,59 e 2,43 podem ser atribuídos aos hidrogênios de hidroperóxidos, compostos de degradação deste óleo. Esses picos podem ser visualizados na Tabela 3, com os deslocamentos identificados com base no trabalho de Guillén e Ruiz²⁴.

Após análise do espectro de H^1 , foi possível correlacionar a baixa estabilidade oxidativa do óleo de castanha-de-cutia com a presença de hidroperóxidos e

Tabela 3. Atribuição dos picos do espectro de H^1 segundo Guillén e Ruiz²⁸

Deslocamento químico (ppm)	Atribuição
0,90-0,80	- CH_3 grupos acil
1,40-1,15	- $(CH_2)_n$ - grupos acil
1,70-1,50	- $OCO-CH_2-CH_2$ - grupos acil
2,10-1,90	- $CH_2-CH=CH$ - grupos acil
2,35-2,20	- $OCO-CH_2$ - grupos acil
2,59-2,43	> $CH-OOH$ - (hidroperóxidos)
2,80-2,70	= $HC-CH_2-CH$ =
4,32-4,10	- CH_2OCOR - glicerol
5,26-5,20	> $CHOCOR$
5,40-5,26	- $CH=CH$ - grupos acil
5,70; 6,00; 6,13; 6,36	- $CH=CH-CH=CH$ - (sistema de dienos conjugados)

ácidos graxos conjugados. Esta identificação de ácidos graxos conjugados vai de encontro aos resultados obtidos por Spitzer et al.²⁵, que evidenciaram presença dos ácidos graxos conjugados α -eleostearico (C18:3) e α -licanico (18:3).

Tocoferóis

A Tabela 4 apresenta as médias para os isômeros α -, β -, γ -, δ -tocoferóis e tocoferóis totais ($mg\ kg^{-1}$) e a atividade de vitamina E (equivalente de α -tocoferol) do óleo de castanha-de-cutia. Enquanto α -tocoferol apresenta a maior atividade biológica como vitamina E, γ - e δ -tocoferol possuem maior atividade antioxidante²⁶. O α -tocoferol foi o isômero encontrado em maior quantidade neste óleo, seguido pelo γ -tocoferol, representando 56,6% e 40,7% do total de tocoferóis, respectivamente. O valor médio do teor de tocoferóis totais para o óleo de castanha-de-cutia foi $484,50\ mg\ kg^{-1}$, o que significa, em comparação com outros óleos vegetais, que o óleo dessa castanha constitui boa fonte de tocoferóis.

Tabela 4. Médias do teor de tocoferóis do óleo da castanha-de-cutia

Tocoferóis	Valor médio ($mg.kg^{-1}$)*
α -Tocoferol	$274,27 \pm 2,02$
β -Tocoferol	$2,47 \pm 0,29$
γ -Tocoferol	$197,10 \pm 1,93$
δ -Tocoferol	$10,67 \pm 0,11$
Tocoferol total	$484,50 \pm 0,93$
Vitamina E**	$249,31 \pm 1,84$

*Valores médios \pm erro padrão da média de determinações em triplicata. **Atividade de vitamina E expressa como α -tocoferol.

Alasalvar e Shahidi³ analisaram a composição de tocoferóis em óleos extraídos de diversas castanhas

e nozes. Foram encontrados teores de 259,0 mg.kg⁻¹ de α -tocoferol para o óleo extraído das amêndoas e 226,0 mg.kg⁻¹ de γ -tocoferol para o óleo de pistache. Quanto à composição de tocoferóis em óleos vegetais comuns, o óleo de algodão apresenta os isômeros α - e γ -tocoferóis como majoritários, com valores oscilando entre 136-674 e 138-746 mg.kg⁻¹, respectivamente. O óleo de colza também apresenta essa característica, com teores oscilando entre 100-386 e 189-753 mg.kg⁻¹ de α - e γ -tocoferóis, respectivamente¹⁶.

Quanto à atividade de vitamina E, o teor encontrado foi 249,31 equivalentes de α -tocoferol. Kornsteiner, Wagner e Elmadfa¹³, estudando óleos extraídos de castanhas e nozes, encontraram teor de 33,1 equivalentes de α -tocoferol para óleo de avelã. Segundo os autores, baixos níveis de vitamina E na alimentação podem ser associados a maiores riscos de desenvolvimento de doenças degenerativas, como a aterosclerose. A ingestão adequada desta vitamina exerce efeito cardioprotetor, por inibir a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), o que é chave no processo aterogênico.

Compostos fenólicos totais

A concentração de compostos fenólicos totais encontrada foi 2,02 mg de equivalentes de ácido gálico por grama (mg EAG.g⁻¹) de óleo de castanha-de-cutia extraído a frio. Em óleos de soja, girassol, milho, canola e arroz, extraídos a frio, a quantidade de fenólicos totais variou de 1,26 a 1,48 mg.100 g⁻¹ em equivalentes de ácido cafeico²⁷, e em óleos de oliva, de 135 a 440 mg.kg⁻¹ em equivalentes de ácido cafeico²⁸. Em óleos extraídos de castanhas-do-brasil, castanha de caju e macadâmia, a concentração de compostos fenólicos totais foi 3,10, 2,74 e 1,56 mg de EAG.g⁻¹, respectivamente²⁹.

CONCLUSÃO

As propriedades físico-químicas do óleo extraído da castanha-de-cutia foram comparáveis às de óleos convencionais de boa qualidade, com considerável quantidade de compostos fenólicos totais. O óleo da castanha-de-cutia apresentou elevada porcentagem de ácidos graxos insaturados, destacando-se o ácido oleico. Este elevado grau de insaturação favorece seu uso para fins comestíveis, desde que comprovada a ausência de substâncias tóxicas ou alergênicas, ou como matéria-prima para as indústrias farmacêutica e oleoquímica.

Além disso, detectaram-se presença de ácidos linolênicos conjugados neste óleo e importantes teores de tocoferóis, em especial os isômeros α - e γ -tocoferóis.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp), pelo auxílio à pesquisa (Processo n. 2010/50325-5), e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de mestrado (Processo n. 131933/2009-4) e produtividade em pesquisa.

REFERÊNCIAS

1. Day L, Seymour RB, Pitts KF, Konczak I, Lundin L. Incorporation of functional ingredients into foods. *Trends Food Sci Technol*. 2009;20(9):388-95.
2. Parry J, Su L, Luther M, Zhou K, Yurawecz MP, Whittaker P, Yu L. Fatty acid composition and antioxidant properties of cold-pressed marionberry, boysenberry, red raspberry, and blueberry seed oils. *J Agric Food Chem*. 2005;53(3):566-73.
3. Alasalvar C, Shahidi F. *Tree nuts: composition, phytochemicals and health effects*. Boca Raton: CRC Press; 2008.
4. Adhikari P, Hwang KT, Shin MK, Lee BK, Kim SK, Kim SY, Lee KT, Kim SZ. Tocols in caneberry seed oils. *Food Chem*. 2008;111:687-90.
5. Yang J. Brazil nuts and associated health benefits: a review. *Food Sci Technol*. 2009;42:1573-80.
6. Huber LS, Hoffmann-Ribani R, Rodriguez-Amaya DB. Quantitative variation in Brazilian vegetable sources of flavonols and flavones. *Food Chem*. 2009;113:1278-82.
7. Hung PV, Maeda T, Miyatake K, Morita N. Total phenolic compounds and antioxidant capacity of wheat graded flours by polishing method. *Food Res Int*. 2009;42:185-90.
8. Nogueira RC, Cerqueira HF, Soares MBP. Patenting bioactive molecules from biodiversity: the Brazilian experience. *Expert Opin Ther Pat*. 2010;20(2):1-13.
9. Pessoa JDC, Leeuwen JV. Development of a shelling method to recover whole kernels of the cutia nut (*Couepia edulis*). *Rev Bras Frutic*. 2006;28(2):236-9.
10. Leandro RC, Yuyama K. Enraizamento de estacas de castanha-de-cutia com uso de ácido indolbutírico. *Acta Amazon*. 2008;38(4):597-602.
11. AOCS. American Oil Chemists' Society. Official and tentative methods of the American Oil Chemists' Society: including additions and revisions. 6. ed. Champaign: AOCS; 2009.
12. Rossell JB. Classical analysis of oils and fats. In: Hamilton RJ, Rossell JB, organizadores. *Analysis of oils and fats*. Londres: Elsevier Applied Science; 1986. p. 1-90.
13. Kornsteiner M, Wagner KH, Elmadfa I. Tocopherols and total phenolics in 10 different nut types. *Food Chem*. 2006;98(2):381-7.
14. Singleton VL, Rossi JAJr. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic*. 1965;16(3):144-58.

15. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 270, de 22 de setembro de 2005. Aprova o regulamento técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 23 set 2005.
16. Codex Alimentarius Commission. Codex-Stan 210: codex standard for named vegetable oils. Roma: FAO/WHO Food Standards; 2009.
17. Ferreira ES, Silveira CS, Lucien VG, Amaral AS. Caracterização físico-química da amêndoa, torta e composição dos ácidos graxos majoritários do óleo bruto da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). *Aliment Nutr*. 2006;17(2):203-8.
18. Queiroga Neto V, Bora PS, Diniz ZN, Cavalheiro JMO, Queiroga KF. *Dipteryx lacunifera* seed oil: characterization and thermal stability. *Cien Agrotec*. 2009;33(6):1601-7.
19. Vanhanen LP, Savage GP. The use of peroxide value as a measure of quality for walnut flour stored at five different temperatures using three different types of packaging. *Food Chem*. 2006;99:64-9.
20. Chaves MH, Barbosa AS, Moita Neto JM, Aued-Pimentel S, Lago JHG. Caracterização química do óleo da amêndoa de *Sterculia striata* ST. HIL. ET NAUD. *Quim Nova*. 2004;27(3):404-8.
21. Arain S, Sherazi STH, Bhangar MI, Talpur FN, Mahesar SA. Oxidative stability assessment of *Bauhinia purpurea* seed oil in comparison to two conventional vegetable oils by differential scanning calorimetry and Rancimat methods. *Thermochim Acta*. 2009;484(1-2):1-3.
22. Amaral JS, Casal S, Pereira JA, Seabra RM, Oliveira BPP. Determination of sterol and fatty acid compositions, oxidative stability, and nutritional value of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars grown in Portugal. *J Agric Food Chem*. 2003;51(26):7698-702.
23. Luzia DMM, Bertanha BJ, Jorge N. Sementes de pitanga (*Eugenia uniflora* L.): potencial antioxidante e perfil de ácidos graxos. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2010;69(2):175-80.
24. Guillén MD, Ruiz A. High resolution ¹H nuclear magnetic resonance in the study of edible oils and fats. *Trends Food Sci Technol*. 2001;12:328-38.
25. Spitzer V, Marx F, Maia JGS, Pfeilsticker K. Identification of conjugated fatty acids in the seed oil of *Acioa edulis* (Prance) syn. *Couepia edulis* (Chrysobalanaceae). *J Am Oil Chem Soc*. 1991;68:183-9.
26. Schmidt S, Pokorný J. Potential application of oilseeds as sources of antioxidants for food lipids: a review. *Czech J Food Sci*. 2005;23(3):93-102.
27. Siger A, Nogala-Kalucka M, Lampart-Szczapa E. The content and antioxidant activity of phenolic compounds in cold-pressed plant oils. *J Food Lipids*. 2008;15(2):137-49.
28. Koski A, Psomiadou E, Tsimidou M, Hopia A, Kefalas P, Wähälä K, Heinonen M. Oxidative stability and minor constituents of virgin olive oil and cold-pressed rapeseed oil. *Eur Food Res Technol*. 2002;214(4):294-8.
29. Alasalvar C, Shahidi F. Natural antioxidants in tree nuts. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2009;111(11):1056-62.

Determinação de amins biogênicas em diferentes tipos de queijos por cromatografia líquida de alta eficiência

Determination of biogenic amines in different types of cheese by high-performance liquid chromatography

RIALA6/1435

Fernanda Lima CUNHA*, Carlos Adam CONTE JUNIOR, César Aquiles LÁZARO, Lucas Rabaça dos SANTOS, Eliane Teixeira MÁRSICO, Sérgio Borges MANO

* Endereço para correspondência: Departamento de Tecnologia dos Alimentos, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense. Rua Vital Brazil Filho, 64, Niterói, RJ, CEP 24.230-340. E-mail: nandavetuff@yahoo.com.br.

Recebido: 25.07.2011 - Aceito para publicação: 16.02.2012

RESUMO

As amins biogênicas (cadaverina, espermidina, histamina, putrescina e tiramina) foram determinadas e quantificadas em quatro diferentes tipos de queijos utilizando-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para realizar o estudo, foram adquiridas 10 amostras de cada tipo de queijo – gouda, minas frescal, mozzarella e prato – no mercado varejista do Rio de Janeiro. As 40 amostras passaram pelas etapas de extração e derivatização das amins biogênicas, as quais foram detectadas e quantificadas por CLAE-UV. Para avaliar as diferenças entre os queijos, foram aplicados a análise de variância Anova e o teste de Tukey. Dentre os queijos estudados, o minas frescal apresentou os mais baixos teores de amins biogênicas (24,26 mg.kg⁻¹), e os teores mais elevados (489,15 mg.kg⁻¹) foram detectados no gouda. Das amins biogênicas analisadas, a tiramina foi a que demonstrou concentrações mais elevadas (623,60 mg.kg⁻¹), e a espermidina, as menores concentrações (0,80 mg.kg⁻¹). Considerando-se os quatro tipos de queijos estudados, o gouda parece ser o que requer maiores cuidados com relação ao monitoramento da presença de amins biogênicas. A metodologia mostrou-se eficaz para efetuar a detecção e a quantificação das amins biogênicas nos queijos estudados.

Palavras-chave. queijos, amins biogênicas, CLAE.

ABSTRACT

This study aimed at detecting and quantifying biogenic amines (cadaverine, spermidine, histamine, putrescine and tyramine) in four different types of cheese using high-performance liquid chromatography (HPLC). For this study, ten samples of gouda, minas, mozzarella and prato, four types of cheese, were purchased in retail markets of Rio de Janeiro. Biogenic amines were previously extracted and derivatized; then, these amines were detected and quantified by HPLC-UV. For assessing differences among the analyzed cheeses, data were submitted to Anova and Tukey's test. *Minas* cheese showed the lowest amount of amine (24.26 mg.kg⁻¹), and the highest contents (489.15 mg.kg⁻¹) were found in gouda. As for the investigated biogenic amines, tyramine showed the highest concentrations (623.60 mg.kg⁻¹), and spermidine was found at the lowest concentration (0.80 mg.kg⁻¹) in all four types of cheese. This study indicates that gouda seems to demand a much more careful monitoring of biogenic amines in the analyzed cheese samples. Also, the methodology was effective for detecting and quantifying biogenic amines in all studied cheese samples.

Keywords. cheese, biogenic amines, HPLC.

INTRODUÇÃO

Aminas biogênicas são bases orgânicas de baixo peso molecular, de importância biológica em vegetais, animais e células microbianas, formadas principalmente por descarboxilação microbiana de aminoácidos e transaminação de aldeídos e cetonas¹. A presença de amins biogênicas é uma condição inerente ao processamento tecnológico de vários alimentos que contenham proteínas ou aminoácidos livres e que estejam sujeitos a condições que permitam a atividade microbiana e/ou bioquímica².

As amins podem ser classificadas de acordo com o número de grupos amínicos em: monoaminas, diaminas e poliaminas. Quanto à estrutura química, são classificadas em aromáticas (histamina, tiramina, feniletilamina, triptamina, serotonina, dopamina e octopamina), diaminas alifáticas (putrescina e cadaverina), poliaminas alifáticas (agmatina, espermina e espermidina) e heterocíclicas (histamina, triptamina, serotonina)³.

O estudo de amins biogênicas em alimentos apresenta correlação direta com a qualidade da matriz alimentar e a saúde do consumidor. Questões relacionadas à saúde envolvem, em particular, a intoxicação histamínica, com sintomatologia variada de acordo com a quantidade ingerida e a sensibilidade do indivíduo. Os principais sintomas são náuseas, vômitos, diarreia, dor abdominal, edema cutâneo, urticária, hipotensão, cefaleia, vertigens, rubor e ardência na boca⁴. Em casos graves, em curto espaço de tempo, podem ocorrer dores torácicas e distúrbios respiratórios⁵. Na presença de nitritos, as amins podem formar N-nitrosaminas, as quais têm ação carcinogênica, mutagênica e teratogênica⁶.

Entre as amins biogênicas, a ação da tiramina é particularmente importante, uma vez que a intoxicação por ela desencadeia crises hipertensivas e enxaquecoides, náuseas, vômito, angústia respiratória e palpitação⁷. Os riscos da ingestão de alimentos com amins biogênicas podem ser maiores se os sistemas enzimáticos estiverem bloqueados por inibidores da mono ou diamino oxidase, ou se o indivíduo for portador de doenças gastrointestinais, deficiências genéticas, ou houver fatores de potencialização, como o consumo de álcool⁸.

No Brasil, o setor de laticínios tem grande importância socioeconômica, em especial na fabricação de queijos. Este mercado ocupa atualmente o sexto lugar na produção mundial⁹, oferecendo ainda uma infinidade

de produtos lácteos atendendo aos interesses específicos de certos grupos de consumidores que buscam produtos saudáveis e que não causem risco à saúde dos mesmos¹⁰.

O processo de maturação decorrente do processamento tecnológico produz alterações de textura e sabor, associadas principalmente à proteólise da caseína, resultando em aumento no teor de aminoácidos livres¹¹, que, por ação de descarboxilases bacterianas, produzem amins biogênicas^{12,13}. Micro-organismos com atividade descarboxilase podem estar relacionados à utilização de culturas "starter"¹⁴, ou micro-organismos contaminantes provenientes do leite ou do processo de obtenção tecnológica do queijo¹⁵. É possível também utilizar a determinação de amins biogênicas como parâmetro de qualidade no processo de fabricação¹⁶, ou como indicador do grau de proteólise, característico de alguns tipos de queijos especiais¹⁷.

Várias técnicas analíticas, como eletroforese capilar (EC), cromatografia em camada delgada (CCD)¹⁸, cromatografia gasosa (CG)¹⁹, cromatografia de troca iônica²⁰ e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)¹⁶, têm sido propostas para a determinação de amins biogênicas em matrizes alimentares. Dentre as técnicas citadas, a CLAE em fase reversa é considerada a mais adequada²¹.

Este trabalho justifica-se devido à importância da determinação e da quantificação das amins biogênicas em queijos para a saúde pública e pela carência de literatura abordando esse tema no Brasil. Com isso, os resultados obtidos neste estudo irão fornecer à comunidade técnico-científica informações sobre qual dos queijos estudados possui maior risco ao consumidor, assim como qual das amins biogênicas está presente em maior quantidade em cada tipo de queijo estudado.

O presente estudo teve como objetivo detectar e quantificar as amins biogênicas (cadaverina, espermidina, histamina, putrescina e tiramina) em quatro diferentes tipos de queijos, utilizando a técnica de CLAE, além de verificar se o método utilizado é eficaz para a detecção e a quantificação das amins biogênicas nos queijos analisados.

MATERIAL E MÉTODOS

Padrões e Reagentes

Os padrões utilizados de cadaverina, putrescina, tiramina, espermidina e histamina foram obtidos do Sigma Aldrich; acetonitrila, ácido perclórico, hidróxido

de sódio, éter dietílico da Tedia e água ultrapura, pelo Sistema Simplicity UV Milli-Q (Millipore).

Equipamentos

Utilizou-se um cromatógrafo líquido Shimadzu[®] modelo LC/10 AS acoplado ao detector UV SPD/10 AV, com integrador C-R6A Chromatopack. Empregou-se uma coluna Teknokroma, TR-016057 N26243 Tracer Extrasil ODS2 (15 × 0,46 cm, id. 5 µm) e pré-coluna Supelco, Ascentis C18 (2 × 0,40 cm, id. 5 µm). Foram usados ainda homogenizador Certomat[®] MV, B. Braun Biotech International, centrífuga Hermle Z 360 K, banho ultrassônico Cleaner USC 2800 A, filtro Whatman nº 1 de 150 mm, potenciômetro digital de bancada marca Digimed[®] modelo DM 22 e seringa Hamilton microliter modelo TM 705 de 50 µL.

Condições cromatográficas

Foi utilizado um fluxo de 1 mL.min⁻¹, com fase móvel isocrática de acetonitrila:água 42:58 (v:v). O volume de injeção foi de 20 µL. O detector UV foi programado a 198 nm. O tempo de corrida para cada amostra foi de 15 minutos.

Validação do método

O limite de detecção (LOD), o limite de quantificação (LOQ) e a recuperação foram realizados de acordo com as Orientações sobre Validação de Métodos Analíticos, do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia²².

Obtenção das amostras

Foram analisadas dez amostras de quatro diferentes tipos de queijo – gouda, minas frescal, mozzarella e prato –, totalizando 40 amostras, no período de janeiro a março de 2011, as quais foram adquiridas no comércio varejista do município do Rio de Janeiro e transportadas em caixa isotérmica com gelo até o laboratório, onde permaneceram sob refrigeração até o início das análises.

Extração e derivatização das aminas biogênicas

Para o processo de extração das aminas, foram pesados 5 gramas da amostra, adicionados de solução a 5% de HClO₄ 1:1 (v:p), e vigorosamente homogeneizados por 2 minutos. A mistura foi mantida por 1 hora sob refrigeração (4 ± 2 °C), com agitação periódica e, em seguida, centrifugada por 503 g por dez minutos a 4 ± 1 °C. O sobrenadante foi submetido a uma primeira

filtração (Whatman nº 1), seguida da adição de hidróxido de sódio 2 N até atingir pH > 6. Logo após, a mistura permaneceu em banho de gelo por 20 minutos e realizou-se uma segunda filtragem em condições similares. As amostras foram adicionadas de hidróxido de sódio 2 N até pH > 12, e, em seguida, realizou-se a derivatização com adição de 40 µL de cloreto de benzoíla. A mistura foi homogeneizada por 15 segundos e mantida em repouso por 20 minutos à temperatura ambiente. Adicionou-se 1 mL de éter dietílico, por duas vezes consecutivas, aproveitando-se a fase etérea (sobrenadante). Evaporou-se o éter em corrente de nitrogênio e ressuspendeu-se em 500 µL da fase móvel.

Quantificação das aminas biogênicas

Foi realizado o método de padrão externo, para o qual as soluções-estoque dos padrões de cada amina biogênica (cadaverina, espermidina, histamina, putrescina e tiramina) foram preparadas em HCl 0,1 N, e em seguida realizaram-se a derivatização e a análise dos padrões conforme se fez com as amostras.

Análise estatística

Os resultados obtidos foram tratados por análise de variância (Anova) e posterior diferença de média pelo teste de Tukey utilizando o programa GraphPad Prism 5.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No método utilizado, foram obtidos os seguintes tempos de retenção em minutos para cada amina: tiramina (3,3), putrescina (4,3), cadaverina (5,3), espermidina (6,5) e histamina (11,4). O LOD e o LOQ para as aminas estudadas variaram de 0,03 a 1,30 mg.L⁻¹ e de 0,20 a 5,00 mg.L⁻¹, respectivamente. A recuperação para estas aminas variou de 91% a 107%.

A Figura 1 apresenta teor médio de aminas biogênicas (putrescina, cadaverina, tiramina, histamina e espermidina em mg.kg⁻¹) em queijos gouda, mozzarella, prato e minas. O queijo minas frescal apresentou baixos teores de aminas. Esta ocorrência parece estar relacionada principalmente com o fato de não ser um produto maturado, fator que não favorece a formação de aminas, sendo a produção limitada às etapas de transporte e estocagem²³.

Comparando-se a concentração das aminas em cada tipo de queijo analisado, observou-se que a concentração de putrescina no gouda foi estatisticamente (p < 0,01) superior à dos queijos minas, mozzarella e

prato. Outro resultado expressivo foi observado na concentração de tiramina ($361,99 \text{ mg.kg}^{-1}$) e histamina ($79,13 \text{ mg.kg}^{-1}$) no gouda. A tiramina presente neste queijo foi estatisticamente ($p < 0,01$) superior, com relação tanto à concentração das demais aminas presentes (73,84%) como à concentração de tiramina dos queijos minas frescal e mozzarella. É importante salientar que concentrações de aminas biogênicas de $100\text{-}1.000 \text{ mg.kg}^{-1}$ ou superiores podem ter consequências para a saúde dos consumidores, principalmente em pacientes submetidos a tratamento com medicamentos inibidores da mono ou diamino oxidase²³. Outros autores encontraram resultados semelhantes de histamina analisando queijo gouda ($76,5 \text{ mg.kg}^{-1}$), no entanto, encontraram resultados inferiores de tiramina ($95,5 \text{ mg.kg}^{-1}$) analisando o mesmo tipo de queijo²⁴. Essa diferença pode ser explicada primeiramente pelas condições higiênicas do leite, uma vez que estes micro-organismos, com atividade descarboxilase, podem contaminar o leite em sua obtenção assim como no processamento tecnológico do queijo¹⁵. Outra possível causa seria a utilização de culturas “*starter*” diferentes¹⁴. Outra justificativa para os diferentes resultados seria a variação da composição proteica do leite, que pode ocorrer devido a estação do ano, nutrição, sanidade animal e estágio de lactação^{25,26}.

Assim como outros queijos maturados, o gouda contém altos níveis de aminas biogênicas e está entre os queijos mais frequentemente envolvidos em episódios de intoxicação histamínica. Queijos contendo 10 mg de histamina em 100 g de amostra podem causar intoxicação por histamina; $10\text{-}80 \text{ mg}$ de tiramina podem causar “a reação do queijo” (6 mg , se o paciente estiver sendo tratado com inibidores da MAO)^{12,27}, que pode ser definida como uma crise hipertensiva, acompanhada de severa dor de cabeça, observada após a ingestão de alimentos ricos em tiramina²⁸.

A Figura 2 apresenta a porcentagem de aminas biogênicas (tiramina, putrescina, cadaverina, espermidina, espermina e histamina) por queijo estudado. No mozzarella, entre as aminas determinadas, $56,70\%$ foi tiramina ($96,28 \text{ mg.kg}^{-1}$) e $42,23\%$ foi histamina ($71,70 \text{ mg.kg}^{-1}$). No queijo prato, foi observado $81,62\%$ de tiramina ($152,91 \text{ mg.kg}^{-1}$). Esses resultados permitem estabelecer uma correlação com dados da literatura referentes a surtos de intoxicação por histamina relatados após o consumo de queijo e peixe². A histamina é considerada a amina mais tóxica detectada nos alimentos²⁹, exercendo esse efeito ao interagir com dois

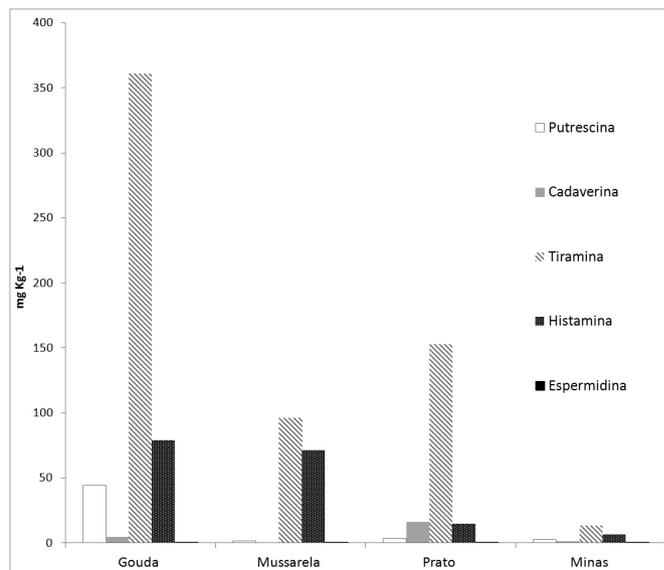


Figura 1. Representação gráfica do teor médio de aminas biogênicas (putrescina, cadaverina, tiramina, histamina e espermidina em mg.kg^{-1}) em queijos gouda, mozzarella, prato e minas

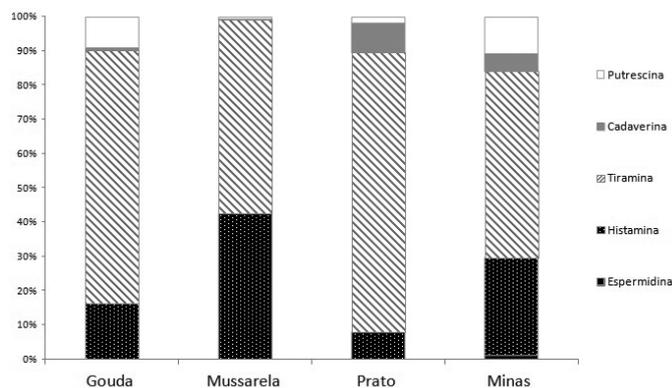


Figura 2. Representação gráfica (%) de aminas biogênicas (tiramina, putrescina, cadaverina, espermidina, espermina e histamina) por queijo estudado

tipos de receptores (H e Hz) nas membranas celulares dos seres humanos e outras espécies. A histamina causa dilatação dos vasos sanguíneos periféricos, vasos capilares e artérias, resultando em hipotensão, rubor e cefaleia³⁰, e induz a contração da musculatura lisa intestinal mediada por receptores H, responsáveis por cólicas abdominais, diarreia e vômito³¹. Os efeitos toxicológicos dependem da concentração de histamina ingerida, da presença de outras aminas, da atividade amino-oxidase e da fisiologia intestinal do indivíduo³².

Outro achado importante foi a alta concentração de tiramina encontrada nos queijos de maior maturação,

Tabela 1. Teor médio e porcentagem aproximada de aminas biogênicas (putrescina, cadaverina, tiramina, histamina e espermidina) em amostras de queijos Gouda, Mussarela, Prato e Minas

Aminas biogênicas	Gouda		Mussarela		Prato		Minas		Total (mg.kg ⁻¹)
	Média (mg.kg ⁻¹)	%							
Putrescina	44,10 ^a	9,02	1,34 ^b	0,79	3,29 ^b	1,76	2,60 ^b	10,74	51,34
Cadaverina	4,48 ^a	0,92	0,30 ^b	0,18	16,18 ^c	8,64	1,30 ^a	5,35	22,26
Tiramina	361,19 ^a	73,84	96,28 ^b	56,70	152,91 ^b	81,62	13,21 ^c	54,44	623,60
Histamina	79,13 ^a	16,18	71,70 ^a	42,23	14,82 ^b	7,91	6,90 ^b	28,42	172,55
Espermidina	0,24 ^a	0,05	0,18 ^a	0,11	0,13 ^a	0,07	0,25 ^a	1,05	0,80
Total	489,15 ^a	100	169,80 ^{bc}	100	187,35 ^b	100	24,26 ^c	100	

Valores médios de dez determinações amostrais de cada tipo de queijo estudado. Valores na mesma linha com diferentes letras minúsculas são significativamente diferentes ($p < 0,05$)

como gouda, prato e mozzarella (361,19 mg.kg⁻¹, 152,91 mg.kg⁻¹ e 96,28 mg.kg⁻¹, respectivamente). A tiramina, do ponto de vista toxicológico, é uma importante amina biogênica, formada pela ação da tirosina descarboxilase, produzida por bactérias presentes em alimentos. Contudo, os mecanismos de desintoxicação no homem podem ser insuficientes nos casos de alta ingestão, por pessoas alérgicas e por pacientes que fazem uso de drogas como os medicamentos anti-parkinsonianos e antidepressivos².

Quando estudados os totais de aminas biogênicas presentes nos queijos analisados, observou-se diferença estatística ($p < 0,05$). O gouda apresenta maiores quantidades de aminas ($p < 0,05$) do que os outros queijos estudados. Essa diferença pode ser explicada porque é o queijo que possui maior tempo de maturação entre os analisados (mínimo de 60 dias de maturação)³³. Não se verificou diferença significativa entre os queijos minas e mozzarella, assim como entre mozzarella e prato. Contudo, quando comparados os queijos minas e prato, encontraram-se quantidades totais de aminas diferentes ($p < 0,05$). Este fato pode também ser explicado devido à diferença do processamento tecnológico dos queijos. O queijo minas é um produto frescal e não sofre maturação³³, já o mozzarella tem período de maturação mínimo de 24 horas³⁴. Por outro lado, o queijo prato apresenta tempo de maturação mínimo de 25 dias³⁵.

A tiramina está incluída no grupo das aminas vasoativas, atuando indiretamente na liberação de noradrenalina do sistema nervoso simpático, provocando aumento da pressão arterial periférica, vasoconstrição e aumento do débito cardíaco¹¹. Esta amina também

provoca dilatação das pupilas, do tecido palpebral, lacrimejamento, salivação, aumento da respiração e dos níveis de glicose sanguínea. A enzima monoamino oxidase desempenha papel importante na degradação das aminas biogênicas³⁶. No homem, o uso de medicamentos para o tratamento de transtornos mentais e depressão elimina esse processo de desintoxicação. Assim, altas concentrações de aminas, como a tiramina proveniente de alimentos, acumuladas no sangue podem levar a uma crise hipertensiva desses pacientes³⁷.

A espermidina foi encontrada em baixas concentrações em todos os queijos, e não houve diferença estatística entre os mesmos. As poliaminas, como putrescina, espermidina, espermina e cadaverina, são componentes indispensáveis às células vivas, importantes na regulação da função dos ácidos nucleicos, na síntese de proteínas e na estabilização de membranas¹². Poliaminas, como a putrescina, a espermidina e a cadaverina, não são comumente relacionadas com efeitos adversos sobre a saúde. No entanto, podem reagir com nitrito, dando origem a nitrosaminas (substâncias com atividade carcinogênica), e estão relacionadas com a perda de qualidade, pela degradação dos aminoácidos precursores, sendo indicadores de deterioração ou maturação³⁸. Também favorecem a absorção intestinal e diminuem o catabolismo da histamina, potencializando sua toxicidade³⁹.

CONCLUSÃO

O método utilizado mostrou-se eficaz para a detecção e a quantificação das aminas biogênicas nos

queijos analisados, podendo ser usado no controle de qualidade e/ou fiscalização, para que sejam produzidos e comercializados alimentos dentro dos limites seguros.

Dentre os queijos estudados, o gouda parece ser o que requer maiores cuidados com relação à monitorização da presença de amins biogênicas, sendo a tiramina a amina que apresentou os maiores teores neste tipo de queijo. Além disso, este estudo demonstrou que a tiramina também apresentou elevadas concentrações quando comparadas às outras amins biogênicas nos outros queijos analisados.

A identificação e a quantificação de amins biogênicas em queijos são de fundamental importância, para se evitarem possíveis casos de intoxicação de indivíduos que venham a consumir estes produtos. Aliado a isso, é necessário a divulgação das consequências da ingestão de queijos contendo amins biogênicas para prevenir doenças crônicas, como o câncer, ou agudas, como crises enxaquecoides, principalmente em indivíduos mais sensíveis, alérgicos ou que estejam fazendo uso de medicamentos inibidores da MAO.

REFERÊNCIAS

1. Pintado AIE, Pinho O, Ferreira IMPLVO, Pintado MME, Gomes AMP, Malcata FX. Microbiological, biochemical and biogenic amine profiles of Terrincho cheese manufactured in several dairy farms. *Int Dairy J*. 2008;18:631-40.
2. Silla-Santos MH. Biogenic amines: their importance in foods. *Int J Food Microbiol*. 1996;29:213-31.
3. Mariné-Font A. Les amines biogènes en els aliments: història i recerca en el marc de les ciències de l'alimentació. Barcelona: Institut d'estudis Catalans; 2005.
4. Carmo FBT, Mársico ET, São Clemente SC, Carmo RP, Freitas MQ. Histamina em conservas de sardinha. *Cien Anim Bras*. 2010;11(1):174-80.
5. Russel FE, Maretic Z. Scombroid Poisoning: mini review case histories. *Toxicol*. 1986;24(10):967-73.
6. Komprda T, Smělá D, Pechová P, Kalhotka L, Štencl J, Klejduš B. Effect of starter culture, spice mix and storage time and temperature on biogenic amine content of dry fermented sausages. *Meat Sci*. 2004;67(4):607-16.
7. Chiacchierini ED, Restuccia D, Vinci G. Evaluation of two different extraction methods for chromatographic determination of bioactive amines in tomato products. *Talanta*. 2005;69(3):548-55.
8. Onal A. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chem*. 2007;103:1475-86.
9. Santos VAQ, Hoffmann FL. Evolução da microbiota contaminante em linha de processamento de queijos minas frescal e ricota. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2010;69(1):38-46.
10. Dias SS, Lobato V, Verruma-Bernardi MR. Metodologias para identificar adulteração em queijos produzidos com leite de diferentes espécies de animais. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2009;68(3):327-33.
11. Joosten HMLG, Olieman C. Determination of biogenic amines in cheese and some other food products by high-performance liquid chromatography in combination with thermosensitized reaction detection. *J Chromatogr*. 1986;356:311-19.
12. Halász A, Barath A, Simon-Sarkadi L, Holzapfel W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends Food Sci Technol*. 1994;5(2):42-9.
13. El-Sayed MM. Biogenic amines in processed cheese available in Egypt. *Int Dairy J*. 1996;6(11-12):1079-86.
14. Fernandez-Garcia EJT, Nunez M. Formation of biogenic amines in raw milk hispanico cheese manufactured with proteinases and different levels of starter culture. *J Food Prot*. 2000;63:1551-5.
15. Roig-Sagues AX, Molina AP, Hernandez-Herrero MM. Histamine and tyramine-forming microorganisms in Spanish traditional cheeses. *Eur Food Res Technol*. 2002;215:96-100.
16. Mah JH, Han HK, Oh YJ, Kim MG, Hwang HJSD. Biogenic amines in jetkoals Korean salted and fermented fish products. *Food Chem*. 2002;79:239-43.
17. Innocente N, D'Agostin P. Formation of biogenic amines in typical semi hard Italian cheese. *J Food Prot*. 2002;65:1498-01.
18. Shalaby AR. Multidetecção semi quantitativa method for determining biogenic amines in foods. *Food Chem*. 1995;52:367-72.
19. Perez-Martin RI, Franco JM, Molist P, Gallardo JM. Gas chromatographic method for the determination of volatile amines in sea foods. *Int J Food Sci Tech*. 1987;5:509-14.
20. Standara S, Vesela ME, Drdak M. Determination of biogenic amines in cheese by ion exchange chromatography. *Nahrung*. 2000;44:28-31.
21. Moret SE, Conte L. High-performance liquid chromatographic evaluation of biogenic amines in foods. Analysis of different methods of sample preparation in relation to food characteristics. *J Chromatogr*. 1996;729:363-9.
22. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – Inmetro. Orientações sobre Validação de Métodos Analíticos. DOQ-CGCRE-008, Revisão: 03, 2010.
23. Custódio FB. Eficiência e seletividade de diferentes métodos de extração, purificação e detecção de histamina e tiramina em queijo ralado. [tese de doutorado]. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais; 2006.
24. Ibrahim EMA, Amer AMA. Comparison of biogenic amines levels in different processed cheese varieties with regulatory specifications. *WJ Dairy Food Sci*. 2010;5(2):127-33.
25. Heck JML, Schennink A, Van Valenberg HJF, Bovenhuis H, Visker MHPW, van Arendonk JAM, van Hooijdonk ACM. Effects of milk protein variants on the protein composition of bovine milk. *J Dairy Sci*. 2009;92:1192-1202.
26. Golinelli LP, Conte-Junior CA, Paschoalin VMF, Silva JT. Proteomic analysis of whey from bovine colostrum and mature milk. *Braz Arch Biol Technol*. 2011;54(4):761-68.
27. Chang SF, Ayres JW, Sandine WE. Analysis of cheese for histamine, tyramine, tryptamine, histidine, tyrosine and tryptophan. *J Dairy Sci*. 1985;68:2840-6.

28. Dadáková E, Krížek M, Pelikánová T. Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). *Food Chem*. 2009;116:365-70.
29. Brink B, Ten D, Joosten HMLJ, Huis IV. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *Int J Food Microbiol*. 1990;11:73-84.
30. Stratton JE, Hutkins RW, Taylor SL. Biogenic amines in cheese and other fermented foods, A review. *J Food Prot*. 1991;54:460-70.
31. Taylor SL. Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects. *Crit Rev Toxicol*. 1986;17:91-128.
32. Clifford MN, Walker R, Wright J, Hardy R, Murray CK. Studies with volunteers on the role of histamine in suspected scombrototoxicosis. *J Sci Food Agric*. 1989;47:365-75.
33. Perry KSP. Queijos: Aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. *Quim Nova*. 2004;27(2):293-300.
34. Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria n. 364, de 4 de setembro de 1997. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Queijo Mozzarella (Muzzarella ou Mussarela). 1997.
35. Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria n. 358, de 4 de setembro de 1997. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Queijo Prato. 1997.
36. Joosten HMLG. The biogenic amine contents of Dutch cheese and their toxicological significance. *Neth Milk Dairy J*. 1988;42(1):25-42.
37. Til HP, Falke HE, Prinsen MK, Willems M.I. Acute and subacute toxicity of tyramine, spermidine, putrescine and cadaverine in rats. *Food Chem Toxicol*. 1997;35:337-48.
38. Hernandez-Jover T, Izquierdo-Pulido M, Veciana-Nogues MT, Marine-Font AE, Vidal-Carou MC. Biogenic amines and polyamine contents in meat and meat products. *J Agric Food Chem*. 1997;45:2098-102.
39. Bardócz S. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. *Trends Food Sci Technol*. 1995;6(10):341-6.

Propriedades morfológicas e funcionais e outras características da pasta do amido nativo e oxidado da amêndoa do caroço de manga (*Mangifera indica* L.), variedade Tommy Atkins

Morphological and functional characteristics and other properties of the native and oxidized starch paste produced from mango kernels of Tommy Atkins variety

RIALA6/1436

Marianne Louise Marinho MENDES*, Pushkar Singh BORA, Ana Paula Louira RIBEIRO

*Endereço para correspondência: Departamento de Tecnologia Química e de Alimentos, Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, Brasil. Campus Universitário I, João Pessoa, PB, Brasil, Cidade Universitária, CEP 58051-900. Tel: (83) 3216-7378. E-mail: marianne.marinho@gmail.com.

Recebido: 17.08.2011 - Aceito para publicação: 08.02.2012

RESUMO

Após o processamento industrial da manga, o caroço e a casca são normalmente descartados sem que haja um devido aproveitamento. Neste trabalho, foram investigadas as características morfológicas e funcionais e as propriedades da pasta dos amidos nativo e oxidado do caroço (amêndoa) de manga, da variedade Tommy Atkins, para pesquisar uma nova fonte de amido, as formas de melhoria e contribuir na utilização de resíduos da indústria alimentícia. Na composição centesimal, o extrato amiláceo apresentou 71,56% de amido, 7,30% de lipídeos, 5,6% de proteínas e umidade de 10,3%. Os percentuais de carbonila e carboxilas foram, respectivamente, 0,05% e 0,09%. A oxidação não alterou visivelmente os grânulos de amido. O poder de intumescimento e a solubilidade mostraram-se dependentes da temperatura e do pH, e o maior valor foi verificado no amido oxidado a 95 °C (13,112 g/g). O amido oxidado apresentou maior capacidade de absorção de água (105,97%), e a maior capacidade de absorção de óleo foi encontrada no amido nativo (59,78%). Quanto às propriedades de pasta, verificou-se o aumento da temperatura de pasta, do pico de viscosidade, da viscosidade mínima, da quebra de viscosidade, da viscosidade final e da tendência para retrogradação do amido oxidado em relação ao nativo. Pelas propriedades avaliadas, ambos os amidos podem ter aplicação na indústria alimentícia.

Palavras-chaves. manga, caroço, amido, oxidação.

ABSTRACT

After mango industrial processing, the kernel and the peel are usually discarded without being suitably used. This study investigates the morphological and functional characteristics, and other properties of native and oxidized starch paste prepared from the seed (kernel) of Tommy Atkins variety mango, aiming at finding a potential source of starch, at ways to improving it and to supporting the use of residues from the food industry. The starchy extract showed 71.56% of starch, 7.30% of lipids, 5.6% of proteins and 10.30% of moisture. The percentage of carbonyl and carboxyl groups was of 0.05% and 0.09%, respectively. Oxidation did not notably change the granules of native and modified starch. Swelling capacity and solubility were shown to be dependent on temperature and pH for both starches, and the highest value was observed in oxidized starch at 95 °C (13.112 g/g). Oxidized starch showed the highest water absorption capacity (105.97%), and the highest oil absorption capacity (59.78%) was found in native starch. The following paste properties were observed: an increase in paste temperature, peak viscosity, hold, breakdown, final viscosity and setback of the oxidized starch when compared to native one. According to the properties evaluated, both starches might be applicable in food industry.

Keywords. mango, kernel, starch, oxidation.

INTRODUÇÃO

A manga (*Mangifera indica* L.) é um dos frutos mais favorecidos, com valor comercial cada vez mais crescente nos trópicos, sendo usado em uma grande variedade de alimentos e produtos¹. No entanto, aproximadamente 40% a 60% desse fruto são perdidos durante seu processamento industrial, sendo que 12% a 15% constituem-se de pele (casca) e 15% a 20% de caroço².

Dependendo da variedade, as amêndoas dos caroços de manga contêm cerca de 6,0% de proteínas, 11% de lipídeos, 77% de carboidratos, 2% de fibras e 2% de cinzas, baseados em seu peso seco³. Atualmente, a manga variedade Tommy Atkins é a mais produzida e a que possui a maior participação no volume comercializado no mundo, devido principalmente a sua coloração intensa, produções elevadas e resistência ao transporte a longas distâncias⁴.

O amido é uma fonte energética de grande destaque na alimentação humana. Tal composto é o principal carboidrato de reserva produzido pelas plantas e consumido pelo homem. O fato de ser armazenado em grânulos insolúveis em água e de ser facilmente extraível torna-o único na natureza, com ampla possibilidade de utilização diretamente na dieta humana ou na indústria alimentícia⁵. Este constituinte contribui consideravelmente para as propriedades de textura de muitos alimentos e tem várias aplicações industriais, como espessante, estabilizante coloidal, geleificante, agente de volume, retentor de água e agente de viscosidade.

Entretanto, muitos amidos em sua forma nativa apresentam limitações que os tornam menos adequados para a diversidade de aplicações requeridas. Por essa razão, algumas vezes, o amido utilizado como alimento ou para outros fins industriais tem de ser modificado (química, física, enzimaticamente) antes de sua utilização, com o objetivo de melhorar e aperfeiçoar as propriedades físicas do polímero em consonância com sua aplicação específica⁶.

Os amidos oxidados são obtidos por tratamento de suspensões de grânulos de amido com um agente oxidante, como hipoclorito de sódio ou cálcio, peróxido de hidrogênio, persulfato de amônio, permanganato de potássio, cloridrato de sódio, perboratos e ácido hipocloroso⁷. Para que essa modificação ocorra, há necessidade de três elementos básicos: um reagente oxidante, controle de temperatura e controle de pH. Com essa alteração, ocorrem modificações estruturais, principalmente a formação de grupos carbonila e/ou carboxila.

Esses amidos despertam bastante interesse pela sua ampla aplicação nas indústrias alimentícia, têxtil e papelreira, pois apresentam propriedades de superfície interessantes. Para produtos alimentícios, podem ser utilizados por apresentarem sabor neutro e baixa viscosidade em alimentos ácidos, como molhos para saladas e maioneses. Também atuam como agentes de cobertura e impermeabilizantes, como emulsificantes, podendo servir como substitutos de goma arábica e como agentes ligantes em sistemas líquidos que se aplicam na superfície de alimentos⁸.

Há na literatura diversos trabalhos sobre amidos oxidados provenientes de fontes de amido convencionais. Contudo, quando se trata do amido extraído de caroços (sementes) de manga, que é uma fonte não convencional em potencial, verifica-se inexistência de pesquisas sobre o tema. A descoberta de formas para aproveitar os resíduos da industrialização deste fruto e a viabilização de novas fontes de amido podem constituir uma relevante contribuição para a indústria alimentícia. Diante do exposto, realizou-se na presente pesquisa a investigação das características morfológicas e funcionais e das propriedades de pasta dos amidos nativo e oxidado extraído do caroço (semente) de manga, variedade Tommy Atkins, com o intuito de estudar uma nova fonte de amido, maneiras de otimizá-la, bem como contribuir ecologicamente para o aproveitamento de resíduos da indústria alimentícia.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

A matéria-prima alvo desta pesquisa foi o amido extraído de amêndoas retiradas dos caroços de manga (*Mangifera indicans* L.), variedade Tommy Atkins. As mangas foram adquiridas na Empresa Paraibana de Abastecimento e Serviços Agrícolas (Empasa), na cidade de João Pessoa-PB. No entanto, conforme relato dos fornecedores, eram provenientes do Polo Irrigado Petrolina-PE/Juazeiro-BA (região do Submédio São Francisco). As análises, excetuando-se as de propriedades de pasta, foram realizadas nos Laboratórios do Departamento de Tecnologia Química e de Alimentos do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

Extração do amido

As amêndoas dos caroços de manga foram retiradas manualmente e, a seguir, prosseguiu-se à

extração do amido, conforme a metodologia de Loos, Hood e Graham⁹. O material cortado em pequenos pedaços foi imerso durante 48 horas em solução de metabissulfito de sódio (0,2%). Seguidamente, as amêndoas foram trituradas em liquidificador doméstico e peneiradas em malha de 200 mesh, sendo submetidas a duas decantações e uma centrifugação, com descarte dos sobrenadantes e recuperação do amido. O extrato amiláceo foi seco em estufa com circulação de ar a 40 °C por 48 horas, peneirado em peneira de 200 mesh e acondicionado em recipientes hermeticamente fechados e sob refrigeração.

Composição centesimal

O amido nativo (bruto) foi avaliado quanto a umidade, cinzas, lipídios, proteínas e teor de amido de acordo com os métodos do Instituto Adolfo Lutz¹⁰.

Tratamento oxidativo

O amido foi modificado por tratamento oxidativo com hipoclorito de sódio, conforme metodologia de Forsell et al.¹¹. Inicialmente, uma solução de amido a 50% foi preparada, ajustando-se o pH para 9,5 com hidróxido de sódio a 2 M. A seguir, 10 g de hipoclorito de sódio foram adicionados lentamente à solução durante um período de 30 minutos. Manteve-se o pH entre 9,0 e 9,5, à temperatura de 30±2 °C e sob agitação constante por 10 minutos. Após a reação, ajustou-se o pH para 7,0 com ácido sulfúrico a 1 M. Recuperou-se o amido por filtração (lavado quatro vezes com água destilada) e secou-se em estufa de circulação de ar a 45 °C por 24 horas. O amido modificado foi peneirado (200 mesh) e armazenado em recipiente fechado sob refrigeração.

Conteúdo de carboxilas

Para a determinação do conteúdo de carboxilas do amido oxidado, foi usado o método de Parovuori et al.¹². 5 gramas do amido oxidado foram suspensos em 25 mL de ácido clorídrico 0,1 M por 40 minutos em temperatura ambiente e mantidos sob agitação mecânica. Após a acidificação, a amostra foi recuperada e lavada exaustivamente com água destilada por meio de filtração, até que o pH da água de lavagem estivesse neutro. A amostra foi transferida para um balão de Erlenmeyer e foram adicionados 300 mL de água destilada. A seguir, a suspensão foi aquecida até ebulição, com agitação contínua, para promover a geleificação do amido. Após esse período, a pasta ainda quente foi titulada com

solução padrão de hidróxido de sódio 0,1 M utilizando-se fenolftaleína como indicador. Para quantificar principalmente os ácidos graxos complexados com a amilose, uma titulação em branco foi determinada. Utilizaram-se 5 gramas do amido nativo para fornecer um valor em branco.

$$\%COOH = (TO - TB) \times mb \times 0,045 \times 100 / PA$$

Onde:

%COOH = percentual de carboxila;

TO = volume gasto na titulação do amido oxidado;

TB = volume gasto na titulação do branco;

mb = molaridade do álcali;

PA = peso da amostra.

Conteúdo de carbonilas

A determinação do conteúdo de carbonilas nas amostras foi realizada conforme descrito por Smith¹³. 2 gramas do amido oxidado foram dissolvidos em 100 mL de água destilada. Essa suspensão foi geleificada em banho-maria e, em seguida, resfriada a 40 °C. Ajustou-se o pH para 3,2 com ácido clorídrico 0,1 M e adicionaram-se 15 mL da solução de hidroxilamina. O recipiente contendo a amostra foi envolvido com papel-alumínio e levado a banho-maria mantido a 40 °C durante 4 horas. Após esse período, a hidroxilamina adicionada foi determinada pela titulação rápida da mistura a pH 3,2 com ácido hidrocloreídrico 0,1 M.

$$\%CO = (TB - TO) \times ma \times 0,028 \times 100 / PA$$

Onde:

%CO = percentual de carbonila;

TB = volume gasto na titulação do branco;

TO = volume gasto na titulação do amido oxidado;

ma = molaridade do ácido;

PA = peso da amostra.

Morfologia do grão de amido

A avaliação da forma e do tamanho dos grãos de amido foi realizada por microscopia óptica em microscópio óptico Anxioscop II - Zeiss. Os parâmetros analisados foram: diâmetro menor e maior dos grânulos, expressos em micrômetros. A referida análise foi feita segundo Schoch, Maywald¹⁴. Em uma lâmina, colocou-se a dispersão de duas gotas de suspensão de 100 mg de amido em 5 mL de solução 1:1 de glicerina/água.

Esta dispersão foi recoberta por uma lamínula. Foram tomadas medidas de 500 grãos, sendo que a visualização ocorreu na objetiva de 40x.

Poder de intumescimento e solubilidade

Foram determinados o poder de intumescimento e a solubilidade em função da temperatura e do pH dos amidos nativo e oxidado. Em função da temperatura, essas variáveis foram determinadas conforme metodologia descrita por Leach, Mccowen e Schoch¹⁵. Já os efeitos do pH na solubilidade e o poder de intumescimento foram investigados usando a metodologia descrita por Lawal¹⁶.

Capacidade de absorção de água e óleo

O método de Beuchat¹⁷ foi usado para determinar a capacidade de absorção de água e óleo dos amidos. Foram adicionados 10 mL de água (destilada) ou do óleo (óleo de soja Soya, Bunge, Indústria Brasileira) a 1 g da amostra. A suspensão foi homogeneizada durante 30 segundos e, em seguida, deixada em repouso por 30 minutos. Posteriormente, os tubos foram fechados e centrifugados por 15 minutos a 3.400 rpm. As paredes externas dos tubos foram secas, e os tubos, pesados. A massa da água ou do óleo absorvidos foi expressa em g/100 g de amido em base seca.

Características das pastas de amido

A determinação das propriedades de pasta ocorreu em equipamento RVA – Rapid Visco Analyser (Newport Scientific) do Laboratório de Cereais, Raízes e Tubérculos da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA), localizado na Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), em Campinas-SP.

As amostras, na concentração de 10%, foram submetidas à temperatura de 50 °C por 1 minuto e depois aquecidas até 95 °C em uma taxa de 6 °C/min, permanecendo nessa temperatura por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram resfriadas até 50 °C à taxa de 6 °C/min. Nesta análise, foram obtidos os valores de temperatura de pasta, de viscosidade máxima, mínima e final, de quebra de viscosidade (diferença entre a viscosidade máxima e a mínima) e de tendência a retrogradação (diferença entre a viscosidade final e a mínima).

Análise estatística

Aos dados da composição centesimal e propriedades funcionais foi aplicada a estatística descritiva, com observação das médias e desvio-padrão

de três repetições. Às propriedades funcionais aplicaram-se a análise de variância (Anova) e o teste de Tukey ao nível de 5% de significância para comparação entre as médias obtidas. As análises foram realizadas pelo programa estatístico SigmaStat 3.5.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Composição centesimal do amido

A Tabela 1 apresenta os resultados referentes à composição centesimal do amido extraído do caroço (semente) de manga, variedade Tommy Atkins.

Tabela 1. Composição centesimal do amido nativo extraído das amêndoas das sementes de manga

Constituintes	Quantidades (g/100 g) *
Amido	71,56 ± 1,030
Umidade	10,30 ± 0,005
Lipídeos	7,30 ± 0,201
Proteínas (N × 6,25)	5,60 ± 0,250
Cinzas	0,40 ± 0,170
Outros componentes (por diferença)	4,84

* Cada valor representa a média e o desvio-padrão de três determinações.

O valor encontrado de amido (71,56 g/100 g) foi inferior ao encontrado por Rengsutthi, Charoenrein¹⁸ (99,65 g/100 g), estudando amido de sementes de jaca. Batista, Silva e Liberato¹⁹ encontraram valores de 86,97 e 86,62 g/100 g para carboidratos em amidos convencionais de milho e trigo, respectivamente. Os primeiros autores encontraram ainda, para amido da semente de jaca, valores de proteínas (0,09 g/100 g), lipídeos (0,03 g/100 g) e cinzas (0,04 g/100 g) bem inferiores aos detectados no amido deste trabalho. No entanto, o valor de umidade por eles encontrado (9,59 g/100 g) foi próximo ao desta pesquisa. Já os segundos autores encontraram para o amido de milho valor de umidade de 11,70 g/100 g, proteína de 0,65 g/100 g, lipídeos de 1,19 g/100 g e minerais de 0,02 g/100 g; e, para o amido de trigo, umidade de 11,40 g/100 g, proteína de 0,58 g/100 g, lipídeos de 1,20 g/100 g e minerais de 0,19 g/100 g. Observa-se que, excetuando os valores encontrados para umidade por estes autores, os demais constituintes analisados tiveram valores superiores nesta pesquisa.

De acordo com Peroni²⁰, o amido bruto é constituído de carboidratos, bem como por substâncias como lipídeos, proteínas e cinzas. A quantidade destes constituintes dependerá da espécie vegetal e da parte do vegetal da qual o amido é extraído.

Conteúdo de carbonila e carboxila

Os teores de carbonilas e carboxilas encontrados para o amido oxidado nesta pesquisa foram 0,05% ($\pm 0,002\%$) e 0,09% ($\pm 0,001\%$), respectivamente. Embora não existam dados na literatura com esses teores para este amido, encontram-se valores semelhantes (0,09%) para o teor de carboxila em amido de milho oxidado²¹ e valores acima aos encontrados neste estudo, de 0,29% a 0,34%, para mandioquinha-salsa²². O alto teor de carboxilas para amidos modificados pode estar relacionado diretamente com a fragmentação molecular, devido ao tratamento oxidativo. Sangseethong et al.²³ afirmam ainda que o tipo e a quantidade de grupos funcionais formados nas moléculas de amido durante a oxidação dependerão do tempo de reação, da temperatura e do pH empregado.

Em função da porcentagem de radicais carboxílicos formados, o amido obtido pode ser chamado de oxidado ou branqueado. Segundo Taggart²⁴, os amidos branqueados contêm menos de 0,1% de radicais carboxílicos adicionados, sendo essa modificação considerada uma oxidação leve. Os valores de radicais carboxílicos em amidos oxidados comerciais está na faixa de 0,01% a 0,04%, enquanto, para os radicais carbonílicos, os valores encontram-se entre 0,005% e 0,01%.

Morfologia do grão de amido

A microscopia óptica do amido do caroço (semente) de manga pode ser observada na Figura 1. Não foram observadas diferenças entre os grãos de amido nativo e modificado. Constatou-se a presença de grãos de amido de vários tamanhos e formas, de ovais a elípticos. A amplitude de variação dos diâmetros maiores dos grãos do amido pesquisado foi de 5,52 a 29,38 μm , com média de 16,41 μm , enquanto os diâmetros menores oscilaram entre 4,17 e 22,55 μm , com média de 10,92 μm .

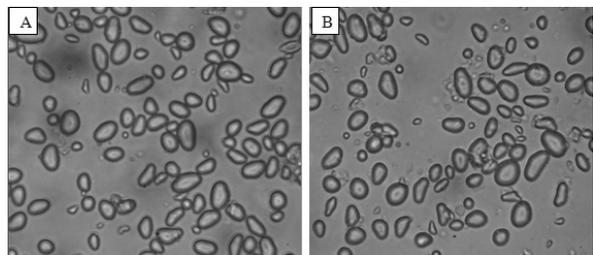


Figura 1. Microscopia óptica do amido nativo (A) e oxidado (B) da amêndoa do caroço de manga (400 X)

Kaur et al.², estudando amido do caroço de variedades de cinco mangas indianas, encontraram

grãos com diversos tamanhos e formas ovais e elípticas, conforme as encontradas neste estudo. Os mesmos autores encontraram diâmetro maior dos grãos variando entre 10,9 a 27,2 μm e diâmetro menor entre 6,5 a 16,3 μm , valores distintos, porém próximos aos encontrados neste estudo. Isso pode ser justificado pelo fato de as variedades da manga analisadas pelos referidos autores serem diferentes da manga Tommy Atkins.

Rengsutthi e Charoenrein¹⁸, comparando amido do caroço de jaca, milho e batata, observaram que os grãos de amido de jaca são semiovais ou com formato de sino, que os de milho são poligonais e irregulares e que os de batata são grandes e ovais. Encontraram o tamanho médio de 10 μm para o grão de amido de jaca, 13,7 μm para o do amido de milho e 30,5 μm para o de batata, sendo que este último tem forma semelhante à do amido de manga, mas de modo geral são maiores. Tongdang²⁵ afirma que o amido de manga assemelha-se aos amidos de leguminosas.

Propriedades funcionais

O poder de intumescimento e a solubilidade são determinados em temperaturas elevadas, promovendo a quebra de pontes de hidrogênio, ocorrendo o intumescimento dos grãos e o aumento da solubilidade do amido. Ambos contribuem para importantes características da maioria dos produtos ricos em amido, tais como as propriedades de pasta e o comportamento reológico durante o aquecimento em excesso de água²⁵. A Tabela 2 apresenta os resultados encontrados para o poder de intumescimento, conforme a temperatura e o pH dos amidos nativo e oxidado do caroço de manga.

O valor de intumescimento máximo obtido para o amido nativo ocorreu a 75 °C ($9,395 \pm 0,396$ g/g), e a partir daí observou-se declínio para os valores de PI. Isso pode demonstrar que os grãos desse amido têm baixa resistência a elevação de temperatura, ocorrendo provavelmente o rompimento dos grãos. Este fato contribui para o aumento da solubilidade. A oxidação aumentou o PI do amido, mantendo-o sempre crescente, sendo que seu maior valor no amido oxidado foi de $13,112 \pm 0,225$ g/g a 95 °C.

Verifica-se que o amido nativo apresentou valor de PI menor do que a maioria dos amidos nativos de outras origens relatados na literatura. Kaur et al.², estudando amido do caroço de cinco variedades de manga indianas, observaram valores de PI variando entre 18,0 a 19,7 g/g, superiores, portanto, ao desta

Tabela 2. Poder de intumescimento (PI) e solubilidade (S), conforme a temperatura e o pH, do amido nativo e oxidado da amêndoa do caroço de manga

T (°C)	PI (g/g)		S(%)	
	Amido nativo	Amido oxidado	Amido nativo	Amido oxidado
55	1,286 ± 0,080 ^{Aa}	1,566 ± 0,078 ^{Ba}	1,43 ± 0,006 ^{Aa}	4,20 ± 0,084 ^{Ba}
65	1,480 ± 0,034 ^{Ab}	1,708 ± 0,061 ^{Ab}	2,40 ± 0,020 ^{Ab}	4,40 ± 0,045 ^{Aa}
75	9,395 ± 0,396 ^{Ac}	8,493 ± 0,788 ^{Bc}	3,87 ± 0,012 ^{Ac}	5,62 ± 0,044 ^{Bb}
85	7,853 ± 0,541 ^{Ad}	11,939 ± 1,036 ^{Bd}	5,47 ± 0,057 ^{Ad}	6,70 ± 0,043 ^{Ac}
95	4,955 ± 0,494 ^{Ae}	13,112 ± 0,225 ^{Bc}	33,90 ± 0,555 ^{Ae}	10,80 ± 0,088 ^{Bd}
pH	Amido nativo	Amido oxidado	Amido nativo	Amido oxidado
4,0	7,476 ± 0,682 ^{Aa}	11,071 ± 0,318 ^{Ba}	0,055 ± 0,005 ^{Aa}	0,070 ± 0,010 ^{Ba}
6,0	5,267 ± 0,296 ^{Ab}	9,014 ± 0,649 ^{Bb}	0,263 ± 0,055 ^{Ab}	0,250 ± 0,026 ^{Ab}
8,0	5,585 ± 0,323 ^{Ac}	9,585 ± 0,473 ^{Bb}	0,233 ± 0,055 ^{Ab}	0,477 ± 0,030 ^{Bc}
10,0	5,855 ± 0,184 ^{Ad}	11,751 ± 0,158 ^{Bc}	0,750 ± 0,010 ^{Ac}	0,383 ± 0,035 ^{Bc}
12,0	10,404 ± 0,766 ^{Ae}	13,306 ± 0,090 ^{Bd}	1,473 ± 0,146 ^{Ad}	0,957 ± 0,032 ^{Bd}

* Cada valor representa a média e o desvio-padrão de três determinações.

Diferença significativa entre linhas para uma mesma propriedade – letras maiúsculas diferentes.

Diferença significativa entre colunas para uma mesma propriedade – letras minúsculas diferentes.

pesquisa. Os mesmos autores destacam ainda que baixo PI pode ser atribuído à presença de lipídeos no amido, que formam um complexo com a amilose. Osundahunsi e Mueller²⁶, pesquisando propriedades de amido de duas variedades de mandioca, encontraram amidos nativos com PI de 21,3 e 29,6 g/g. No entanto, Adebawale et al.²⁷ encontraram para o amido de fruta-pão PI de 6,40 g/g a 80 °C. O PI depende da capacidade de retenção de água das moléculas de amido por pontes de hidrogênio. As pontes de hidrogênio estabilizam as duplas hélices das estruturas cristalinas dos grânulos de amido. Estas são quebradas durante a gelatinização e passam a ter ligações de hidrogênio com a água, sendo o PI regulado pela cristalinidade do amido. Além disso, o grau de ramificação da cadeia amilácea também pode influenciar o grau de inchamento e solubilidade deste amido²⁸.

O tratamento oxidativo no amido do caroço de manga mostrou valores de PI maiores que o nativo em todas as temperaturas, exceto 75 °C. Spier²¹, analisando diversos tratamentos oxidativos em amido de milho, observou que, com valores de carbonila (0,086) e carboxilas (0,075), próximos ao desta pesquisa, sua amostra mostrou PI sempre maior do que o amido nativo. Wang e Wang²⁹ observaram que a oxidação de amido de milho aumentou o poder de inchamento em temperaturas de 85 °C com relação ao nativo. Esses autores relatam que, quando a amilose é preferencialmente hidrolisada, em baixas concentrações de hipoclorito de sódio, o aumento do poder de inchamento nas temperaturas deve-se à despolimerização da amilose, que auxilia no inchamento do amido. No entanto, em maiores concentrações de

oxidante em que a amilopectina é também hidrolisada, o amido perde a habilidade de absorver água, reduzindo o poder de inchamento principalmente em temperaturas extremas, como 95 °C.

A maior solubilidade dos amidos nativo e oxidado foi registrada na temperatura máxima utilizada, mostrando que, à medida que se aumentou a temperatura, elevou-se também esta propriedade dos amidos. Kaur et al.² encontraram valores de solubilidade variando menores a 95 °C em amido extraído de amêndoas de manga.

Quando se realizou a variação do pH, verificou-se que o maior valor de PI foi detectado no pH 12,0 para ambos os amidos. Lawal¹⁶ observou no amido nativo de “new cocoyam” comportamento sempre ascendente de PI, à medida que há aumento de pH, diferente, portanto, do que foi encontrado neste trabalho. A diferença pode ser decorrente de características inerentes ao amido do caroço de manga, visto que o mesmo apresenta um teor mais elevado de lipídeos e proteínas do que as tradicionais fontes amiláceas. Já a solubilidade do amido nativo aumentou com o incremento do pH, resultado que corrobora Olayinka, Adebawale e Olu-Owolab³⁰, que observaram que o amido nativo de sorgo apresentou o mesmo comportamento para essas duas propriedades.

Os valores para capacidade de absorção de água (CAA) e óleo (CAO) estão expostos na Figura 2. Com relação a esses resultados, o amido oxidado apresentou maior CAA (105,97 g ± 4,733 g/100 g), enquanto o amido nativo demonstrou maior capacidade de absorção de óleo (59,78 ± 1,812 g/100 g).

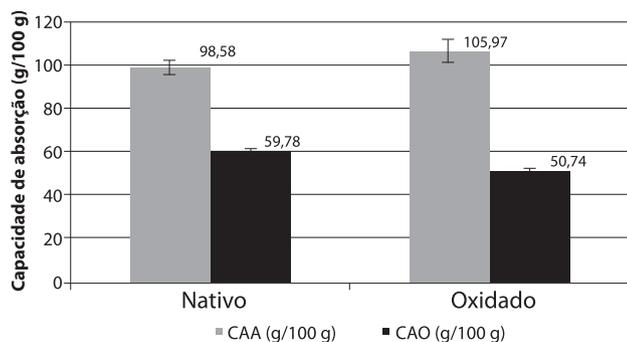


Figura 2. Capacidade de absorção de água (CAA) e óleo (CAO) dos amidos nativo e oxidado da amêndoa do caroço de manga

Kaur et al.² obtiveram valores de CAA de seus amidos nativos bem próximos aos resultados ora encontrados. Torruco-Uco e Betancur-Ancona³¹ encontraram em amido nativo de makal uma CAA de 19,2 g/100 g, resultado inferior ao do amido do caroço de manga. Lawal e Adebowale³² expuseram valores de CAA e CAO do amido nativo de jack bean bem menores do que os encontrados para o amido nativo desta pesquisa, não chegando nenhum dos dois valores a 3 g/100 g. Lawal et al.³³ encontraram maior CAA no amido de milho oxidado do que no nativo (a tendência hidrofílica do amido aumentou), pois, segundo eles, as ligações hemiacetálicas dos grupos carboxílicos nos amidos oxidados permitem maior extensão do inchamento da cadeia amilácea. Adebowale et al.²⁷ afirmam o mesmo com relação ao amido oxidado de fruta-pão. Ambos os resultados concordam com o encontrado nesta pesquisa.

Características das pastas de amido

Na Tabela 3, apresentam-se os gráficos de RVA para os amidos nativo e oxidado desta pesquisa.

Tabela 3. Propriedades de pasta do amido nativo (A) e oxidado (B) da amêndoa do caroço de manga

Parâmetro	Amido nativo	Amido oxidado
Temperatura de pasta (°C)	76,72 ± 0,03 ^A	79,70 ± 0,42 ^B
Pico de viscosidade (cP)	1939 ± 152,74 ^A	3071,50 ± 95,46 ^B
Viscosidade mínima (cP)	809,00 ± 161,22 ^A	1088,50 ± 10,61 ^A
Quebra de viscosidade (cP)	1130,00 ± 8,48 ^A	1983,00 ± 106,06 ^B
Viscosidade final (cP)	1545,00 ± 200,82 ^A	4853,50 ± 48,79 ^B
Tendência para retrogradação (cP)	736,00 ± 39,59 ^A	3765,00 ± 59,39 ^B

* Cada valor representa a média e o desvio-padrão de três determinações.

Valores com letras maiúsculas diferentes em uma mesma linha apresentam diferença significativa.

Pode-se verificar que houve alterações nos perfis viscoamilográficos e nos valores de temperatura de pasta dos amidos nativo e modificado. O amido oxidado demonstrou maiores valores para todos os parâmetros avaliados do que o amido nativo.

Inicialmente, verificou-se que a temperatura de pasta aumentou após a oxidação. Isso indica que o amido passou a apresentar maior resistência à dissociação das pontes de hidrogênio intramoleculares e menor facilidade de expansão do que o amido nativo. O pico de viscosidade é obtido durante o empastamento, quando os grânulos, em sua maioria, estão totalmente inchados, havendo também a presença de alguns grânulos intactos³⁴. A viscosidade máxima (pico de viscosidade) do amido nativo foi de 1939 cP (167,15 RVU) e do oxidado foi de 3.071,46 cP (264,78 RVU).

Espinosa-Solis, Jane e Bello-Perez³⁵ encontraram para o amido nativo da polpa de manga, variedade Tommy Atkins, e de banana valores de pico de viscosidade maiores que o amido nativo desta pesquisa, sendo estes respectivamente 194,1 RVU e 215,8 RVU. Rengsutthi e Charoenrein¹⁸ verificaram para o amido nativo do caroço de jaca pico de viscosidade de 255,58 RVU. El-Saied et al.³⁶ afirmam que a proteína pode atuar como uma barreira física para o intumescimento do amido, uma vez que os grânulos de amido são encaixados na matriz de proteína. Logo, o alto teor de proteína do amido nativo do caroço de manga (5,60 g/100 g) pode justificar a baixa viscosidade de pico comparada a outras fontes amiláceas.

O amido nativo mostrou viscosidade mínima de 809,00 cP (69,74 RVU) e quebra de viscosidade de 1.130 cP (97,41 RVU). Espinosa-Solis, Jane e Bello-Perez³⁵ expuseram tanto para o amido de polpa de manga como para o de banana valores de quebra de viscosidade menores do que os encontrados para o amido nativo deste trabalho, sendo estes 50,2 RVU e 33,5 RVU, respectivamente. Rengsutthi e Charoenrein¹⁸ verificaram para o amido nativo do caroço de jaca viscosidade mínima de 215,92 RVU e quebra de 39,67 RVU, sendo o primeiro valor maior e o segundo menor do que os observados nesta pesquisa. No entanto, Song et al.³⁷, estudando propriedades viscoamilográficas de amido de milho por RVA, obtiveram viscosidade mínima de 1.201 cP e quebra de viscosidade de 3.246 cP, ou seja, apesar da viscosidade mínima do amido analisado pelos autores ter sido um pouco superior à deste estudo, sua quebra de viscosidade foi bem superior à do amido nativo do caroço de manga, demonstrando maior fragilidade deste

amido quando cozido em água em relação ao amido nativo desta pesquisa. Por outro lado, o amido oxidado deste estudo demonstrou uma quebra de viscosidade maior do que o nativo.

Espinosa-Solis, Jane e Bello-Perez³⁵ encontraram ainda para o amido nativo da polpa de manga e de banana valores de viscosidade final maiores que o amido nativo deste estudo. Rengsutthi e Charoenrein¹⁸ verificaram para o amido do caroço de jaca viscosidade final de 364,13 RVU. Logo, um produto elaborado com o amido nativo desta pesquisa será um produto menos viscoso do que os elaborados com os demais.

Espinosa-Solis, Jane e Bello-Perez³⁵ encontraram em seus amidos valores de retrogradação de 95,2 RVU e de 141,7 RVU. Rengsutthi e Charoenrein¹⁸ observaram para o amido do caroço de jaca retrogradação de 148,21 RVU. Esses trabalhos expõem valores maiores do que o obtido para o amido nativo desta pesquisa, o que indica uma boa estabilidade do amido nativo de manga à retrogradação. Segundo Yuan et al.³⁸, maiores valores de setback (tendência a retrogradação) são encontrados para amidos cujos grânulos possuem maior diâmetro (acima de 30 μm), devido à maior fragilidade encontrada em grânulos maiores, o que concorda com os diâmetros dos grânulos observados nesta pesquisa.

Martínez-Bustos et al.³⁹, estudando as propriedades de amidos nativos e oxidados de mandioca, batata e jicama, observaram que os amidos oxidados de mandioca e jicama mostraram maior valor de viscosidade do que seus respectivos amidos nativos, como no caso deste estudo. No entanto, o valor foi menor para o amido de batata. Os referidos autores explicam o aumento de viscosidade afirmando que o incremento do pico de viscosidade sugere que os grânulos de amido oxidado foram mais propensos a inchamento e intumescerem em maior extensão porque as forças de associação entre as moléculas do amido nativo foram enfraquecidas pela repulsão elétrica dos grupos carboxílicos, permitindo, assim, que mais água penetrasse nos grânulos.

CONCLUSÃO

O extrato amiláceo nativo apresentou percentual significativo de amido, mas também apresentou quantidades relevantes de lipídeos e proteínas em sua composição, que foram componentes decisivos para as propriedades funcionais estudadas nesta pesquisa. No entanto, o estudo microscópico dos grãos de amido

nativo, após sua modificação, não mostraram alterações aparentes na forma e tamanho.

O amido nativo revelou baixa resistência a elevação de temperatura, demonstrando um intumescimento máximo a 75 °C, com relevante solubilização a esta temperatura. Quando submetido a um pH 12,0, apresentou maior valor de PI. Este amido caracterizou-se ainda por exibir consideráveis valores de capacidade de absorção de água e óleo, maior transparência de pasta, baixo pico de viscosidade quando comparado a outras fontes amiláceas, interessante resistência a agitação mecânica (quebra) e baixa tendência a retrogradar. Sugere-se sua indicação para compor sopas desidratadas, por apresentar baixa temperatura de formação de gel, e em produtos cárneos, por possuir boa capacidade de reter água.

O amido oxidado demonstrou boa resistência a elevação da temperatura, porém baixa solubilidade em função dessa variável. Quando submetido a pH 12, revelou PI e solubilidades próximos aos encontrados a 95 °C. Apresentou o maior valor para capacidade de absorção de água e o menor de capacidade de absorção de óleo, sendo indicado para produtos de panificação e de fritura (mais crocância). Apresentou ainda o maior valor de pico de viscosidade, resistência a agitação mecânica e temperatura de pasta, porém obteve a maior tendência a retrogradar, não sendo apropriado para fórmulas infantis ou sopas desidratadas. A indústria de conservas poderá utilizar este amido, devido a sua resistência ao aumento da temperatura.

REFERÊNCIAS

1. Puravankara D, Bohgra V, Sharma RS. Effect of antioxidant principles isolated from mango (*Mangifera indica* L.) seed kernels on oxidative stability of buffalo ghee (butter-fat). *J Sci Food Agr*. 2000;80:522-6.
2. Kaur M, Singh N, Sandhu KS, Guraya HS. Physicochemical, morphological, thermal and rheological properties of starches separated from kernels of some Indian mango cultivars (*Mangifera indica* L.). *Food Chem*. 2004;85:131-40.
3. Zein, RE, El-Bagoury AA, Kassab HE. Chemical and nutritional studies on mango seed kernels. *J Agr Sci*. 2005;30:3285-99.
4. Costa JG, Santos CAF. Cultivares. In: Cultivo da Mangueira. Sistema de Produção II: EMBRAPA Semi-Árido. Versão eletrônica; 2004. [Acesso 29 nov 2010]. Disponível em: [http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Manga/CultivodaMangueira/cultivares.htm].
5. Cordenunsi BR. Utilização de novas técnicas de microscopia na caracterização do amido. In: Lajolo, FM; Menezes, EW. Carbohidratos em alimentos regionales ibero-americanos. São Paulo: Edusp; 2006.

6. Bertolini AC. Starches: Characterization, Properties and Applications. Boca Raton: CRC Press; 2010.
7. Cereda MP, organizador. Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas latino-americanas. v 3. São Paulo: Fundação Cargill; 2003.
8. Sandhu KS, Kaur M, Singh N, Lim ST. A comparison of native and oxidized normal and waxy corn starches: Physicochemical, thermal, morphological and pasting properties. *J. Food Sci.* 2008;41(6):1000-10.
9. Loos PJ, Hood LF, Graham HD. Isolation and Characterization of Starch from Breadfruit. *Cereal Chem.* 1981;54:282-6.
10. Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. São Paulo; 2008. (versão eletrônica).
11. Forssell P, Hamunen A, Autio K, Suortti T, Poutanen K. Hypochlorite oxidation of barley and potato starch. *Starch/Stärke.* 1995;47:371-7.
12. Parovuori P, Hamunen A, Forssell P, Autio K, Poutanen K. Oxidation of potato starch by hydrogen peroxide. *Starch/Stärke.* 1995;47(1):19-23.
13. Smith, RJ. Characterization and analysis of starches. In: Whistler RL, Paschall EF. *Starch: Chemistry and technology*. New York: Academic Press; 1967.
14. Schoch TJ, Maywald EC. Microscopic examination of modified starches. *Anal Chem.* 1956;28(3):382-7.
15. Leach HW, Mccowen LD, Schoch TJ. Structure of starch granule. I Swelling and solubility patterns of various starches. *Cereal Chem.* 1959;36(6):534-44.
16. Lawal OS. Composition, physicochemical properties and retrogradation characteristics of native, oxidized, acetylated and acid-thinned new cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*) starch. *Food Chem.* 2004;87:205-218.
17. Beuchat LR. Functional and electrophoretic characteristics of succinylated peanut flour protein. *J Agr Food Chem.* 1977;25:258-61.
18. Rengsutthi K, Charoenrein S. Physicochemical properties of jackfruit seed starch (*Artocarpus heterophyllus*) and its application as a thickener and stabilizer in chilli sauce. *Food Sci Technol.* 2011;44:1309-13.
19. Batista WP, Silva CEM, Liberato MC. Propriedades químicas e de pasta dos amidos de trigo e milho fosforilados. *Ciênc Tecnol Aliment.* 2010;30(1):88-93.
20. Peroni FHG. Características estruturais e físico-químicas de amidos obtidos de diferentes fontes botânicas. [dissertação de mestrado]. São José do Rio Preto (SP): Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; 2003.
21. Spier F. Efeito dos tratamentos alcalino, ácido e oxidativo nas propriedades de amido de milho. [dissertação de mestrado]. Pelotas (RS): Universidade Federal de Pelotas; 2010.
22. Matsuguma LS, Lacerda LG, Schnitzler E, Carvalho Filho MAS, Franco CML, Demiate IM. Characterization of native and oxidized starches of two varieties of Peruvian carrot (*Arracacia xanthorrhiza* B) from two areas of Paraná State, Brazil. *Braz Arch Biol Technol.* 2009;52(3):701-13.
23. Sangseethong K, Lertphanichb S, Srirothb K. Physicochemical properties of oxidized cassava starch prepared under various alkalinity levels. *Starch/Stärke.* 2009;61:92-100.
24. Taggart, P. Starch as an ingredient: manufacture and applications. In: Eliasson, AC. *Starch in food: Structure, function and applications*. Boca Raton: CRC Press; 2004.
25. Tongdang, T. Some properties of starch extracted from three Thai aromatic fruit seeds. *Starch/Stärke.* 2008;60:199-207.
26. Osundahunsi OF, Mueller R. Functional and dynamic rheological properties of acetylated starches from two cultivars of cassava. *Starch/Stärke.* 2011;63:3-10.
27. Adebowale KO, Olu-owolabi BI, Olawumi EK, Lawal OS. Functional properties of native, physically and chemically modified breadfruit (*Artocarpus artilis*) starch. *Ind Crop Prod.* 2005;21:343-51.
28. Anggraini V, Sudarmonowat E, Hartati NS, Suurs L, Visser RGF. Characterization of cassava starch attributes of different genotypes. *Starch/Stärke.* 2009;61:472-81.
29. Wang YJ, Wang L. Physicochemical properties of common and waxy corn starches oxidized by different levels of sodium hypochlorite. *Carbohydr Polym.* 2003;52(11):207-17.
30. Olayinka OO, Olu-owolabi BI, Adebowale KO. Effect of succinylation on the physicochemical, rheological, thermal and retrogradation properties of red and white sorghum starches. *Food Hydrocolloid.* 2011;25:515-20.
31. Torruco-Uco J, Betancur-Ancona D. Physicochemical and functional properties of makal (*Xanthosoma yucatanensis*) starch. *Food Chem.* 2007;101:1319-26.
32. Lawal OS, Adebowale KO. Physicochemical characteristics and thermal properties of chemically modified jack bean (*Canavalia ensiformes*) starch. *Carbohydr Polym.* 2005;60(3):331-41.
33. Lawal, OS, Adebowale KO, Ogunsanwo BM, Barba LL, Ilo NS. Oxidized and acid thinned starch derivatives of hybrid maize: functional characteristics, wide-angle X-ray diffractometry and thermal properties. *Int J Biol Macromol.* 2005;35:71-79.
34. Thomas DJ, Atwell W. *Practical guides the food industry in starch*. Minnesota: Eagan Press; 1999.
35. Espinosa-Solis V, Jane J, Bello-Perez AL. Physicochemical characteristics of starches from unripe fruits of mango and banana. *Starch/Stärke.* 2009;61:291-9.
36. El-Saied HM, Ahmed EA, Roushdi M, El-Attar W. Gelatinization, pasting characteristics and cooking behavior of Egyptian rice varieties in relation to amylose and protein contents. *Starch/Stärke.* 1979;31(8):270-4.
37. Song X, Zhu W, Li Z, Zhu J. Characteristics and application of octenyl succinic anhydride modified waxy corn starch in sausage. *Starch/Stärke.* 2010;62:629-36.
38. Yuan Y, Zhang L, Dai Y, Yu J. Physicochemical properties of starch obtained from *Dioscorea nipponica* Makino comparison with others tubers starch. *J Food Eng.* 2007;82:436-42.
39. Martínez-Bustos F, Amaya-Llano SL, Carbajal-Arteaga JA, Chang YK, Zazueta-Morales JJ. Physicochemical properties of cassava, potato and jicama starches oxidized with organic acids. *J Sci Food Agric.* 2007;87:1207-14.

Influência da dieta suplementada com óleo de soja na composição centesimal e perfil lipídico de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Effect of dietary regime supplemented with soybean oil on the lipid profile and chemical composition of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

RIALA6/1437

Janice Izabel DRUZIAN¹*, Bruna Aparecida Souza MACHADO¹, Carolina Oliveira de SOUZA¹, Lorena Magalhães FRAGA¹, Viviane de Alencar Araes DURAN¹, Uiara Souza de BURGHGRAVE², Bruno Lopes BASTOS², Ricardo Castelo Branco ALBINATI², José Eugênio GUIMARÃES²

*Endereço para correspondência: ¹Laboratório de Pescados e Cromatografia Aplicada, Departamento de Análises Bromatológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia. Av. Barão de Jeremoabo, s/n, Ondina, 40.171-970, Salvador, BA, Brasil. E-mail: janicedruzian@hotmail.com

²Departamento de Anatomia, Patologia e Clínica, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, BA, Brasil

Recebido: 18.01.2011 - Aceito para publicação: 06.03.2012

RESUMO

A dieta exerce efeito pronunciado na composição das carcaças de peixes. Neste trabalho, foi avaliada a qualidade nutricional da fração lipídica do tecido muscular de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidas a dietas com diferentes teores de óleo de soja (OS). Os peixes foram alimentados por 21 dias com ração contendo 5,98% de lipídios totais (LT) oriundos de ração comercial, sem adição de óleo de soja (A), dieta com adição de 2% (B) e 4% de óleo de soja (C). Não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os teores de umidade, cinzas, proteína bruta e LT (0,98% a 1,08%) dos tecidos musculares resultantes dos tratamentos. Foram separados e identificados até 25 ácidos graxos, com diferença significativa ($p < 0,05$) na maioria deles, dependendo da dieta. Os majoritários em ordem decrescente foram: 16:0, 18:1n9, 18:2n6, 18:0, 20:4n6 e 22:5n6, independentemente do tratamento. A adição de OS na ração comercial mostrou perspectivas de promover o crescimento dos animais, sem afetar a composição centesimal e a qualidade nutricional da fração lipídica do tecido, em função dos altos teores de poli-insaturados, indicando ser uma matéria-prima satisfatória para incorporação parcial na ração.

Palavras-chave. *Oreochromis niloticus*, gordura, ácidos graxos, músculo

ABSTRACT

The diet induces a pronounced effect on fish carcass composition. This study aimed at evaluating the nutritional quality of lipid fraction of muscle tissue of tilapias (*Oreochromis niloticus*), which were fed with different soybean oil (OS) contents. The fishes were fed for 21 days with diets containing 5.98% of total lipid (TL) from a commercial feed without soya oil supplementation (A), the same feed plus 2% of soy oil (B) and plus 4% of soy oil (C). No significant differences ($p > 0.05$) were found in moisture, ash, crude protein and TL (0.98 to 1.08%) contents of fish muscles tissues resulting from the treatments. Twenty-five fatty acids were separated and identified, and, depending on the diet, significant differences ($p < 0.05$) were found among the majority of them. Away of the treatment, the predominance, in decreasing order, was: 16:0, 18:1n9, 18:2n6, 18:0, 20:4n6 and 22:5n6. The addition of 2% of soy oil into the commercial feed showed the best perspectives to promote the fish growth, without producing an effect on the lipid fraction composition and nutritional quality, due to the high polyunsaturated contents and remarkably n6. This oil is a satisfactory raw material for being partially included into the diet.

Keywords. *Oreochromis niloticus*, fat, fatty acids, muscle

INTRODUÇÃO

A piscicultura é, entre as atividades da pecuária brasileira, uma das que mais se desenvolvem. Considerando o pescado como alimento de excelente valor nutritivo e a pesca como uma atividade significativa do setor de produção, estudos sobre a fisiologia de peixes são de grande interesse científico¹⁻³, apesar do reduzido número de pesquisas sobre o efeito da dieta na composição da carcaça⁴⁻⁶.

Lipídios e proteínas são os maiores constituintes orgânicos dos peixes, sendo uma importante forma de reserva de energia metabólica para o crescimento e a reprodução dos animais, além de ser fonte de alto valor nutricional dos mesmos^{2,7}. Os ácidos graxos poli-insaturados participam da estrutura e da integridade das membranas e de processos vitais, como a síntese dos eicosanoides (prostaglandinas e leucotrienos), tanto para peixes como para humanos. Esses ácidos graxos contribuem também para a redução do risco de doenças coronárias, reumáticas, diabetes e câncer e atuam como transportadores de vitaminas lipossolúveis A, D, E e K. Os ácidos linoleico (18:2n6) e α -linolênico (18:3n3) são dois representantes das séries n6 e n3 e, como não são sintetizados por animais, são considerados essenciais e devem estar presentes na dieta⁸⁻¹¹. Teores reduzidos desses ácidos graxos no filé de peixe podem ser devidos aos baixos índices destes nas dietas^{2,7}, reduzindo o valor nutricional das carnes^{12,13}.

Os lipídios que compõem as rações de peixes de água doce são caracterizados pela presença dos ácidos linoleico (18:2n6), α -linolênico (18:3n3) e eicosapentaenoico (EPA, 20:5n3). Assim, a composição de ácidos graxos de peixes de água doce é caracterizada por elevados teores de n-6 e, principalmente, de ácido linoleico (18:2n6) e araquidônico (20:4n6)¹⁴.

Os óleos de peixes marinhos são ricos em ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa e, portanto, de alto valor nutricional para humanos, além de serem tradicionalmente utilizados como fonte de lipídios também para a alimentação de peixes, em especial na criação de tilápias. A produção mundial de tilápia foi superior a 3 milhões de toneladas em 2010, com estimativa de aumento para cerca de 8,9 milhões de toneladas até 2020^{15,16}. Este rápido aumento é em parte devido a sistemas agrícolas de produção intensiva, sendo cada vez mais importante a manutenção da qualidade nutricional da carne desses peixes.

Os óleos vegetais são alternativas viáveis para serem inseridos na dieta de peixes, já que são prontamente disponíveis, são renováveis e mais baratos que os óleos de peixes. Em virtude disso, muitos estudos relatam que os óleos vegetais podem substituir parcial ou totalmente o óleo de peixe no cultivo de tilápias sem comprometer o desempenho de crescimento, satisfazendo o requisito da presença de ácidos graxos essenciais¹⁷.

Entre os óleos vegetais comestíveis produzidos em grande escala, o óleo de soja apresenta maior teor de insaturados (70% a 80%) do que de saturados (10% a 20%), com cerca de 19% a 30% de ácido oleico (18:1n9), 44% a 62% de ácido linoleico (18:2n6), principal representante da série ω -6 (n6), e 4% a 11% de ácido linolênico (18:3n3), principal representante da série ω -3 (n3)¹⁸. Este óleo vem sendo utilizado na formulação de dietas para peixes como fonte de energia, apresentando 8.485 Kcal/kg de energia digestível para a tilápia do Nilo^{1,6,19}.

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é bastante apreciada por piscicultores e consumidores de todo o mundo por apresentar características particulares, como a prolificidade e a rusticidade, elevada qualidade nutricional e aceitação organoléptica da carne, bom índice de crescimento e alta resistência às doenças, destacando-se o fato de aceitar bem rações, resultando num desenvolvimento satisfatório^{20,21}.

Os relatos sobre os teores de ácidos graxos das séries n6 e n3 do tecido de tilápias são, respectivamente, 13,75-19,72% e 1,41-1,74%, quando alimentadas com ração contendo somente lipídio oriundo de óleo de soja²¹; de 32,60% e 24,60% quando cultivadas com ração contendo óleo de linhaça¹⁴; e de 34,30% e 12,50% quando tratadas com ração contendo óleo de palma¹⁶.

Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a qualidade nutricional da fração lipídica do tecido muscular de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por meio da influência da adição de diferentes teores de óleo de soja como fonte alternativa parcial de lipídio das dietas.

MATERIAL E MÉTODOS

Formulação das rações, cultivo das tilápias e amostragem

Foi utilizada como matriz para a elaboração das dietas a serem testadas uma ração comercial (Nutripeixe AL55 – PURINA) extrusada à base de óleo de peixe contendo 56% de proteína e 12% de lipídios totais (LT)^{1,19,21,22}. A ração com partícula de 0,4 mm de diâmetro,

destinada à alimentação de larvas e alevinos de peixes onívoros, foi adquirida em Feira de Santana-BA, cuja composição centesimal está apresentada na Tabela 1. Para a preparação das três dietas experimentais, adicionou-se farelo de milho à ração comercial na proporção 1:1, reduzindo os níveis de LT e de proteína na mistura final para 6,57% e 26%, respectivamente (Tabela 2). Essa formulação correspondeu à dieta experimental com menor concentração de LT e isenta de óleo de soja (Ração A, referência). Em seguida, foram adicionadas alíquotas de 2% e de 4% de óleo de soja à ração A, obtendo-se assim as rações B e C, com níveis de LT de 8,57% e 10,57%, respectivamente, substituindo-se parcialmente o óleo de peixe por óleo vegetal. As rações foram peletizadas mecanicamente e secas em estufa de ventilação forçada por 24 horas, em temperatura de 55 °C.

Tabela 1. Composição centesimal da ração comercial utilizada na formulação das dietas experimentais

Nutrientes	Informações do rótulo (%)	Análise laboratorial (%)
Umidade	13,0	11,0
Matéria mineral	14,0	13,3
Matéria fibrosa	5,00	7,7
Proteína bruta	55,0	56,0
Extrato etéreo	10,0	12,0

Tabela 2. Formulação e teores de proteína bruta e lipídios totais da dieta de referência (tratamento A) e das rações contendo óleo de soja (B e C)

Dietas		Composição (%)		
		Óleo de soja (%)	Proteína bruta	Lipídios totais
Ração Comercial		–	56	12,00
Rações formuladas*	A (referência)	0,00	26	6,57
	B	2,00	26	8,57
	C	4,00	26	10,57

*Ração A = Ração comercial + farelo de milho na proporção 1:1;

Ração B = Ração A + 2% de óleo de soja;

Ração C = Ração A + 4% de óleo de soja.

O cultivo foi realizado na Estação de Piscicultura Joanes II, da Bahia Pesca S.A., Camaçari, Bahia, utilizando-se 60 tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) mantidas em viveiros de terra, com água doce, em sistema aberto, com renovação média diária de água de 10%. A qualidade da água durante o ensaio experimental seguiu os padrões da estação, com oxigênio dissolvido entre 5 e 8 mg/L, pH 7,5 e temperatura média de 25 °C.

Os 60 peixes foram separados em duas categorias de peso, P1 = 300 ± 100 g e P2 = 500 ± 100 g, cada uma

com 30 peixes em bom estado físico, e distribuídos em três tanques-rede com volume de 1 m³ (1 m x 1 m x 1 m), dispostos separadamente dentro do viveiro. Assim, cada tanque-rede foi povoado com 20 animais, sendo dez de cada categoria de peso.

Os animais de cada tanque-rede foram alimentados a lanço, até a saciedade (*ad libitum*), por 21 dias, com as rações experimentais sem óleo de soja (A) e com diferentes teores de óleo de soja (B e C), pela manhã e à tarde.

Após 21 dias, os peixes foram abatidos, pesados e mantidos em embalagens de polietileno (em atmosfera de N₂) a -18 °C no Laboratório de Pescados e Cromatografia Aplicada (Lapesca) da Faculdade de Farmácia da UFBA, onde foram analisados. No início de cada análise, as amostras foram mantidas à temperatura ambiente, filetadas e preparadas individualmente para as determinações das composições centesimal e de ácidos graxos.

Determinação da composição centesimal

A umidade e o teor de cinzas foram determinados seguindo o método gravimétrico da AOAC²³; a proteína bruta, pelo método de Kjeldahl-Micro por determinação do nitrogênio total²⁴. A proteína bruta foi calculada em função dos teores de nitrogênio total multiplicado pelo fator 6,25.

Os lipídios totais foram extraídos e quantificados conforme metodologia proposta por Bligh e Dyer²⁵, em que aproximadamente 3 g de amostra foram pesados em balão de Erlenmeyer. Posteriormente, foram adicionados 20 mL de metanol, 10 mL de clorofórmio e um volume de água para completar 8 mL, considerando-se a umidade da amostra. Após agitação em agitador mecânico (Nova Ética NT 145), por 30 minutos, foram adicionados mais 10 mL de clorofórmio e 10 mL de solução de sulfato de sódio 1,5%. A mistura foi agitada por mais 5 minutos. A camada inferior, ou seja, a fase clorofórmica que continha os lipídios, foi removida e filtrada em um funil com papel de filtro contendo sulfato de sódio anidro. Em seguida, foram transferidas alíquotas desse extrato para tubos de vidro pré-tarados, os quais foram colocados sob atmosfera de N₂ para evaporação do solvente. Após a secagem, os tubos foram pesados em balança analítica (Shimadzu Y220), obtendo-se por gravimetria o percentual de LT. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Preparação dos ésteres metílicos de ácidos graxos

Os lipídios totais foram submetidos ao processo de transesterificação para a preparação dos ésteres metílicos

de ácidos graxos (EMAG), segundo a metodologia proposta por Joseph e Ackman²⁶. Para a saponificação, uma alíquota dos lipídios totais (aproximadamente 25 mg) foi pesada em tubo de vidro de 20 mL (pirex). Posteriormente, foram adicionados 1,5 mL de solução metanólica de NaOH 0,50 mol/L; a solução foi aquecida em banho-maria a 100 °C por cerca de 15 minutos, seguido de resfriamento à temperatura ambiente. Foram adicionados 2 mL de uma solução metanólica catalítica de BF₃ (12%), com posterior aquecimento em banho-maria a 100 °C por 30 minutos, seguido de resfriamento em água corrente. Adicionaram-se 1 mL de iso-octano, sob vigorosa agitação, em vórtice (Phoenix AP 56), por 1 minuto, e 5 mL de solução de cloreto de sódio saturada. A amostra esterificada foi levada à geladeira e deixada em repouso por 5 minutos para acelerar a separação das fases. Após a coleta da fase superior, adicionou-se mais 1,0 mL de iso-octano ao tubo. Depois da agitação e separação das fases, foi coletado o sobrenadante e adicionado ao volume da primeira extração. Os EMAG foram armazenados em frasco âmbar sob atmosfera inerte (N₂) à -18 °C e analisados por cromatografia.

Análise cromatográfica dos ésteres metílicos de ácidos graxos

Os EMAG foram analisados em um cromatógrafo gasoso CP 3800 (VARIAN), equipado com coluna CP-WAX (25 m × 0,25 mm × 0,20 µm) e detector de ionização de chama (CG-DIC). Os parâmetros de análises foram: temperatura do injetor: 250 °C; temperatura do detector: 280 °C; fluxo de 1,3 mL.min⁻¹ para o gás de arraste He, de 30 mL.min⁻¹ para o gás auxiliar (*make-up*) N₂, e 30 e 300 mL.min⁻¹ para os gases H₂ e ar sintético, respectivamente; razão de divisão (*split*) de 1:50; temperatura da coluna programada a 150 °C por 16 minutos, aumentando 2 °C/min até 180 °C, permanecendo por 25 minutos, passando a 210 °C a 5 °C/min, onde permaneceu por 10 minutos, com elevação para 230 °C a 10 °C/min, mantendo-se por 16 minutos. As injeções foram realizadas em duplicatas, e o volume de injeção foi de 1 µL.

A identificação dos AG foi realizada por comparação entre os tempos de retenção (Tr) dos picos dos cromatogramas das amostras com os Tr dos padrões, separados nas mesmas condições cromatográficas. O *mix* de padrões é composto por 37 EMAG contendo desde 4:0 até 22:6n3 (189-19, Sigma, Estados Unidos). A quantificação dos AG foi realizada pelo método de

normalização através das áreas dos picos, e os resultados foram expressos em percentagem relativa de área (%).

Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo programa STATISTICA (Anova) versão 7.0, utilizando-se o teste de Tuckey (HSD) para avaliação das diferenças entre a composição centesimal e de AG dos tecidos musculares resultantes dos diferentes tratamentos, a 95% de confiança (p > 0,05).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os intervalos de peso das tilápias submetidas às dietas contendo 6,57% de LT oriundos de ração comercial (óleo de peixe), além de 0% (Ração A, referência), 2% (Ração B) e 4% (Ração C) de óleo de soja, assim como os teores de umidade, cinzas, proteína bruta e LT dos tecidos musculares estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Composição centesimal do tecido muscular de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidas a tratamentos com rações contendo dois diferentes teores de óleo de soja

Composição (%)	Tratamentos* (% de óleo de soja)		
	(inicial 200-600 g)		
	Ração A (0%)	Ração B (2%)	Ração C (4%)
Intervalo de peso final das tilápias (g)	250-440	450-620	500-570
Umidade (%)	78,52 ± 0,38	80,63 ± 0,77 ^a	80,54 ± 1,65 ^a
Cinza (%)	1,18 ± 0,05 ^a	1,14 ± 0,06 ^a	1,07 ± 0,12 ^a
Lipídios totais (%)	1,08 ± 0,12 ^a	0,98 ± 0,18 ^a	1,01 ± 0,12 ^a
Proteína bruta (%)	18,50 ± 0,68 ^a	18,98 ± 0,69 ^a	19,07 ± 0,56 ^a

*Todas as rações contêm 6,57% de LT oriundos da ração comercial. Valores que têm a mesma letra, numa mesma linha, não apresentam diferenças significativas (p > 0,05) pelo teste de Tukey a 95% de confiança.

Os valores de peso das tilápias alimentadas a lanço, até a saciedade, por 21 dias, variaram de 250 a 620 g, sendo que os maiores valores foram apresentados com os tratamentos contendo óleo de soja (B e C). Isso é justificado em função das rações não serem isoenergéticas (Tabela 2).

Os teores de umidade dos tecidos musculares das tilápias variaram de 78,52 ± 0,38 a 80,63 ± 0,77; cinzas, de 1,07 ± 0,12 a 1,18 ± 0,05%; proteína bruta, de 18,50 ± 0,68 a 19,07 ± 0,56; e LT, de 0,98 ± 0,18 a 1,08 ± 0,12%, que Ackman²⁷ classifica como peixes magros (< 2% de LT).

Os diferentes tratamentos não resultaram em tecidos musculares com diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os pesos, assim como entre os parâmetros de composição centesimal, com exceção da umidade dos tecidos dos peixes alimentados com a ração A.

Vila Nova et al.²⁸ encontraram no músculo de tilápias do Nilo alimentadas com rações comerciais valores bastante próximos de umidade (77,55%), cinzas (0,97%), LT (0,99%) e proteína bruta (18,34%). Normalmente, o teor de LT no músculo de peixes é o parâmetro da composição mais influenciado pela dieta. Maia e Rodriguez²⁹ relataram percentuais de 1,4% de LT para filés de tilápia, enquanto Andrade et al.⁵ encontraram 2,86%.

A Tabela 4 mostra a composição de ácidos graxos da fração de LT do tecido muscular das tilápias submetidas aos tratamentos A, B, e C, separados por CG-DIC (Figura 1).

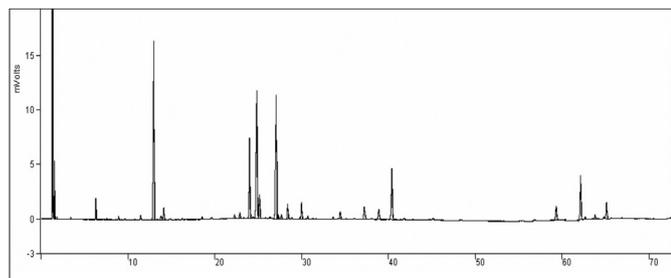


Figura 1. Cromatograma CG-DIC do perfil de ácidos graxos do tecido muscular de tilápias alimentadas com a ração B contendo 6,57% de LT oriundos da ração comercial acrescentado de 2,0% de óleo de soja

Na fração lipídica do tecido muscular de tilápias, foram separados e identificados até 25 ácidos graxos, sendo os majoritários em ordem decrescente: 16:0, 18:1n9, 18:2n6, 18:0, 20:4n6 e 22:5n6, representando 80% a 83% dos totais, independentemente dos tratamentos com as rações A, B e C. Maia e Rodriguez²⁹ e Maia et al.³⁰ também relatam a presença desses ácidos graxos como majoritários, e na mesma ordem, em tecido muscular de tilápias alimentadas com ração comercial, enquanto Justi et al.⁶ identificaram como majoritários os ácidos 18:1n9, 18:2n6, 16:0, 18:3n3 e 18:0 em alevinos de tilápias do Nilo submetidos a dietas enriquecidas com óleo de linhaça.

Comparando os AG majoritários dos tecidos musculares dos tratamentos que contêm óleo de soja na dieta (B e C) com a dieta referência (A), constata-se que 16:0 e 18:1n9 sofreram diminuição, enquanto 18:2n6, 20:4n6 e 22:5n6 aumentaram (Tabela 4). O percentual do AG majoritário em óleo de soja (18:2n6)^{31,32} também

Tabela 4. Identificação e quantificação de ácidos graxos do tecido muscular de tilápias submetidas a diferentes tratamentos e somatórios das séries de ácidos graxos. (A) ração contendo 6,75% de LT oriundos da ração comercial; (B) ração contendo 6,57% de LT da ração comercial + 2% de óleo de soja; e (C) ração contendo 6,57% de LT da ração comercial + 4% de óleo de soja

Identificação EMAG	EMAG ± dp (%)		
	Tratamento A	Tratamento B	Tratamento C
14:0	2,54 ± 0,82	1,65 ± 0,05	2,11 ± 0,73
15:0	0,25 ± 0,24 ^a	0,14 ± 0,20 ^b	0,29 ± 0,08 ^{a,b}
16:0	27,05 ± 0,10	24,17 ± 4,32	21,10 ± 0,58
17:0	0,38 ± 0,39	0,47 ± 0,01 ^a	0,45 ± 0,07 ^a
18:0	9,89 ± 2,33	10,88 ± 2,58	8,94 ± 0,99
20:0	0,48 ± 0,35	–	0,36 ± 0,02
22:0	0,07 ± 0,07	–	–
ΣAGS	40,66	37,31	33,25
17:1n5	0,18 ± 0,23 ^a	0,15 ± 0,01 ^a	–
18:1n9	24,02 ± 5,20 ^a	17,52 ± 1,97	21,32 ± 1,19 ^a
18:1n7	3,94 ± 1,45	3,03 ± 0,38	3,72 ± 0,08
20:1n9	1,11 ± 1,42	0,93 ± 0,33	1,33 ± 0,28
24:1n9	0,47 ± 0,54 ^a	0,42 ± 0,07 ^a	0,30 ± 0,07
ΣAGMI	31,12	24,18	29,95
18:2n6c	14,16 ± 2,99	16,32 ± 3,23	16,27 ± 2,03
18:3n6	0,07 ± 0,06	0,56 ± 0,25	0,92 ± 0,15
18:3n3	0,73 ± 0,33 ^a	0,72 ± 0,29 ^a	0,91 ± 0,03
20:2n6	1,26 ± 0,28	1,80 ± 0,64	1,56 ± 0,01
20:3n6	0,90 ± 1,12	1,85 ± 0,05	2,06 ± 0,12
20:4n6 (ARA)	3,75 ± 1,02	8,31 ± 2,16 ^a	8,24 ± 1,12 ^a
20:3n3	0,10 ± 0,12	–	0,27 ± 0,04
20:5n3 (EPA)	0,19 ± 0,24	0,24 ± 0,34	0,31 ± 0,09
22:4n6	1,42 ± 0,66	2,04 ± 0,03	2,32 ± 0,28
22:5n6	4,71 ± 0,02	6,17 ± 0,10	3,73 ± 0,15
22:6n3 (DHA)	0,92 ± 1,16	0,50 ± 0,71	0,22 ± 0,02
ΣAGPI	28,21	38,51	36,79
Total AG	100,00	100,00	100,00
Σn3	1,94	1,47	1,71
Σn6	26,27	37,04	35,31
Σn6/ Σn3	13,54	25,26	20,64
ΣAGPI/ΣAGS	0,69	1,03	1,10

Resultados das médias ± dp de 10 tilápias de cada tratamento
EMAG = Ésteres metílicos de ácidos graxos expressos em % do total de lipídios

dp = desvio-padrão

– = não detectado

ΣAGS = soma dos ácidos graxos saturados

ΣAGMI = soma dos ácidos graxos monoinsaturados

ΣAGPI = soma dos ácidos graxos poli-insaturados

Σn3 = soma dos ácidos graxos n3, inclusive EPA e DHA

Σn6 = soma dos ácidos graxos n6

Valores que têm a mesma letra, numa mesma linha, não apresentam diferenças significativas ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey a 95% de confiança

aumentou (6,6% para 17,2%) no músculo de tilápias alimentadas com dieta contendo 8% de óleo de soja, quando comparado ao controle isento do óleo vegetal³³, e variou de 8,75% a 13,52% em músculo resultante de dietas contendo 7% de óleo de soja²¹, entre 0 e 90 dias.

Foi constatado que o fornecimento das rações A, B e C às tilápias por 21 dias não está diretamente relacionado ao aumento do teor de LT do músculo, mas exerceu uma influência significativa ($p < 0,05$) na composição da maioria dos AG (Tabela 4). Tonial et al.²¹ também relatam que, ao alimentar tilápias com ração contendo 7% de óleo de soja, a composição de AG do tecido muscular apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) até 45 dias de fornecimento da ração.

Do ponto de vista nutricional, resultados de pesquisas mostram que a ingestão de ácidos graxos saturados aumenta os níveis de colesterol sérico em humanos e que os níveis de colesterol total no plasma sanguíneo diminuem quando a ingestão de ácidos graxos saturados é substituída por poli-insaturados^{11,34,35}.

A Tabela 4 também mostra os somatórios dos ácidos graxos: saturados (AGS 33,25 a 40,66%), monoinsaturados (AGMI 24,18 a 31,12%), poli-insaturados (AGPI 28,21 a 38,51%), ômega-3 (n3 1,47 a 1,94%) e ômega-6 (n6 26,27 a 37,04%); assim como as razões dos AGPI/AGS (0,69 a 1,10) e n6/n3 (13,54 a 25,26) dos tecidos musculares das tilápias, com diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os três tratamentos. Os valores dos somatórios das séries de AG foram semelhantes aos encontrados por Tonial et al.²¹ para filés de tilápias alimentadas com óleo de soja como componente da ração, e também identificaram diferenças significativas ($p < 0,05$) quando compararam ao tratamento controle (ração comercial).

Quanto à questão nutricional para humanos, é recomendado que as razões AGPI/AGS e n6:n3 sejam maiores que 0,45^{10,11,34,36} e, no máximo, 4,0^{1,37}, respectivamente. Neste trabalho, as razões AGPI/AGS e n6/n3 atendem aos critérios estabelecidos (Tabela 4). O valor da razão n6/n3 em filés de tilápias alimentadas por 30 dias com 7% de óleo de soja na ração foi de 10,35²¹, enquanto por 70 dias com ração contendo 8% de óleo de soja foi de 4,8³³.

A composição de AG e, conseqüentemente, os teores de AGS, AGMI e AGPI de peixes sofrem influência direta desses mesmos parâmetros da dieta. Entretanto, os ácidos saturados podem também ser gerados pela *síntese de novo*, onde fontes de carbono não lipídicas

são transformadas em ácidos graxos^{1,34,37}. A síntese de ácidos poli-insaturados ocorre por meio de reações sequenciais de dessaturação e alongamento da cadeia dos ácidos graxos, tendo como substratos os ácidos oleico (18:1n9), linoleico (18:2n6), α -linolênico (18:3n3) e, por extensão, seus isômeros *trans* e famílias n6 e n3. A ação das enzimas dessaturases é de grande importância, uma vez que é controlada pela interação de hormônios com a quantidade dos ácidos linoleico e α -linolênico da dieta^{10,37}. De fato, a composição de AG dos tecidos é modulada por vários fatores metabólicos, e o conteúdo final dependerá da quantidade e da natureza dos AG da dieta, da ingestão cumulativa dos AG e do tempo de ingesta, da taxa de crescimento, da espécie, do tamanho, da idade, entre outros fatores ambientais.

Portanto, da dessaturação do 18:2n6, obtém-se o 18:3n6 e, sequencialmente, 20:3n6, 20:4n6 (ARA), 22:4n6 e 22:5n6. Em função da dieta suplementada com óleo de soja, que é fonte de ácido linoleico^{18,31,32}, todos esses AG, mas principalmente ARA e 22:5n6, foram encontrados em maiores quantidades no músculo das tilápias dos tratamentos B e C do que do tratamento A, constatando-se que o óleo foi bem metabolizado pela espécie. O 18:3n3, encontrado principalmente no cloroplasto de vegetais verdes, é metabolizado a ácidos eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenoico (DHA). O óleo de soja tem de 4% a 11% de 18:3n3^{31,32}; portanto, valores baixos de EPA e DHA ($< 1\%$) foram encontrados nas tilápias alimentadas com as rações contendo óleo de soja (B e C, Tabela 4). Valores próximos a 1% também foram encontrados por Tonial et al.²¹ para tilápias alimentadas com ração contendo 7% de óleo de soja, avaliadas periodicamente por 90 dias.

É relatado que peixes de água doce¹⁹ têm necessidade dos grupos de ácidos graxos poli-saturados n6 e n3, ou somente de n6. Sabe-se também que as famílias de ácidos graxos n3, n6, n7 e n9 competem entre si pelas vias metabólicas de alongamento e dessaturação, uma vez que compartilham dos mesmos sistemas enzimáticos. A ressintetização dos ácidos graxos das tilápias foi alterada com a variação nos níveis de óleo de soja na ração, embora o processo de absorção de LT não tenha sofrido influência. O nível de 8,57% de extrato etéreo na dieta do tratamento B das tilápias promoveu maior desempenho de ganho de peso (Tabela 3) e manteve o valor nutricional considerando as diferentes séries de ácidos graxos (Tabela 4), podendo indicar que o limite de utilização de lipídio na dieta estaria por volta

desse valor, que é inferior aos relatados por Martino et al.^{7,19}, de 10% a 20% de lipídios na dieta, resultando em peixes com uma ótima velocidade de crescimento sem acúmulo excessivo de gordura.

Considerando que existe uma preocupação mundial^{1,2,3,4,21,33,34} com o crescente impacto das atividades de aquicultura, principalmente porque é necessário de duas a cinco vezes mais farinha de peixe no cultivo do que a fornecida pelo produto do viveiro, a redução da dependência de farinha de peixe pode fornecer um peixe de menor custo. Ao identificar fontes alternativas de lipídios, foi constatado que o óleo de soja é uma matéria-prima satisfatória para a substituição parcial do óleo de peixe na alimentação de tilápias. A inclusão de 2% apresenta melhores perspectivas de promover o crescimento sem afetar a composição centesimal, pois, apesar de alterar a composição de AG dos peixes, mantém a qualidade nutricional do produto final, além das possibilidades de fornecer informações adicionais para estudos futuros, principalmente por períodos de cultivos mais longos e/ou durante todo o cultivo, assim como a evolução das alterações da composição do tecido muscular durante o cultivo. Depois de utilizar dietas contendo óleos vegetais, retornar a uma dieta de óleo de peixe como maneira de reduzir algum efeito adverso e repor a composição de ácidos graxos ou os parâmetros de qualidade nutricional para valores semelhantes aos de animais continuamente alimentados com uma dieta de óleo de peixe, é outra possibilidade a ser investigada.

CONCLUSÃO

O uso de 2% a 4% de óleo de soja como substituto parcial do óleo de peixe da ração para dietas de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) não refletiu significativamente na composição centesimal ou no aumento do teor de lipídios totais do tecido muscular, mas alterou a composição da quase totalidade dos ácidos graxos dessa fração.

A inclusão de óleo de soja apresenta a perspectiva de promover o crescimento sem afetar a composição centesimal, apesar de alterar a composição de AG dos peixes mantém a qualidade nutricional do produto, devido ao teor de poli-insaturado, além da possibilidade de fornecer um peixe de menor custo. Ao identificar fontes alternativas de lipídios, foi constatado que o óleo de soja é uma matéria-prima satisfatória para a substituição parcial do óleo de peixe das rações para tilápias.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (Fapesb), pelo financiamento da pesquisa.

REFERÊNCIAS

1. Visentainer JV, Gomes STM, Hayashi C, Santos-Junior OO, Silva ABM, Justi KC, et al. Efeito do tempo de fornecimento de ração suplementada com óleo de linhaça sobre a composição físico-química e de ácidos graxos em cabeças de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Cienc Tecnol Aliment*. 2003;23(3):478-84.
2. Martino RC, Cyrino JEP, Portz L, Trugo LC. Performance, carcass composition and nutrient utilization of surubim *Pseudoplatystoma coruscans* (Agassiz) fed diets with varying carbohydrate and lipid levels. *Aquacult Nutr*. 2005;11:131-7.
3. Druzian JI, Marchesi CM, Scamparini ARP. Chemical characterization and determination of the composition of fatty acids of the muscle of carps (*Cyprinus carpio*) fed with ration and swine's dejection. *Ciênc Rural*. 2007;37(4):539-44.
4. Saint-Paul U. Potential for aquaculture of South American freshwater fishes: a review. *Aquaculture*. 1986;54:205-40.
5. Andrade AD, Rubira AF, Matsushita M, Souza N. ω -3 fatty acids in freshwater fish from South Brazil. *J Am Oil Chem Soc*. 1955;72:1207-10.
6. Justi KIC, Padre RG, Hayashi C, Soares CM, Visentainer JV, Souza NE, et al. Efeito da temperatura da água sobre o desempenho e perfil de ácidos graxos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Acta Sci Anim Sci*. 2005;27(4):529-34.
7. Martino RC, Cyrino JEP, Portz L, Trugo LC. Effect of dietary lipid level on nutritional performance of the surubim, *Pseudoplatystoma coruscans*. *Aquaculture*. 2002;209:209-18.
8. Menezes ME, Lira GM, Omena CMB, Freitas JDF, Sant'ana AEG. Composição centesimal, colesterol e perfil de ácidos graxos dos peixes tainha (*Mugil cephalus*) e camurim (*Centropomus undecimalis*) da Lagoa Mundaú, AL/Brasil. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2008;67(2):89-95.
9. Roos NM, Siebelink E, Botts ML, Van-Tol A, Schouten EG, Katan MB. *Trans* monounsaturated fatty acids and saturated fatty acids have similar effects on postprandial flow-mediated vasodilatation. *Eur J Clin Nutr*. 2002;56(7):674-9.
10. Uauy R, Valenzuela A. Marine oils: the health benefits of n-3 fatty acids. *Nutrition*. 2002;16:680-84.
11. Castro-Gonzalez MI. Ômega 3 fatty acids: benefits and sources. *Interciência*. 2002; 27:128-36.
12. Venugopal V, Shahidi F. Structure and composition of fish muscle. *Food Rev Int*. 1996;12:175-97.
13. Almeida NM, Bueno-Franco, MR. Influência da dieta alimentar na composição de ácidos graxos em pescado: aspectos nutricionais e benefícios à saúde humana. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2006;65(1):7-14.
14. Justi KC, Hayashi C, Visentainer JV, Souza NE, Matsushita M. The influence of feed supply time on the fatty acid profile of Nile

- tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed on a diet enriched with n-3 fatty acids. *Food Chem*. 2003;80(4):489-493.
15. Tacon AGJ, Metian M. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: trends and future prospects. *Aquaculture*. 2008; 285:146-158.
 16. Ng WK, Wang Y. Inclusion of crude palm oil in the broodstock diets of female Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, resulted in enhanced reproductive performance compared to broodfish fed diets with added fish oil or linseed oil. *Aquaculture*. 2011; 314(1-4):122-131.
 17. Turchini GM, Torstensen BE, Ng WK. Fish oil replacement in finfish nutrition. *Aquaculture*. 2009;1:10-57.
 18. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC n. 482, de 23 de setembro de 1999. Aprova o Regulamento Técnico para fixação de identidade e qualidade de óleos e gorduras vegetais. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 13 out 1999, Seção 1, n. 196-E, p. 82-87.
 19. Martino RC, Cyrino JEP, Portz L, Trugo LC. Performance and fatty acid composition of surubim (*Pseudoplatystoma coruscans*) fed diets with animal and plant lipids. *Aquaculture*. 2002b;209:233-46.
 20. Lovshin LL. Tilapia aquaculture in Brazil. In: Costa-Pierce BA, Rakocy JE. Tilapia aquaculture in the Americas. *Aquaculture*. 2000;2:133-140.
 21. Tonial IB, Bravo CEC, Souza NE, Matsushita M, Furuya WM, Visentainer JV. Nutritional quality of lipids tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed with supplemented diets with soybean oil. *Alim Nutr*. 2011;22(1):103-112.
 22. Aiura FS, Carvalho MRB. Fatty acid composition and filet yield of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed with diets containing tannin. *RPCV*. 2004; 99(550):93-98.
 23. Association of Official Analytical (AOAC). Official method of analysis. 16. ed. Arlington: Chemists Inc; 1997.
 24. Silva PHF, Carvalho MCL. Determinação de nitrogênio em leite pelo método de Kjeldahl. *Rev Inst Latic Cândido Tostes*. 1993;48:30-6.
 25. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem*. 1959;31:911-17.
 26. Joseph JD, Ackman RG. Capillary column gas chromatography method for analysis of encapsulated fish oil and fish oil ethyl esters: collaborative study. *J AOAC Int*. 1992;75:488-06.
 27. Ackman RG. Nutritional composition of fats in seafoods. *Food Nut Sci*. 1989;13:161-241.
 28. Vila Nova CMVM, Godoy HT, Aldrigue, ML. Composição química, teor de colesterol e caracterização dos lipídios totais de tilápia (*Oreochromis niloticus*) e pargo (*Lutjanus purpureus*). *Cienc Tecnol Aliment*. 2005;25(3):430-36.
 29. Maia EL, Rodriguez-Amaya DB. Fatty acid composition of the total, neutral and phospholipids of the Brazilian freshwater fish *Colossoma macropomum*. *Elsevier Sci*. 1992;633-42.
 30. Maia EL, Rodriguez-Amaya DB, Hotta LK. Fatty acids composition of the total, neutral and phospholipids of pond-raised Brazilian *Piaractus mesopotamicus*. *Int J Food Sci Technol*. 1995;30:591-97.
 31. Gaiotto JB, Menten, JFM, Racanicci AMC, Iafigliola MC. Óleo de soja, óleo ácido de soja e sebo bovino como fontes de gordura em rações de frangos de corte. *Rev Bras Cienc Avic*. 2000;2(3):219-27.
 32. Sanibal EAA, Mancini Filho J. Perfil de ácidos graxos *trans* de óleo e gordura hidrogenada de soja no processo de fritura. *Cienc Tecnol Aliment*. 2004;24(1):27-31.
 33. Huang CH, Huang MC, Lee AC. Characteristics of lipid peroxidation in sarcoplasmicreticulum of tilapia. *Food Sci*. 1998;25:104-108.
 34. Lima MF, Henriques CA, Santos FD, Andrade PMM, Carmo MGT. Omega 3 fatty acid (DHA: 22:6 n-3) and neonatal development: aspects related to its essentiality and supplementation. *Rev Soc Bras Aliment Nutr*. 2004;28:65-77.
 35. Von Schacky C. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease. Lipid metabolism and therapy. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007;10(2):129-35.
 36. Report on Health and Social Subjects. Department of Health. Nutritional aspects of cardiovascular disease. Londres. 1994;46:37-46.
 37. Mahfouz MM, Kummerow FA. Hydrogenated fat high in trans monoenes with an adequate level of linoleic acid has no effect on prostaglandin synthesis in rats. *J Nutr*. 1999;129:15-24.

Efeito da adição de radícula de malte na ração de frangos de corte: composição físico-química e perfil de ácidos graxos da carne

Effect of the addition of malt radicle on the broiler feed: physico-chemical composition and meat fatty acid profile

RIALA6/1438

Daiana NOVELLO^{1*}, Ricardo Alves da FONSECA², Jamile Kailer dos SANTOS¹

*Endereço para correspondência: ¹Setor de Ciências da Saúde, Departamento de Nutrição, Universidade Estadual do Centro-Oeste (Unicentro), Rua Camargo Varela de Sá, 3, Bairro Vila Carli, CEP 85040-080, Guarapuava, PR.
E-mail: nutridai@hotmail.com

²Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Roraima (UFRR).

Recebido: 21.06.2011 - Aceito para publicação: 09.02.2012

RESUMO

A composição química e o perfil de ácidos graxos (AG) foram analisados nas carnes (peito e coxa/sobrecoxa) de frangos de corte alimentados com ração contendo diferentes teores de radícula de malte (10% e 20%) e na ração de controle. O experimento foi constituído por três tratamentos e cinco repetições, com 10 aves por unidade experimental. O tratamento contendo 20% de radícula diminuiu ($p > 0,05$) a quantidade de lipídios ($2,78 \pm 0,23\%$; $15,40 \pm 0,24\%$) e o total de ácidos graxos saturados (AGS) ($0,75 \pm 0,03$ g/100 g; $4,33 \pm 0,03$ g/100 g), respectivamente, no corte do peito e na coxa/sobrecoxa dos frangos. Não houve modificação no teor total de ácidos graxos monoinsaturados e poli-insaturados (AGMI e AGPI) na carne da coxa/sobrecoxa após a adição de radícula de malte. Contudo, a adição de 20% de radícula de malte reduziu a quantidade total de AGMI ($0,85 \pm 0,04$ g/100 g) e de AGPI ($0,88 \pm 0,08$ g/100 g) na carne do peito. O acréscimo de 10% de radícula nas rações promoveu o aumento no total de AGPI ($1,81 \pm 0,03$ g/100 g), na relação n-6/n-3 ($21,66 \pm 0,08$) e AGPI/AGS ($1,24 \pm 0,06$) na carne do peito. A utilização da radícula de malte é uma alternativa viável na alimentação de frangos de corte, a qual proporciona modificações benéficas no perfil de AGS, AGMI e AGPI, principalmente na carne do peito.

Palavras-chave. cevada, aves, cereais, nutrição.

ABSTRACT

This study analyzed the chemical composition and the fatty acids (FA) profile of meats (chest and thigh/on-thigh) from broilers fed with different malt radicle amounts (10% and 20%) and control feed. The experiment consisted of three treatments and five replicates, with 10 birds for experimental unit. Treatment with 20% radicle decreased ($p > 0.05$) the lipids contents ($2.78 \pm 0.23\%$, $15.40 \pm 0.24\%$) and the total saturated fatty acids (SFA) (0.75 ± 0.03 g/100 g; 4.33 ± 0.03 g/100 g) in both chest cut and thigh/on-thigh meats, respectively. No change in the total contents of monounsaturated and polyunsaturated fatty acids (MUFAs and PUFAs) was noted after adding the malt radicle into thigh/on-thigh meats. However, the addition of 20% of malt radicle reduced the total amount of MUFAs (0.85 ± 0.04 g/100 g) and PUFAs (0.88 ± 0.08 g/100 g) in the chest meat. The increase of 10% of radicle in the feed promoted an enhancement of total PUFAs (1.81 ± 0.03 g/100 g), of n-6/n-3 ratio (21.66 ± 0.08) and PUFAs/SFA (1.24 ± 0.06) in chest meat. The use of malt radicle is a viable alternative for feeding broilers, which provides beneficial changes in the SFA, MUFAs and PUFAs profiles, especially in the bird chest meat.

Keywords. barley, birds, cereals, nutrition.

INTRODUÇÃO

A avicultura no Brasil é uma das atividades mais avançadas tecnologicamente, em especial a de corte, com níveis de produtividade similares aos de países mais desenvolvidos, o que contribui de forma significativa para o fornecimento de proteína animal de baixo custo, que é geradora de riquezas para o país¹.

A carne é considerada um alimento altamente complexo e uma importante fonte de proteínas, lipídios e sais minerais, sendo constituída, geralmente, por 60% a 80% de água e 15% a 25% de proteína, e o restante é formado principalmente por gorduras, sais, pigmentos e vitaminas. São alimentos preferidos pela maioria dos consumidores, mas, muitas vezes, são apontados como alimentos com alto teor de colesterol, gordura e ácidos graxos saturados e baixos níveis de ácidos graxos insaturados. Dessa forma, surgem as pesquisas para desenvolvimento de produtos cárneos funcionais inovadores, visando a atender às novas expectativas nutricionais dos consumidores².

Um significativo número de pesquisas em humanos e animais acumulou-se ao longo dos anos, atestando a neutralidade dos AGMI (ácidos graxos monoinsaturados) na elevação dos níveis de colesterol sérico. Estudos mais atualizados mostram que, quando se substitui os AGS (ácidos graxos saturados) por AGMI, os níveis de *low-density lipoprotein* (LDL) diminuem, enquanto os de *high-density lipoprotein* (HDL) permanecem inalterados. Já os AGPI (ácidos graxos poli-insaturados) naturalmente são benéficos, uma vez que reduzem agregações de plaquetas e triglicerídeos e, conseqüentemente, o risco de doenças cardíacas. Os ácidos graxos ômega-6 (n-6, 18:2) e ômega-3 (n-3, 18:3) são classificados como essenciais, pois o organismo não os produz, devendo ser ingeridos pela alimentação diária³.

Significativos entre a classe crescente de alimentos funcionais são aqueles enriquecidos com ácidos graxos n-3. A manipulação dos perfis de ácidos graxos da carne e produtos cárneos pode ser alcançada, dentre outras formas, fornecendo-se aos animais dietas contendo alimentos ricos em AGPI, produzindo-se, assim, perfis de AG (ácidos graxos) mais saudáveis^{4,5}.

A região oeste do estado do Paraná concentra um significativo número de agroindústrias voltadas a produção, abate e comercialização de frangos de corte. Estas, geralmente, produzem e comercializam a ração

utilizada na alimentação das aves e, por meio do sistema de integração, trabalham com inúmeros produtores⁶. Entretanto, a indústria alimentícia, sendo altamente competitiva, deve assegurar que seus produtos sejam de alta qualidade, baratos e que eles estejam seguros e nutritivos. Sendo assim, as empresas devem apresentar uma forte coordenação das atividades que reflita em sua inserção no mercado⁷.

A utilização desses alimentos na formulação de ração animal é regionalizada, sobretudo a radícula de malte. Esta é obtida a partir da cevada maltada pela remoção das radículas e brotos, podendo incluir cascas e outras partes do grão no processo industrial para fabricação da cerveja¹. A região centro-oeste do Paraná apresenta essa característica, devido ao fato de abrigar no distrito de Entre Rios (Guarapuava) uma das maiores maltarias do país. As rações produzidas nessa região são as únicas que possuem continuamente em sua formulação cevada cervejeira e radícula de malte⁸. Porém, necessitam ser caracterizadas por meio de testes biológicos para se conhecerem os níveis adequados que devem ser incluídos nas rações.

Esses alimentos vêm sendo utilizados em pequena escala e com certo empirismo na alimentação animal, já que o número de pesquisas que versam sobre seu uso é limitado. A qualificação primária desses ingredientes, obtida pela definição de sua composição química, não é plenamente conhecida, necessitando de aprimoramento para uso.

Sabendo-se da relevância da avaliação de novos alimentos utilizados nas rações que influenciam a qualidade da carne, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da utilização de radícula de malte na composição de ácidos graxos e na análise físico-química da carne de frangos de corte.

MATERIAL E MÉTODOS

Local, animais e rações

O experimento foi conduzido no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual do Centro-Oeste (Unicentro), em Guarapuava-PR.

Foram utilizados frangos de corte machos de linhagem híbrida comercial, criados de 1 a 40 dias de idade, alojados em gaiolas, com peso médio inicial de 38 g. O ambiente foi climatizado durante todo o período experimental, para maior conforto térmico dos animais.

Para a realização do estudo, os animais do experimento receberam ração de controle (tratamento 1) e ração contendo 10% (tratamento 2) e 20% de radícula de malte (tratamento 3). O alimento teste, com os dois níveis, foi incluído em uma ração referência, calculada segundo Rostagno et al.⁹ (Tabela 1). Ração e água foram fornecidos *ad libitum*. Na Tabela 2, está indicado o perfil de ácidos graxos das rações utilizadas como tratamentos experimentais.

Tabela 1. Ingredientes e composição centesimal da ração controle

Ingredientes	Quantidade (%)
Milho (grão)	59,30
Soja (farelo 45%)	34,33
Óleo de soja	1,98
Fosfato bicálcico	1,78
Calcário	0,96
Arroz (casca)	0,50
Sal comum	0,44
DL-metionina	0,23
Px vitamínico-ave ¹	0,20
L-lisina HCl	0,18
Px mineral-ave ²	0,10
Total	100,00
Composição calculada	
Energia metabolizável aves (kcal/kg)	2.950,00
Proteína bruta	21,04
Cálcio	0,94
Fósforo disponível	0,44
Lisina total	1,24
Met + cistina total	0,88
Metionina total	0,55
Triptofano total	0,26
Sódio	0,22
Potássio	0,81
Ácido linoleico	2,44
Fibra bruta	3,39
Cloro	0,30

Ração calculada segundo Rostagno et al.⁹.

¹Mistura de vitaminas: vitamina A, 10.000 U.I.; vitamina D₃, 2000 U.I.; vitamina E, 30 U.I.; vitamina B₁, 2,0 mg; vitamina B₂, 6,0 mg; vitamina B₆, 4,0 mg; vitamina B₁₂, 0,015 mg; ácido pantotênico, 12,0 mg; biotina, 0,1 mg; vitamina K₃, 3,0 mg; ácido fólico, 1,0 mg; ácido nicotínico, 50,0 mg.

²Mistura de minerais: ferro, 50 mg; cobalto, 1,0 mg; cobre, 10,0 mg; magnésio, 80,0 mg; zinco, 50,0 mg; iodo, 1,0 mg.

Abate e preparo das amostras

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, constituído por três tratamentos e cinco repetições, com dez aves por unidade experimental,

perfazendo um total de 150 animais. No final do período experimental, aos 40 dias de idade, as aves foram pesadas em balança com divisão de 5 g e, após jejum de seis horas, foram sacrificadas. Logo após o abate, foram congeladas à temperatura de -18 °C, até sua análise química.

Para as análises, as carcaças foram descongeladas em refrigerador com temperatura aproximada de 10 °C por 24 horas. Foram, então, eliminadas das amostras de peito e de coxa/sobrecoxa toda a gordura visível e a pele. A carne foi moída em processador até obter uma consistência pastosa. As análises de umidade (matéria seca) e cinzas (matéria mineral) foram realizadas no Laboratório de Engenharia de Processos, do Departamento de Engenharia de Alimentos da Unicentro, Guarapuava-PR.

Uma parte das amostras foi armazenada em bandejas etiquetadas, sendo alocadas em estufa com ar circulante a 55 °C por 24 horas, para retirada da umidade. Em seguida, foram envolvidas em embalagens hermeticamente fechadas e enviadas para o Laboratório de Análises Físico-Químicas da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Suínos e Aves, localizada na cidade de Concórdia-SC, que procedeu às análises de proteína bruta, extrato etéreo e perfil de AG.

Análises físico-químicas

Para as análises bromatológicas da carne, foram utilizadas as seguintes metodologias, em triplicata: para determinação da umidade e cinzas, utilizou-se procedimento segundo o Instituto Adolfo Lutz¹⁰; as proteínas totais foram quantificadas pelo método Micro-Kjedahl¹¹; a análise de lipídios totais foi realizada segundo metodologia da AOAC¹¹.

Análise de ácidos graxos

A avaliação dos ácidos graxos foi realizada em matéria seca e em duplicata utilizando-se a metodologia de Hartman e Lago¹², por cromatografia gasosa. A identificação dos AG foi por comparação dos triglicerídeos dos ésteres metílicos da amostra com os triglicerídeos de padrões autênticos (ésteres metílicos Sigma).

Análises estatísticas

Os dados estatísticos foram analisados utilizando-se o programa estatístico Sistema de Análise de Variância (Sisvar), a um nível de significância de 5%, utilizando teste de Tukey.

Tabela 2. Composição físico-química (proteína bruta, extrato etéreo) e perfil de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados (g/100 g) da ração de controle e adicionada de 10% e 20% de radícula de malte

Avaliação	Ração de controle média ± DP	Ração com 10% de radícula de malte média ± DP	Ração com 20% de radícula de malte média ± DP
Proteína bruta*	20,51 ± 0,15	20,61 ± 0,09	20,55 ± 0,08
Extrato etéreo*	4,61 ± 0,12	5,12 ± 0,02	6,39 ± 0,10
Ácidos graxos saturados (AGS)**			
Ácido mirístico (14:0)	0,18 ± 0,09	0,05 ± 0,06	0,08 ± 0,05
Ácido araquídico (20:0)	ND	0,56 ± 0,04	–
Ácido palmítico (16:0)	11,23 ± 0,07	11,57 ± 0,03	12,08 ± 0,05
Ácido esteárico (18:0)	3,49 ± 0,03	3,70 ± 0,03	3,84 ± 0,02
Total	14,90 ± 0,05	15,88 ± 0,06	16,00 ± 0,05
Ácidos graxos monoinsaturados (AGMI)**			
Ácido oleico (18:1, n-9 cis)	28,01 ± 0,05	26,50 ± 0,02	25,25 ± 0,05
Ácido eicosenoico (20:1, n-9 cis 11)	0,17 ± 0,03	0,36 ± 0,01	0,29 ± 0,04
Ácido palmítico (16:1, n-9)	–	0,08 ± 0,02	0,16 ± 0,03
Total	28,18 ± 0,05	26,94 ± 0,04	25,7 ± 0,02
Ácidos graxos poli-insaturados (AGPI)**			
Ácido linoleico (18:2, n-6)	51,17 ± 0,02	51,13 ± 0,03	51,57 ± 0,02
Ácido a-linolênico (18:3, n-3)	3,67 ± 0,04	4,59 ± 0,03	5,52 ± 0,02
Total	54,84 ± 0,05	55,72 ± 0,03	57,09 ± 0,04
Relação n-6/n-3	13,90 ± 0,02	11,14 ± 0,02	9,34 ± 0,01
Relação AGPI/AGS	3,68 ± 0,05	3,51 ± 0,06	3,57 ± 0,06

As análises foram realizadas em triplicata* e duplicata**, utilizando-se a homogeneização de 10 amostras aleatorizadas de cada tratamento.

As análises são expressas em base de matéria seca.

ND: Não disponível.

DP: Desvio-padrão da média.

Tabela 3. Composição físico-química da carne de frangos, peito e coxa/sobrecoxa, alimentados com ração de controle e adicionada de 10% e 20% de radícula de malte, em relação a umidade, cinzas, proteína bruta (PB) e extrato etéreo (EE)

Tratamentos	Umidade (%)		Cinzas (%)		PB (%)		EE (%)	
	Peito média ± DP	Coxa/ sobrecoxa média ± DP	Peito média ± DP	Coxa/ sobrecoxa média ± DP	Peito média ± DP	Coxa/ sobrecoxa média ± DP	Peito média ± DP	Coxa/ sobrecoxa média ± DP
Tratamento de controle	73,49 ± 0,10 ^a	75,62 ± 0,09 ^a	1,34 ± 0,09 ^a	1,07 ± 0,14 ^a	85,30 ± 0,15 ^a	82,94 ± 0,13 ^a	4,65 ± 0,21 ^a	20,72 ± 0,32 ^a
Tratamento com 10% de radícula de malte	74,50 ± 0,12 ^a	73,41 ± 0,08 ^a	1,12 ± 0,15 ^b	0,92 ± 0,20 ^a	73,55 ± 0,20 ^a	80,85 ± 0,22 ^a	5,34 ± 0,11 ^a	18,03 ± 0,23 ^a
Tratamento com 20% de radícula de malte	74,67 ± 0,09 ^a	76,69 ± 0,10 ^a	1,19 ± 0,09 ^{ab}	1,00 ± 0,13 ^a	84,39 ± 0,21 ^a	81,49 ± 0,24 ^a	2,78 ± 0,23 ^b	15,40 ± 0,24 ^b

Medidas na coluna seguidas de letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey (p < 0,05).

As análises são expressas em base de matéria seca.

DP: Desvio-padrão da média.

As análises foram realizadas em triplicata, utilizando-se a homogeneização de 10 amostras aleatorizadas de cada tratamento.

Tabela 4. Perfil de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados (g/100 g) do peito e coxa/sobrecoxa dos frangos de corte alimentados com ração de controle e adicionada de 10% e 20% de radícula de malte

Tratamento	Tratamento de controle		Tratamento com 10% de radícula de malte		Tratamento com 20% de radícula de malte	
	Peito média ± DP	Coxa/ sobrecoxa média ± DP	Peito média ± DP	Coxa/ sobrecoxa média ± DP	Peito média ± DP	Coxa/ sobrecoxa média ± DP
Ácidos graxos saturados (AGS)						
Ácido mirístico (14:0)	0,02 ± 0,02 ^c	0,09 ± 0,02 ^a	0,01 ± 0,01 ^c	0,07 ± 0,02 ^b	0,01 ± 0,02 ^c	0,06 ± 0,02 ^b
Ácido palmítico (16:0)	0,88 ± 0,01 ^e	4,20 ± 0,03 ^a	1,11 ± 0,02 ^d	3,73 ± 0,03 ^b	0,52 ± 0,01 ^f	3,10 ± 0,03 ^c
Ácido esteárico (18:0)	0,30 ± 0,03 ^c	1,22 ± 0,02 ^a	0,34 ± 0,02 ^c	1,03 ± 0,02 ^b	0,22 ± 0,01 ^c	1,16 ± 0,02 ^a
Total	1,20 ± 0,04 ^d	5,51 ± 0,02 ^a	1,46 ± 0,03 ^d	4,83 ± 0,02 ^b	0,75 ± 0,03 ^c	4,33 ± 0,03 ^c
Ácidos graxos monoinsaturados (AGMI)						
Ácido palmítico (16:1, n-9)	0,20 ± 0,05 ^c	1,07 ± 0,04 ^a	0,24 ± 0,02 ^c	1,04 ± 0,03 ^a	0,07 ± 0,01 ^d	0,78 ± 0,02 ^b
Ácido oleico (18:1, n-9 cis)	1,75 ± 0,03 ^c	7,71 ± 0,01 ^a	1,90 ± 0,02 ^d	6,10 ± 0,03 ^b	0,79 ± 0,04 ^f	5,22 ± 0,02 ^c
Ácido eicosenoico (20:1, n-9 cis 11)	–	0,07 ± 0,02 ^a	–	0,07 ± 0,03 ^a	–	0,07 ± 0,10 ^a
Total	1,94 ± 0,01 ^b	8,86 ± 0,05 ^a	2,14 ± 0,08 ^b	7,21 ± 0,05 ^a	0,85 ± 0,04 ^c	6,06 ± 0,09 ^a
Ácidos graxos poli-insaturados (AGPI)						
Ácido linoleico (18:2, n-6)	0,98 ± 0,02 ^d	4,27 ± 0,02 ^a	1,73 ± 0,04 ^c	4,05 ± 0,02 ^b	0,82 ± 0,01 ^d	4,38 ± 0,05 ^a
Ácido a-linolênico (18:3, n-3)	0,07 ± 0,05 ^b	0,30 ± 0,02 ^a	0,08 ± 0,04 ^b	0,32 ± 0,03 ^a	0,06 ± 0,01 ^b	0,32 ± 0,03 ^a
Total	1,05 ± 0,05 ^c	4,57 ± 0,04 ^a	1,81 ± 0,03 ^b	4,37 ± 0,07 ^a	0,88 ± 0,08 ^d	4,70 ± 0,06 ^a
Relação n-6/n-3	14,67 ± 0,05 ^b	14,09 ± 0,09 ^b	21,66 ± 0,08 ^a	12,54 ± 0,07 ^c	14,44 ± 0,07 ^b	13,83 ± 0,07 ^{bc}
Relação AGPI/AGS	0,88 ± 0,06 ^b	0,83 ± 0,04 ^b	1,24 ± 0,06 ^a	0,90 ± 0,08 ^b	1,17 ± 0,09 ^a	1,09 ± 0,06 ^b

Medidas na linha seguidas de letras diferentes diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

As análises são expressas em base de matéria seca.

DP: Desvio-padrão da média.

As análises foram realizadas em duplicata, utilizando-se a homogeneização de 10 amostras aleatorizadas de cada tratamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 3, estão descritos os resultados das análises físico-químicas da carne dos frangos submetidos aos tratamentos experimentais.

A carne dos frangos alimentados com ração referência obteve maior quantidade de cinzas que aqueles tratados com 10% de radícula de malte. Em relação ao extrato etéreo, observa-se que a ração contendo 20% de radícula de malte foi a que obteve menor quantidade de lipídios, em ambos os cortes ($p < 0,05$). Alguns autores sugerem que a quantidade de gordura mais baixa em frangos alimentados com gorduras poli-insaturadas, comparada com aqueles alimentados com gorduras saturadas (Tabela 2), pode ser explicada por uma taxa aumentada no catabolismo lipídico e por uma diminuição da síntese de AG¹³, o que foi verificado neste estudo. Contudo, a modificação na composição de AG da gordura intramuscular parece ser mais limitada, o que pode ser explicado pelo fato desses AG serem utilizados, principalmente, como componentes de membranas celulares, sendo que a célula tem de manter

suas características físicas para assegurar a fluência e a permeabilidade, que possuem combinações diferentes⁵.

As avaliações de umidade e proteína bruta não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos ($p > 0,05$), nos dois cortes cárneos avaliados.

Valores superiores de lipídios e proteínas no peito e coxa foram relatados por Van Heerden et al.¹⁴, que estudaram a composição química de frangos vendidos no comércio da África do Sul. Em relação aos teores de cinzas, os autores informam valores inferiores no peito e semelhantes na coxa àqueles verificados no presente estudo.

Na Tabela 4, verifica-se o perfil de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados do peito e coxa/sobrecoxa dos frangos submetidos aos tratamentos com e sem radícula de malte.

Verifica-se que a carne da coxa/sobrecoxa do tratamento de controle apresentou o maior teor de ácido graxo mirístico ($p < 0,05$), seguido pelas amostras contendo 10% e 20% de radícula, o que está de acordo com a quantidade de AG mirístico encontrado na ração oferecida aos animais (Tabela 2). O ácido graxo palmítico

apresentou maior teor na carne da coxa/sobrecoxa do tratamento de controle, seguido da amostra contendo 10% de radícula, e a menor quantidade ($p < 0,05$) foi verificada na porção do peito dos frangos alimentados com 20% de radícula. Quantidades superiores de ácido graxo esteárico foram verificadas nas porções de coxa/sobrecoxa das amostras de controle e com 20% de radícula de malte.

Constata-se, também, que a ração de controle proporcionou maior teor total de AGS nos cortes cárneos, diminuindo conforme se aumentou a adição de radícula de malte nas rações. Ressalta-se que as quantidades mais elevadas de AGS foram encontradas nas porções de coxa/sobrecoxa, sendo consideradas de qualidade inferior para consumo. Apesar disso, Grande⁴ explica que os ácidos graxos com comprimento de cadeia variando de 4 a 10 átomos de carbono não são capazes de aumentar o colesterol sérico. Porém, os ácidos graxos láurico e mirístico são considerados hiperlipidêmicos para a saúde humana¹⁵.

Conforme se observa na Tabela 2, o teor de ácidos graxos palmítico e esteárico das três rações são muito semelhantes, o que demonstra haver, provavelmente, outras interferências para deposição desses ácidos graxos nos tecidos dos animais além da quantidade presente na ração.

Em todas as avaliações de ácidos graxos AGMI, é possível verificar que as porções da coxa/sobrecoxa dos três tratamentos apresentaram os teores mais elevados, principalmente nas amostras de controle. Já, as maiores reduções ocorreram na carne do peito das amostras contendo 20% de radícula de malte. Resultados superiores na carne da coxa e inferiores no peito, em relação à composição de ácido graxo palmitoleico e oleico, foram verificados por Souza et al.¹⁶, que analisaram carne de frango assada. Os autores relataram também que o principal AGMI foi o oleico, sendo encontrado em maior quantidade na coxa, corroborando com os resultados deste estudo. Valores superiores de ácido graxo palmitoleico e oleico, tanto na carne do peito como na coxa/sobrecoxa, foram relatados também por Van Heerden et al.¹⁴.

De forma semelhante, maiores teores de AGPI foram verificados na carne da coxa/sobrecoxa dos três tratamentos. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos para o AG α -linolênico, avaliando-se os cortes individualmente. Esses resultados são benéficos, uma vez que um aumento no teor de AGPI pode aumentar a suscetibilidade da oxidação lipídica na carne.⁵

Diferenças no perfil dos AG dos tecidos podem ser atribuídas às distintas funções desses compostos nestes locais ou por seu diferente conteúdo de fosfolípidios. Os AGPI são, preferencialmente, incorporados em fosfolípidios que estão em uma proporção mais alta no peito que nos músculos da coxa¹⁷. Porém, apenas a adição de 10% de radícula de malte à ração proporcionou o aumento do total de AGPI na carne do peito desses animais, e o acréscimo de 20% de radícula reduziu o teor desses ácidos graxos, mostrando que, possivelmente, há outros mecanismos que interferem na incorporação desses compostos nos tecidos do organismo. Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre as porções de coxa/sobrecoxa dos três tratamentos.

Alguns trabalhos avaliando as relações entre famílias diferentes de AGS, AGMI e AGPI mostraram que o teor de AGPI nos tecidos de frangos dependem mais da variação dietética do conteúdo de AG do que da quantidade de AGS e AGMI nos tecidos⁵.

Em relação à razão de AG n-6/n-3, o maior resultado foi encontrado nos animais alimentados com 10% de radícula de malte, no peito, considerada de qualidade nutricional inferior. O menor valor foi encontrado na porção da coxa/sobrecoxa das amostras com 10% de radícula. Apesar disso, todos os tratamentos apresentaram-se bem acima do recomendado para a dieta humana, que é de 5:1 a 10:1¹⁸, implicando a necessidade de compensar essa deficiência com o consumo de outros alimentos ricos em n-3.

A relação AGPI/AGS foi maior na carne do peito de ambos os tratamentos contendo radícula de malte, considerados de melhor qualidade para a saúde humana¹⁸.

Dados contrários ao presente estudo foram relatados por Souza et al.¹⁶ e Van Heerden et al.¹⁴, que verificaram, para os ácidos graxos C18:2 n-6 e C18:3 n-3 e na relação AGPI/AGS, valores inferiores no peito e superiores na coxa/sobrecoxa sem pele. Entretanto, referiram que o ácido graxo linoleico apareceu em maior quantidade, sendo superior na coxa, o que também se verificou nesta pesquisa.

CONCLUSÃO

A adição de 20% de radícula de malte proporcionou uma redução no teor de lipídios e de AGS tanto na carne do peito quanto na coxa/sobrecoxa dos frangos, sendo mais benéfica para o consumo humano.

Entretanto, promoveu menor acúmulo no total de AGMI e AGPI na porção do peito, demonstrando-se de qualidade nutricional inferior.

O nível de adição de 10% de radícula de malte nas rações dos frangos foi o mais eficiente para elevar o teor total de AGPI na carne do peito, sendo o mais favorável nutricionalmente, porém apresentou razão n-6/n-3 muito superior àquela recomendada para a dieta humana.

AGRADECIMENTOS

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Suínos e Aves de Concórdia-SC, pela parceria realizada nas análises químicas.

À Indústria Agrária de Entre Rios, pela doação das rações e pintainhos.

REFERÊNCIAS

1. Teixeira AS. Alimentos e alimentação dos animais. 4. ed. Lavras: UFLA/FAEPE; 1997.
2. Arihara K. Strategies for designing novel functional meat products. *Meat Sci*. 2006; 74(1):219-29.
3. Hulbert AJ, Turner N, Storlien LH, Else PL. Dietary fats and membrane function: implications for metabolism and disease. *Biol Rev*. 2005; 80(1):155-69.
4. Grande F. Serum lipid response to dietary fats differing in the chain length of the saturated fatty acids. *J Nutr*. 1962; 76(1):255-62.
5. Cortinas L, Villaverde C, Galobart J, Baucells MD, Codony R, Barroeta AC. Fatty acid content in chicken thigh and breast as affected by dietary polyunsaturation level. *Poult Sci*. 2004; 83(7):1155-64.
6. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Levantamento sistemático da produção agrícola. [acesso 2006 mar 20]. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br].
7. Santini G, Meirelles H. Relatório Setorial Final - Carnes. FINEP, 2004. [acesso 2008 out 15]. Disponível em: [http://www.finep.gov.br/PortalDPP/relatorio_setorial].
8. Cooperativa Agrária Mista Entre Rios - Agrária. História da Agrária. [acesso 23 dez 2011]. Disponível em: [http://www.agraria.com.br/brasil/pagina.php?menu=comunicacao_noticia&banner=comunicacao&comunicacao_noticia=mostra_noticia&idnoticia=386].
9. Rostagno HS, Albino LFT, Donzele JL, Gomes PC, Oliveira RF, Lopes DC, et al. Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais. 2. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 2005.
10. Instituto Adolfo Lutz. Normas analíticas: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3. ed. São Paulo: IAL; 1985.
11. Association of Official Analytical Chemists - AOAC. In: Official Methods of Analysis of AOAC International. 16. ed. Method 976.06 G.H. Arlington: Patricia Cunniff; 1995. p. 7-9.
12. Hartman L, Lago RCA. Rapid preparation of fatty acids methyl esters from lipids. *Lab Practice*. 1986; 22:475-6.
13. Sanz M, López-Bote CJ, Menoyo D, Bautista JM. Abdominal fat deposition and fatty acid synthesis are lower and β -oxidation is higher in broiler chickens fed diets containing unsaturated rather than saturated fat. *J Nutr*. 2000; 130(12):3034-7.
14. Van Heerden SM, Schonfeldt HC, Smith MF, Van Rensburg DMJ. Nutrient content of South African chickens. *J Food Compos Anal*. 2002; 15(1):47-64.
15. Bonanome AMD, Grundy SM. Effect of dietary stearic acid on plasma cholesterol and lipoprotein levels. *N Engl J Med*. 1988; 318(19):1244-8.
16. Souza SAB, Visentainer JV, Matsushita M, Souza NE. Lipids and fatty acids in roasted chickens. *Arch Latinoam Nutr*. 1999; 4(3):295-7.
17. Ratnayake WMN, Ackman RG, Hulan HW. Effect of redfish meal enriched diets on the taste and n-3PUFA of 42-day-old broiler chickens. *J Sci Food Agr*. 1989; 49(1):59-74.
18. Food and Nutrition Board. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids. Washington: The National Academies Press; 2005.

Determination of As (III) and As (V) in grape juice samples by differential pulse cathodic stripping voltammetry

Determinação de As (III) e As (V) em amostras de suco de uva por voltametria de redissolução catódica

RIALA6/1439

Juliana Machado de CARVALHO, Katia Christina LEANDRO*

*Endereço para correspondência: Departamento de Química, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), FIOCRUZ-RJ, Avenida Brasil, 4365. CEP: 21.040-900, Mangueiras, Rio de Janeiro, Brasil. Tel.: + 55 (21) 3865-5180. E-mail: katia.leandro@incqs.fiocruz.br.

Recebido: 20.08.2010 - Aceito para publicação: 31.01.2012

RESUMO

O presente estudo descreve um método voltamétrico simples e sensível para a determinação de As (III) e As (V), em $\mu\text{g.L}^{-1}$. As (III) é determinado pela análise direta, e As (V) é convertido em As (III) por uma solução de redução. A nova concentração de As (III) representa a concentração de As inorgânico total na amostra em análise. As (V) foi determinado pela subtração do As inorgânico total e do As (III). Os limites de quantificação e detecção de As (III) foram, respectivamente, 0,22 e 0,08 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para o tempo de deposição de 180 s; a faixa linear foi de 1 a 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e desvio-padrão ($n = 10$) de 5%, em potencial de -0,68 V. A precisão foi verificada por meio de teste de recuperação em amostras fortificadas [de 98,2% para As (III) e de 96,4% para As (V)]. Estes resultados foram comparados com a análise feita por espectrometria de absorção atômica com geração de hidreto. O método voltamétrico foi aplicado na especiação do arsênio em amostras de sucos de uva contendo concentrações de 51 a 71 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de As (III) e 34 a 60 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de As (V).

Palavras-chave. especiação de arsênio, suco de uva, voltametria de redissolução catódica.

ABSTRACT

This study describes a simple and sensitive voltammetric method for determining As (III) and As (V) concentrations in $\mu\text{g.L}^{-1}$. Electroactive As (III) is evaluated by direct analysis. As (V) is converted into As (III) using reduction solution; the new As (III) concentration, represents the total inorganic As in the analyzed sample. As (III) and total inorganic As determination showed a work potential peak at -0.68 V; As (V) concentration was determined by subtraction [total inorganic As – As (III)]. Quantification and detection limits for As (III) were 0.22 and 0.08 $\mu\text{g.L}^{-1}$, respectively, for a deposition time of 180 s with the linear range from 1 to 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Standard deviation for 1 to 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ arsenic concentration ($n = 10$) was 5%. The methodology was successfully applied for identifying and quantifying the inorganic arsenic in grape juices; and the accuracy was assessed by a recovery test on spiked samples, being 98.2% for As (III) and 96.4% for As (V). These results were compared with those from hydride generation atomic absorption spectrometry analyses. The grape juice samples analyzed by voltammetric technique showed As (III) and As (V) concentrations ranging 51-71 $\mu\text{g.L}^{-1}$ and 34-60 $\mu\text{g.L}^{-1}$, respectively.

Keywords. arsenic speciation, grape juice, cathodic stripping voltammetry.

INTRODUCTION

Arsenic is an element with toxic properties, which has been known for centuries¹, and this specie exists in the nature under varied chemical forms² with different biological properties and toxicity. The inorganic forms of arsenic (arsenite and arsenate) are the major elements responsible for the carcinogenic effect; and these inorganic forms are reported to be hundreds times more toxic than the organic arsenic compounds. Inorganic arsenic induces skin cancer by arsenic ingestion³, and the lung cancer is caused by respiratory exposure⁴.

Due to the occurrence of arsenic in the environment under different oxidation states [As (V), As (III), As (0), and As (-III)], and the fact of the inorganic forms being the mostly dangerous for the health than the organic forms, the speciation of arsenic has been gaining increasing importance. The As (III) has been reported to be 25-60 times more toxic than As (V)⁵. Arsenic has been found in water samples, and in foods and beverages as well^{2,6}.

The bentonite, a volcanic clay, is a technological aid widely used for removing or reducing the concentration of undesirable constituents from grape juice, wine and vinegar. Remarkably, it aids by removing proteins; thus, it reduces the risk of protein hazards in those beverages, also it favors the filtration process, decreases the fermentation time, and it preserves the taste and smell. The protein occurrence could impair the product acceptance by the consumer. However, the bentonite contains arsenic as a contaminant^{7,8}.

Hydride generation (HG) coupled to atomic absorption spectrometry (AAS) has been used for determining the total arsenic in orange juice, water, beer and foods⁹.

This study aimed at investigating the presence of inorganic arsenic, As (III) and As (V), in grape juice samples. The arsenic contents were determined by means of cathodic stripping voltammetry at hanging mercury drop electrode (HMDE). In general, the electrochemical methods are employed for determining the arsenic speciation at low concentration, moreover this methodology is simple and of low cost.

MATERIALS AND METHODS

Instrumentation

The voltammetric system – Metrohm Model 757VA Computrace – in the differential pulse cathodic

stripping voltammetry (DPCSV) was used for determining As contents in grape juices samples. Conventional three measuring cell electrodes were employed: the hanging mercury dropping electrode as working electrode, the Ag/AgCl, KCl (3 mol l⁻¹) as reference electrode, and the platinum wire as auxiliary electrode.

All of the used flasks and pipettes were calibrated before performing the analyses.

Solutions and Reagents

All of the used chemical substances and elements were of the available highest purity and being at least of analytical reagent grade; and Milli-Q processed water (Millipore Corporation, Molsheim, France) was employed for preparing the conditioning solutions.

Standard solution of 1000 mg.L⁻¹ As (III) was prepared by dissolving 0.1320 g As₂O₃ (Sigma, 96.7% purity) in 1 mL of 25% NaOH (Merck), and immediately acidified with 2 mL of concentrated HCl and diluted to 100 mL with ultrapure water. A 50 µg.L⁻¹ work solution of As (III) was prepared daily by diluting the standard solution.

The As (V) standard stock solution (1,000 mg.L⁻¹) was prepared by diluting the standard titrisol arsenic of H₃AsO₄ (Merck, Darmstadt, Germany) (1,000 ± 0.002 g As) to 1,000 mL with ultrapure water containing 300 µg.L⁻¹ As (V), which was prepared by diluting the standard reference solution.

The supporting electrolyte was the 0.4 mole.L⁻¹ HCl solution (Merck), Cu (II) solution containing 5 mg.L⁻¹ which was prepared by diluting Cu (II) standard stock solution (1,000 mg.L⁻¹ Cu) (Merck, Darmstadt, Germany), and 0.004 mg.L⁻¹ Se (IV) solution was diluted from 1,000 mg.L⁻¹ Se standard stock solution (Merck, Darmstadt, Germany).

The chemical reducing agent for determining the total arsenic was prepared by dissolving 1.4 g bisulfite sodium (Sigma, Steinheim, Germany) in 10 mL of water and 5 mL of 10% (v/v) H₂SO₄ (Merck, Darmstadt, Germany), and the other solution was set by dissolving 0.14 g of thiosulfate sodium (Merck, Darmstadt, Germany) in 10 mL of water. The second solution was added to the first one and the mixture was filled up to 50 mL in a volumetric flask.

Method

The principle of arsenic speciation using DPCSV is to determine firstly the electroactive As (III) species and then to convert sequentially the other inorganic As species

into As (III) species for performing the measurement. As (V) is usually reduced to As (III) by means of a chemical reducing agent such as thiosulfate and bisulfite, according to Ferreira and Barros¹⁰. The methodology proposed for determining As (III) and As (V) is based on the determination of As (III), followed by As (V) reduction to As (III), and then the total inorganic arsenic is analyzed. The As (V) is quantified by the difference between the total inorganic arsenic and the As (III) contents.

In spite of arsenic being an electroactive specie that can be measured by cathodic stripping voltammetry, this specie should not be deposited directly onto the mercury electrode. In this study, As (III) reacted with Se (IV) and Cu (II), resulting in an inter-metallic compound ($Cu_xAs_ySe_z$); this might deposited onto the HMDE¹ and then stripped in the cathodic scan, improving the peak shape and enhancing the sensitivity.

The analytical curve (five points) was built by subsequent addition of 0.2 mL of 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ As (III) standard solution into the electrochemical cell containing 10 mL of supporting electrolyte. All measurements were performed in triplicate.

DPCSV measurements were carried out by using stirred deposition at a potential of -0.4 V, and the deposition time was of 180 s. After the 20 s equilibration time, the potential was scanned from -0.60 to -0.80 V with sweep rate of 25 mV s^{-1} and amplitude of 50 mV.

The solutions were deaerated with nitrogen for four minutes before conducting the voltammetric measurements for preventing the interference of dissolved oxygen in the solutions; and at this stage it was needed to reduce As (V) to As (III) for determining the total inorganic arsenic.

For conducting the total inorganic arsenic determination, the samples were added into the voltammetric cell containing 10 mL of supporting electrolyte and 0.2 mL of chemical reducing agent (sodium bisulfite and sodium thiosulfate).

Validation

The methodology was validated following the pertinent recommendations established in the official guide¹¹⁻¹³. The evaluated parameters were: selectivity, linearity (working range), detection and quantification limits, precision (intra-day and inter-day) and accuracy (recovery).

The matrix interference was assessed by comparing the analyte peak currents in ten samples that were fortified with $60 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ As (III), ten samples fortified with 60

$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ As (V), and the peak currents of standard solutions at the same concentration prepared with pure water.

Linearity was determined by employing the least-squares regression. Acceptable linearity was achieved when the coefficient of determination was at least 0.999.

The limits of detection (LOD) and of quantification (LOQ) were calculated as $(3.3 \sigma/S)$ and $(10 \sigma/S)$, respectively, where σ is the standard deviation of the intercepts and S is the slope of the calibration curve. Subsequently, the LOQ was validated by analyzing ten samples with known quantification limit. Both LOD and LOQ values confirm the sensitivity of the proposed methodology¹⁴.

Precision (intra-day and inter-day), accuracy (recovery) and matrix interference were examined through the methodology analytical range with low-, medium, and high-concentration (30 , 60 and $90 \mu\text{g l}^{-1}$) of As (III) and As (V) standard solutions.

Intra-day precision was computed by quantifying seven replicates of each As (III) and As (V) concentrations of two validation days, and calculating the percentage of relative standard deviation (%RSD) for that day; and the highest %RSD was reported. Inter-day precision was calculated by using the variance analysis with F-Test for determining whether a statistically significant difference was occurred in the concentrations which were calculated at each day.

Recovery was calculated from the mean concentration of seven replicates compared to the nominal concentration.

Interference study

Interference caused by substances commonly detected in grape juice, as Pb (II), Cu (II), Zn (II) and Cd (II), were investigated. The DPCSV response to a grape juice solution containing $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ As (III or V) and different levels of Pb (II), Cu (II), Zn (II) and Cd (II) up to $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ was surveyed.

Sample collection

Twelve different brands of commercially available grape juice (S-1 to S-12 samples), collected from Rio de Janeiro (Brazil) were analyzed.

Sample analysis

The grape juice samples were analyzed, after performing the methodology validation.

For determining As (III) in grape juices, 0.5 mL of sample and 10 mL of electrolyte were added into the electrochemical cell. The total inorganic As was determined

by adding 10 mL of supporting electrolyte, 0.5 mL of sample and 0.2 mL of chemical reducing agent into this cell.

The S-1 sample was analyzed by means of hydride generation atomic absorption spectrometry (HG-AAS), and the detected results were compared with those found in the differential pulse cathodic stripping voltammetry using F-test.

RESULTS AND DISCUSSION

The determinations of As (III) and total inorganic showed a work potential peak in at -0.68 V.

The methodology was validated for linearity (working range), detection and quantification limits, matrix interference, precision (intra-day and inter-day) and accuracy (recovery).

The working range was from 1 to 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (y (nA) = $7.775x$ ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) - 0.221) and r -value of 0.9999. The relative standard deviation of analytical curve for all arsenic concentration ($n = 10$) was approximately 5% (Figure 1). The calculated LOD and LOQ for As (III) were 0.08 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and 0.22 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. The LOQ was subsequently validated by analyzing ten samples with known contents and at the quantification limit; and the recovery was of $95.45 \pm 1.78\%$. In the course of the methodology processing, the matrix interference was assessed in samples fortified with As (III) and As (V) standard solutions. No interference of matrix that could affect on the As (III) and total inorganic arsenic quantification was noted. Intra-day and inter-day precisions were evaluated by calculating the %RSD of seven determinations of As (III) and As (V) at each concentration (30, 60, and 90 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) in grape juice samples; and the precisions were less than 1.7 and 1.6%, respectively. Intra-day and inter-day recoveries, which were assessed by calculating the estimated concentrations as a percent of the nominal concentrations, showed as

better than 94.3% and 96.0%, respectively (Table 1). The interference caused by Pb (II), Cu (II), Zn (II) and Cd (II), which commonly occur in grape juice, was minimal and the concentrations were below 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. The accuracy was investigated by using a recovery test in spiked samples. For this purpose, 0.2 mL of 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ As (III) were added into all of samples. The recovery was better than 96.5% for As (III), 94.2% for As (V) (Table 2), and 99.7% for total As in S-1 sample by means of HG-AAS. The F-test was used for comparing the results from S-1 sample when analyzed by both methodologies (DPCSV and HG-AAS), and no statistically significant difference was found.

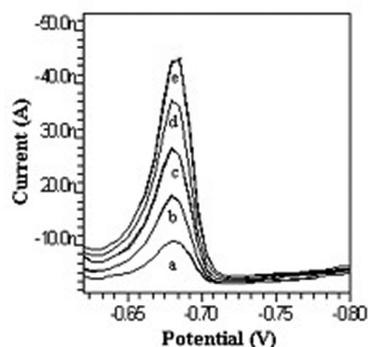


Figure 1. Voltammograms of increasing concentrations of As (III) [0.4 mole.L⁻¹ HCl in the presence of 5 mg.L⁻¹ Cu (II) and 0.004 mg.L⁻¹ Se (IV) as supporting electrolyte, 50 mV amplitude, 25 mV s⁻¹ sweep rate]. As (III) concentrations: (a) 1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, (b) 2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, (c) 3 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, (d) 4 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, (e) 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

The analytical curve shown in Figure 1 was used for analyzing the data from 12 samples of grape juice of different brands assessed by differential pulse cathodic stripping voltammetry. The concentration ranges for As (III) and As (V) were of 51-71 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and 34-60 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively, in an average of seven determinations. All of the samples analyzed in the present study showed

Table 1. Intra-day and inter-day precision and recovery for As (III) and As (V) in grape juice samples

Inorganic arsenic	Concentration ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) ^a	Intra day			Inter day		
		Found ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Precision %RSD	Recovery (%)	Found ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Precision %RSD	Recovery (%)
As (III)	30	29.4	1.6	98.0	29.8	1.6	99.3
	60	59.6	1.2	99.3	60.3	1.3	100.5
	90	88.9	1.3	98.8	89.2	1.1	99.1
As (V)	30	28.3	1.7	94.3	28.8	1.6	96.0
	60	58.4	1.4	97.3	59.1	1.3	98.5
	90	90.2	1.6	100.2	90.1	1.4	100.1

^anumber of replications ($n = 7$).

to be satisfactorily safe, being in compliance with the Brazilian legislation – Instructive Norm no. 18, July 28, 2004 – Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock and Supply. This norm establishes a limit of 200 mg.L⁻¹ of total inorganic arsenic as the maximum concentration allowed in beverages. The samples containing arsenic concentration lower than the detection limit were those based on soybean, and it could be linked to the grape juice clarification step before being bottled, because this step is not carried out for this product fabrication (Table 2).

Table 2. Concentrations (µg.L⁻¹) and recovery (%) found for As (III) e As (V) in grape juice samples by DPCSV

Samples	As (III) ^b		As (V) ^b	
	µg.L ⁻¹ (S.D.)	Recovery (%)	µg.L ⁻¹ (S.D.)	Recovery (%)
S-1	71.0 (1.8)	97.8	49.9 (2.2)	95.4
S-2	66.8 (2.3)	96.5	34.4 (2.6)	96.8
S-3	61.2 (1.9)	98.8	45.9 (2.2)	95.8
S-4	< 0.08	–	< 0.08	–
S-5	67.5 (1.4)	97.2	58.7 (1.8)	96.3
S-6	69.3 (2.0)	97.6	47.5 (2.3)	96.6
S-7	63.9 (2.1)	98.9	54.2 (1.4)	97.2
S-8	57.2 (1.2)	99.4	36.7 (1.7)	97.7
S-9	50.9 (1.9)	98.6	42.9 (2.2)	95.9
S-10	66.3 (1.7)	98.2	60.1 (1.9)	94.2
S-11	69.7 (2.3)	99.0	46.6 (1.9)	96.6
S-12	< 0.08	–	< 0.08	–

^bnumber of determinations (n = 7).

CONCLUSION

The voltammetric methodology showed a favorable outcome for identifying and quantifying the inorganic arsenics contents, As (III) and As (V), in grape juices. Grape juice samples were analyzed by means of differential pulse cathodic stripping voltammetry, and the As (III) and As (V) concentrations ranged 51-71 µg.L⁻¹ and 34-60 µg.L⁻¹, respectively. These results were compared with those from hydride generation atomic absorption spectrometry analyses. All of the samples analyzed in the present study showed to be safe, being in compliance with the Brazilian legislation – Instructive Norm no. 18, July 28, 2004 – the Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock and Supply. This legislation establishes the maximum concentration of 200 mg.L⁻¹ of total inorganic arsenic, as being the limit permitted for beverages.

The significant advantage of using this methodology for determining the arsenic contents is the fact of performing the effective and sequential analyses of both arsenic species.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported in part by grants from the National Institute of Quality Control in Health/Fiocruz and Faperj.

REFERENCES

1. He Y, Zheng Y, Ramnaraine MM, Lock DC. Differential pulse cathodic stripping voltammetric speciation of trace level inorganic arsenic compounds in natural water samples. *Analytica Chimica Acta*. 2004;511:55-61.
2. Herce-Pagliai C, Moreno I, Gonzalez G, Repetto M, Camean AM. Determination of arsenic, inorganic and organic arsenic species wine. *Food additives and contaminants*. 2002;19:542-6.
3. Hsueh YM, Cheng GS, Wu MM, Yu HS, Kuo TL, Chen CJ. Multiple risk-factors associated with arsenic-induced skin-cancer: Effects of chronic liver-disease and malnutrition status. *British Journal of Cancer*. 1995;71:109-14.
4. Engel RR, Hopenhaynrich C, Receveur O. 1994. Vascular effects of chronic arsenic exposure: A review. *Epidemiologic Reviews*. 1994;16:184-209.
5. Carvalho LM, Nascimento PC, Bohrer D, Pilau EJ, Stefanello R. Voltammetric behavior of arsenic (III) in the presence of sodium diethyl dithiocarbamate and its determination in water and highly saline samples by adsorptive stripping voltammetric. *Electroanalysis*. 2006;18:1081-9.
6. Uneyama C, Toda M, Yamamoto M, Morikawa K. Arsenic in various foods: Cumulative Data. *Food Additives and Contaminants*. 2007;24:447-534.
7. Catarino S, Madeira M, Monteiro F, Rocha F, Curvelo-Garcia AS, Sousa B. Effect of bentonite characteristics on the elemental composition of wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008;56:158-65.
8. Weiss KC, Bisson LF. Effect of bentonite treatment of grape juice on yeast fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*. 2002;53:28-36.
9. Cervera ML, Lopez JC, Montoro R. Determination of arsenic in orange juice by dry ashing hydride generation atomic absorption spectrometry. *Microchemical Journal*. 1994;49:20-6.
10. Ferreira MA, Barros AA. Determination of As (III) and Arsenic (V) in natural waters by cathodic stripping voltammetry at a hanging mercury drop electrode. *Analytica Chimica Acta*. 2002;459:151-9.
11. EURACHEM. The fitness for purpose of analytical methods, a laboratory guide to method validation and related topics. Teddington: LGC; 1998.
12. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Validation of analytical procedures: methodology. Geneva: ICH/IFPMA; 1996.
13. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Teconologia (INMETRO). Orientação sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos: DOQ – CGCRE – 008. Rio de Janeiro; 2007.
14. Miller JC, Miller JN. Statistics for analytical chemistry. New York: Ellis Harwood; 1993.

Efeito da adição de erva-mate nas características sensoriais e físico-químicas de barras de cereais

Effect of yerba mate on the sensory and physicochemical characteristics of cereal bars

RIALA6/1440

Lucinéia CHIESA¹, Cláudia SCHLABITZ², Cláucia Fernanda Volken de SOUZA^{2*}

*Endereço para correspondência: ²Curso de Química Industrial, Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas. Centro Universitário Univates, Rua Avelino Tallini, 171, Bairro Universitário. Lajeado, RS, Brasil. CEP 95900-000. E-mail: claucia@univates.br.

¹Curso de Nutrição, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Centro Universitário Univates, Lajeado, RS, Brasil.

Recebido: 21.06.2011 - Aceito para publicação: 13.02.2012

RESUMO

No presente trabalho, foi procedida a produção de barras de cereais adicionadas de erva-mate, e as características físico-químicas e sensoriais foram avaliadas a fim de viabilizar uma nova alternativa de aproveitamento tecnológico dessa matéria-prima. Foram elaboradas quatro formulações de barras de cereais, adicionando-se 0%, 5%, 10% e 20% de erva-mate em pó do tipo chimarrão, as quais foram submetidas às análises físico-químicas para efetuar a determinação dos teores de umidade, cinzas, proteínas, lipídeos e carboidratos, e das características sensoriais de aceitação dos atributos referentes a aparência, sabor, textura, impressão global e intenção de compra. As barras de cereais adicionadas de 5% e 10% de erva-mate apresentaram índices de aceitabilidade de aproximadamente 70%. A formulação com 10% de erva-mate resultou em 9,13% de proteínas e 8,77% de lipídeos, cujos valores foram superiores e inferiores, respectivamente, aos dos detectados nas barras de cereais comercializadas na região. Esses produtos mais saudáveis, de maior valor nutricional e de menor teor de gordura atendem às exigências do atual mercado consumidor. Os resultados obtidos neste estudo comprovam a viabilidade de uso da erva-mate no desenvolvimento de novos produtos alimentícios.

Palavras-chave. barras de cereais, erva-mate, características físico-químicas, análise sensorial.

ABSTRACT

In the present study yerba mate-added cereal bars were produced, and their physicochemical and sensory characteristics were evaluated in order to assess the feasibility of this raw material as a new alternative for technological use. Four formulations of cereal bars were prepared, adding 0%, 5%, 10% and 20% of "chimarrão" yerba mate, which were analyzed on physicochemical aspects by determining moisture, ash, proteins, lipids and carbohydrates; and the characteristics of sensory acceptance of appearance, flavor, texture, overall impression attributes, and the purchase intention were investigated. The cereal bars containing 5% and 10% of yerba mate showed acceptability of approximately 70%. The formulation with 10% of yerba mate resulted in 9.13% of protein and 8.77% of lipids, and these values were higher and lower, respectively, than those found in the cereal bars marketed in the region. These healthy products containing higher nutritional value and lower fat contents comply with the requirements of the current consumer market. The formulations prepared and analyzed in this study show the feasibility of the use of yerba mate in the development of new food products.

Keywords. cereal bars, yerba mate, physicochemical characteristics, sensory analysis.

INTRODUÇÃO

Os consumidores estão atentos às características dos alimentos, preferindo produtos de fácil consumo que, além de suprir suas necessidades nutricionais, contribuam para melhor qualidade de vida e bem-estar físico. Assim, as barras de cereais, associadas a produtos saudáveis, conquistaram seu espaço no mercado, exigindo das indústrias a busca por novos ingredientes e formulações a fim de diversificar a variedade de sabores e desenvolver produtos com características físico-químicas e nutricionais capazes de propiciar benefícios à saúde¹.

As barras de cereais representam uma alternativa de complemento alimentar para o organismo humano, sendo fonte de fibras, proteínas, carboidratos, vitaminas, sais minerais, aminoácidos, ácidos graxos essenciais e antioxidantes, caracterizando-se como uma forma prática e conveniente de ingerir nutrientes. Normalmente são adicionadas dos seguintes ingredientes: aveia, flocos de arroz e de milho, granola, frutas desidratadas, sementes comestíveis, mel, xarope de glicose e gordura ou óleo vegetal¹⁻⁷.

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St Hill.) é uma planta originária da América do Sul, consumida habitualmente na Argentina, no Paraguai, no Uruguai e no Brasil. Representa uma das espécies arbóreas naturais de maior importância socioeconômica e cultural para o sul do Brasil, abrangendo principalmente Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul⁸. É um produto natural, composto de diversas substâncias orgânicas bioativas oriundas de extratos aquosos ou orgânicos da erva-mate, com propriedades antioxidantes, estimulantes, diuréticas, anti-inflamatórias, antirreumáticas, entre outras⁹⁻¹¹. Estudos mostram que a erva-mate beneficiada em pó é uma importante fonte de fibra alimentar, minerais essenciais e vitaminas¹²⁻¹⁶. Essas características fisiológicas, medicinais e nutritivas conferem à erva-mate potencial de aproveitamento na elaboração de diferentes alimentos¹⁷.

Apesar disso, atualmente, há poucos produtos com erva-mate disponíveis no mercado, e os mais conhecidos e tradicionais são destinados para o consumo na forma de chimarrão, chá mate e tererê. Portanto, a busca de alternativas de uso e aplicação industrial dessa matéria-prima, por meio do desenvolvimento de novos produtos alimentícios, visa à valorização dessa cultura e à ampliação de seu mercado pela diversificação dos produtos oferecidos¹³. Poucos trabalhos descritos na literatura apresentam a elaboração e a avaliação da qualidade de

produtos derivados da erva-mate. Berté et al.¹⁷, Mello et al.¹⁸ e Campos et al.¹⁹ desenvolveram, respectivamente, gelatina funcional, bebida gaseificada e salame utilizando extrato de erva-mate como ingrediente alternativo.

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e avaliar as características físico-químicas e sensoriais de barras de cereais adicionadas de erva-mate, a fim de viabilizar uma nova alternativa de aproveitamento tecnológico dessa matéria-prima.

MATERIAL E MÉTODOS

Formulação e elaboração das barras de cereais

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St Hill.) em pó, tipo chimarrão, foi fornecida pela Empresa Ervateira Valério Ltda., localizada na cidade de Arvorezinha-RS, Brasil. Os demais ingredientes para a elaboração das barras de cereais foram adquiridos no comércio local da cidade de Lajeado-RS, Brasil.

A elaboração das barras de cereais foi realizada no Laboratório de Técnica Dietética, do Curso de Nutrição da Univas. Após uma sequência de testes preliminares, visando a encontrar a proporção mais adequada dos ingredientes para se obter uma barra com boa consistência, chegou-se a uma formulação de barra de cereais tradicional sem adição de erva-mate, denominada Formulação A, utilizando como ingredientes castanha de caju granulada, flocos de arroz, coco ralado, aveia em flocos, mel, água, óleo de soja, uva-passa, suco de limão e glicose de milho (Tabela 1). A partir da Formulação A, foram elaboradas três formulações (B, C e D) com adição de erva-mate em pó tipo chimarrão nas concentrações de 5%, 10% e 20% (m/m), respectivamente. Em cada uma dessas três preparações, retirou-se parte dos ingredientes: aveia em flocos, coco ralado e água, mantendo a quantidade total de 200 g.

Tabela 1. Formulações das barras de cereais elaboradas

Ingredientes (g)	Formulação			
	A	B	C	D
Aveia em flocos	32	27	22	10
Castanha de caju granulada	20	20	20	20
Coco ralado	20	15	10	5
Flocos de arroz	18	18	18	18
Uva-passa	14	14	14	14
Erva-mate	-	10	20	40
Glicose de milho	40	40	40	40
Mel	28	28	28	28
Água	18	18	18	15
Óleo de soja	6	6	6	6
Suco de limão	4	4	4	4
Total	200	200	200	200

Para a elaboração das barras de cereais, primeiramente, todos os ingredientes foram pesados em balança eletrônica digital (modelo US 20/2, marca Urano). Após a pesagem, os ingredientes secos (aveia em flocos, castanha de caju granulada, coco ralado, flocos de arroz e uva-passa) foram misturados manualmente. A seguir, os ingredientes água, glicose de milho, mel, óleo de soja e suco de limão foram submetidos a aquecimento por 5 minutos a 95 °C, em fogão a gás (modelo industrial, marca Prodinox), para preparação da calda. Em seguida, misturaram-se os ingredientes secos na calda. Logo após, colocou-se a mistura em uma forma de aço inoxidável e modelou-se, em torno de vinte vezes, com auxílio de um rolo de silicone, até obter uma massa lisa com aproximadamente 1 cm de espessura. As preparações foram mantidas à temperatura ambiente para resfriar e, em seguida, cortadas em pedaços de 10 cm × 3 cm, embaladas em filme de polietileno, e armazenadas à temperatura ambiente até o momento das análises físico-químicas e sensoriais, não ultrapassando 48 horas.

Análises físico-químicas das barras de cereais

As características físico-químicas das barras de cereais foram determinadas pelos seguintes procedimentos: umidade em estufa a 105 °C até peso constante, cinzas por incineração a 550 °C, lipídeos pelo método de extração direta por solvente (método de Soxhlet), e proteína pela determinação do teor de nitrogênio total pelo Método de Kjeldahl e conversão em proteína bruta pelo fator 6,25, conforme metodologias do Instituto Adolfo Lutz²⁰. O teor de carboidratos totais foi determinado pelo cálculo da diferença entre 100 g de amostra e a somatória dos valores encontrados para os componentes citados. O valor energético em 100 g de barra de cereais foi calculado pela soma dos resultados da multiplicação das porcentagens de proteínas, carboidratos e lipídeos pelos seus respectivos fatores de conversão (4, 4 e 9 kcal/g)²¹. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Análise sensorial das barras de cereais

A avaliação sensorial dos produtos foi realizada por 50 provadores não treinados, recrutados entre os estudantes da Univates, sendo 2 homens e 48 mulheres, com idade entre 18 e 50 anos. A análise foi realizada em cabines individuais sob luz branca e à temperatura ambiente, com as amostras dispostas em pires brancos de porcelana e servidas em bandejas de aço inoxidável. As

amostras, em porções padronizadas (aproximadamente 4 g), foram codificadas com números aleatórios de 3 dígitos e apresentadas aos provadores de forma balanceada e aleatorizada. Junto com as amostras, foram entregues água mineral à temperatura ambiente para limpeza do palato e a ficha do teste contendo uma escala hedônica estruturada em nove pontos, variando de 1 “desgostei muitíssimo” a 9 “gostei muitíssimo”²². A análise sensorial, por meio do teste de aceitação, avaliou a preferência em relação aos atributos aparência, sabor, textura e impressão global do produto. Para avaliar a intenção de compra, utilizou-se a escala de cinco pontos, variando de 1 “certamente não compraria” a 5 “certamente compraria”. Para determinar a aceitabilidade dos produtos, foram calculados a frequência relativa das notas atribuídas pelos provadores na avaliação sensorial dos diferentes atributos e o Índice de Aceitabilidade (IA) das amostras de barras de cereais, conforme Dessimoni-Pinto et al.⁶ e Peuckert et al.⁷.

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Univates sob o registro número n. 149/10.

Análise estatística

Inicialmente, os resultados físico-químicos e sensoriais foram submetidos ao teste de Levene para cálculo da homogeneidade das variâncias entre os tratamentos.

Depois, para determinar a existência de diferença estatística entre as amostras, os resultados foram submetidos à análise de variância univariada e foi verificada a significância dos modelos pelo teste F. Na análise sensorial, o p-valor foi maior que 0,05 para os provadores em todos os atributos avaliados. Nos modelos significativos em relação às amostras, as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância. Os cálculos estatísticos foram efetuados utilizando o *software* Statistica® versão 7.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 2, estão apresentados os valores médios das análises físico-químicas das barras de cereais elaboradas sem e com a adição de erva-mate.

Os valores de umidade nas barras variaram entre 4,34% e 6,01%. A substituição parcial da aveia em flocos e do coco ralado pela erva-mate resultou no aumento do conteúdo de umidade das barras de cereais formuladas.

Tabela 2. Características físico-químicas das barras de cereais elaboradas sem e com a adição de erva-mate

Análise	Formulação				p (Levene)
	A	B	C	D	
Umidade (%)	4,34 ± 0,20 ^c	5,37 ± 0,11 ^b	5,56 ± 0,05 ^{ab}	6,01 ± 0,25 ^a	0,405
Cinzas (%)	1,19 ± 0,04 ^c	1,36 ± 0,11 ^c	1,63 ± 0,04 ^b	1,94 ± 0,05 ^a	0,731
Proteínas (%)	9,66 ± 0,10 ^a	8,19 ± 0,21 ^c	9,13 ± 0,12 ^b	8,14 ± 0,27 ^c	0,642
Lipídeos (%)	17,95 ± 0,16 ^a	12,77 ± 0,21 ^b	8,77 ± 0,38 ^c	8,14 ± 0,07 ^c	0,367
Carboidratos (%)	66,86 ± 0,31 ^d	72,31 ± 0,20 ^c	74,91 ± 0,41 ^b	75,77 ± 0,23 ^a	0,553
Valor calórico (kcal/100 g)	467,63 ± 1,49 ^a	436,97 ± 1,04 ^b	415,09 ± 2,21 ^c	408,86 ± 0,85 ^d	0,681

Formulação A = 0% de erva-mate; Formulação B = 5% de erva-mate; Formulação C = 10% de erva-mate; Formulação D = 20% de erva-mate
Resultados expressos em base úmida

Médias com letras diferentes na mesma linha apresentam diferença significativa entre si ($p \leq 0,05$), conforme resultado do teste de Tukey.

Os resultados de umidade obtidos são inferiores aos valores entre 7,6% e 13,9% encontrados por Brito et al.² para uma formulação de barra de cereais caseira, por Gutkoski et al.⁴ para barras de cereais à base de aveia com alto teor de fibra alimentar, e por Baú et al.¹ para uma formulação de barra de cereais com elevado teor proteico. Provavelmente, essas diferenças nos teores de umidade são consequência dos diferentes ingredientes usados nas respectivas formulações. O teor de umidade influencia na estabilidade e nas características sensoriais das barras de cereais. Altas concentrações de umidade favorecem a multiplicação de micro-organismos e as reações de deterioração, além de reduzir a crocância do produto²³.

Analisando os resultados obtidos nas determinações de cinzas das quatro formulações, observaram-se valores entre 1,19% a 1,94%, e com o aumento da quantidade de erva-mate adicionada nas barras formuladas ocorreu elevação no teor de cinzas. Segundo Gutkoski et al.²⁴, na erva-mate, os teores de resíduo mineral fixo (cinzas) variam entre 5,49% e 5,72%, e isso está relacionado com a quantidade de minerais presentes no solo de cultivo e com as operações de colheita, transporte e recepção da matéria-prima na indústria.

Em relação aos teores de proteínas, observou-se variação entre 8,14% e 9,66%. Esses resultados são superiores aos das barras de cereais convencionais de origem industrial, de diferentes marcas encontradas no mercado da região (valores de 3,6% a 7,5% de proteínas, conforme composição nutricional apresentada no rótulo do produto). O conteúdo de proteínas das amostras do presente trabalho são inferiores aos observados por Gutkoski et al.⁴, que estudaram o efeito da concentração de fibra alimentar e do teor de açúcar na calda de barras de cereais elaboradas à base de aveia e observaram valores entre 9,79% e 12,37% de proteínas.

O conteúdo de lipídeos das barras formuladas variou de 8,14% a 17,95%, valores similares aos das barras de cereais convencionais de origem industrial de diferentes marcas comercializadas na região (valores de 6,0% a 18,8% de lipídeos, conforme composição nutricional apresentada no rótulo do produto). Com o aumento da concentração de erva-mate nas barras formuladas, ocorreu redução no teor de lipídeos, e a amostra sem erva-mate (Formulação A) apresentou conteúdo de lipídeos aproximadamente 120% superior à formulação com 20% de erva-mate (Formulação D). As concentrações de lipídeos das formulações C (com 10% de erva-mate) e D não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$). Com a substituição parcial da aveia em flocos e do coco ralado da formulação tradicional sem erva-mate (Formulação A) por 10% de erva-mate (Formulação C), foi possível reduzir em aproximadamente 51% o teor de lipídeos das barras de cereais formuladas, o que atende a uma das exigências do atual mercado consumidor – produtos mais saudáveis, com menor teor de gordura.

O valor energético das barras de cereais também diminuiu com a elevação do teor de erva-mate nas formulações. Comportamento semelhante foi verificado por Lima et al.²⁵, que empregaram polpa de baru na elaboração de barras de cereais e observaram menor valor calórico para as amostras com 5% e 10% de polpa em relação à formulação sem polpa. Já Dessimoni-Pinto et al.⁶, ao adicionarem 15% de amêndoa de macaúba na formulação de barra de cereais, verificaram um aumento do valor calórico em comparação com a formulação de controle (sem amêndoa de macaúba).

A Tabela 3 apresenta os resultados da avaliação sensorial das amostras de barras de cereais sem e com adição de 5%, 10% e 20% de erva-mate.

A amostra elaborada sem erva-mate (Formulação A) apresentou médias superiores em todos os atributos sensoriais avaliados. Segundo Mello et al.¹⁸,

Tabela 3. Médias das notas atribuídas pelos provadores para as barras de cereais elaboradas sem e com a adição de erva-mate

Atributo	Formulação				p (Levene)
	A	B	C	D	
Aparência	7,42 ± 0,83 ^a	6,14 ± 0,72 ^b	6,04 ± 0,87 ^b	4,38 ± 0,34 ^c	0,602
Sabor	7,14 ± 0,91 ^a	6,00 ± 0,82 ^b	5,64 ± 0,65 ^b	4,02 ± 0,51 ^c	0,538
Textura	7,08 ± 0,98 ^a	6,82 ± 0,63 ^a	6,44 ± 0,58 ^a	4,94 ± 0,45 ^b	0,481
Impressão Global	7,25 ± 1,10 ^a	6,44 ± 1,02 ^{ab}	6,22 ± 0,97 ^b	4,74 ± 0,94 ^c	0,426

Formulação A = 0% de erva-mate; Formulação B = 5% de erva-mate; Formulação C = 10% de erva-mate; Formulação D = 20% de erva-mate. Médias com letras diferentes na mesma linha apresentam diferença significativa entre si ($p \leq 0,05$), conforme resultado do teste de Tukey

os consumidores apresentam tendência para melhor aceitação de produtos preparados a partir de ingredientes tradicionalmente utilizados e comuns aos seus hábitos alimentares. Porém a Formulação B obteve na avaliação da impressão global o valor médio de 6,44, demonstrando que a barra de cereais adicionada de 5% de erva-mate apresentou boa aceitação entre os provadores.

Mello et al.¹⁸ elaboraram e avaliaram a qualidade sensorial de bebida gaseificada adicionada de 35%, 42,5%, 50% e 57,5% (v/v) de extrato de erva-mate. Os autores também observaram que a formulação de bebida gaseificada adicionada da menor quantidade de extrato de erva-mate (35 ml) foi a preferida pelos julgadores, considerada a de sabor mais suave e agradável. Já Campos et al.¹⁹ elaboraram salame sem e com adição de 0,5% (v/m) de extrato etanólico de erva-mate e não detectaram diferença estatística ($p > 0,05$) entre as amostras na avaliação sensorial da aceitação dos atributos cor, odor, aroma e textura e na impressão global.

A partir da variação das notas médias entre as Formulações A e D (Tabela 3), verificou-se que, entre os atributos sensoriais avaliados no presente trabalho, o sabor foi o mais influenciado pela adição de erva-mate. Segundo Mello et al.¹⁸, uma das maiores dificuldades no uso da erva-mate verde na formulação de produtos alimentícios é o sabor amargo característico dessa matéria-prima e que, conseqüentemente, esta confere aos produtos elaborados.

Freitas & Moretti³ desenvolveram três formulações distintas de barras de cereais funcional sabor banana de alto teor proteico e vitamínico, à base de proteína texturizada de soja, gérmen de trigo e aveia e enriquecidas de ácido ascórbico e acetato de α -tocoferol, as quais foram submetidas a avaliação sensorial por meio do teste de preferência empregando a escala hedônica de nove pontos. As médias das notas atribuídas pelos provadores na avaliação da impressão global das formulações foram 4,66, 5,70 e 6,14, que são inferiores às obtidas pelas formulações do presente

trabalho com 5% e 10% de erva-mate, 6,44 e 6,22, respectivamente.

Em relação à distribuição de frequência das características sensoriais avaliadas nas quatro formulações de barras de cereais, a Formulação B apresentou 70%, 62%, 80% e 74% de menções positivas para os atributos aparência, sabor, textura e impressão global, respectivamente, e a Formulação C recebeu 72%, 58%, 78% e 64% de menções positivas para os mesmos atributos. Esses resultados indicam semelhança na aceitação da aparência, sabor, textura e impressão global das formulações de barras de cereais com 5% e 10% de erva-mate. Em relação à avaliação do sabor da Formulação B, 32% dos provadores referiram-se a “gostei muito”, resultado superior ao encontrado por Peuckert et al.⁷ para barras de cereais adicionadas de proteína texturizada de soja e camu-camu, no qual 28,33% das menções dos provadores corresponderam à escala “gostei muito”.

Os resultados do IA (Índice de Aceitabilidade) calculado a partir da avaliação sensorial da impressão global das formulações de barras de cereais elaboradas com 0%, 5%, 10% e 20% de erva-mate foram de 80,7%, 71,6%, 69,1% e 52,7%, respectivamente. Segundo Teixeira et al.²², para que o produto seja considerado aceito por suas propriedades sensoriais, é importante que obtenha um IA de no mínimo 70%. Assim, a avaliação sensorial realizada nesse estudo demonstrou que as barras de cereais adicionadas de 5% e 10% de erva-mate em pó tipo chimarrão, Formulações B e C, respectivamente, apresentam potencial para comercialização.

Em relação à intenção de compra das quatro distintas formulações de barras de cereais elaboradas com 0%, 5%, 10% e 20% de erva-mate, verificou-se uma diminuição da preferência de compra do produto à medida que aumentava a quantidade de erva-mate incorporada às barras de cereais. A Formulação B apresentou 62% de menções positivas referidas pelos provadores; e a Formulação D, apenas 2% de intenção de compra. Resultado semelhante foi encontrado

por Torres²⁶ no desenvolvimento de barras de cereais formuladas com ingredientes regionais, pois, com o aumento do teor de jenipapo, diminuiu a perspectiva de compra do produto.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse estudo comprovam a viabilidade de uso da erva-mate no desenvolvimento de novos produtos alimentícios. As barras de cereais adicionadas de 5% e 10% de erva-mate em pó tipo chimarrão apresentaram IA de aproximadamente 70%, indicando que esse produto representa uma nova alternativa de uso da erva-mate no mercado de alimentos. A formulação com 10% de erva-mate apresentou 9,13% de proteínas e 8,77% de lipídeos, valores superior e inferior, respectivamente, às barras de cereais comercializadas na região, resultados que atendem às exigências do atual mercado consumidor – produtos mais saudáveis devido ao maior valor nutricional, com maior teor proteico e menor teor de gordura.

REFERÊNCIAS

1. Baú TR, Cunha MAA, Cella SM, Oliveira ALJ, Andrade JT. Barra alimentícia com elevado valor proteico: formulação, caracterização e avaliação sensorial. *Rev Bras Tecnol Agroind*. 2010;4(1):42-51.
2. Brito IP, Campos JM, Souza TFL, Wakiyama C, Azeredo GA. Elaboração e avaliação global de barra de cereais caseira. *Bol CEPPA*. 2004;22(1):35-50.
3. Freitas DGC, Moretti RH. Caracterização e avaliação sensorial de barra de cereais funcional de alto teor proteico e vitamínico. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2006;26(2):318-24.
4. Gutkoski LC, Bonamigo JMA, Teixeira DMF, Pedó I. Desenvolvimento de barras de cereais à base de aveia com alto teor de fibra alimentar. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2007;27(2):355-63.
5. Guimarães MM, Silva MS. Qualidade nutricional e aceitabilidade de barras de cereais adicionadas de frutos de murici-passa. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2009;68(3):426-33.
6. Dessimoni-Pinto NAV, Silva VM, Batista AG, Vieira G, Souza CR, Dumont PV, et al. Características físico-químicas da amêndoa de macaúba e seu aproveitamento na elaboração de barras de cereais. *Aliment Nutr*. 2010;21(1):77-84.
7. Peuckert YP, Viera VB, Hecktheuer LHR, Marques CT, Rosa CS. Caracterização e aceitabilidade de barras de cereais adicionadas de proteína texturizada de soja e camu-camu (*Myrciaria dubia*). *Aliment Nutr*. 2010;21(1):147-52.
8. Santos KA, Freitas RJSE, Santos MA, Rapacci M, Winter CMG. Polifenóis em chá de erva-mate. *Nutr Brasil*. 2004;3(1):47-50.
9. Efing LC, Caliaro TK, Nakashima T, Freitas RJS. Caracterização química e capacidade antioxidante da erva-mate (*Ilex paraguariensis* st. Hil.). *Bol CEPPA*. 2009;27(2):241-6.
10. Esmelindro AA, Santos JG, Mossi A, Jacques RA, Dariva C. Influence of agronomic variables on the composition of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*) extracts obtained from CO₂ extraction at 30 °C and 175 bar. *J Agric Food Chem*. 2004;52(7):1990-5.
11. Isolabella S, Cogoi L, López P, Anesini C, Ferraro G, Filip R. Study of the bioactive compounds variation during yerba mate (*Ilex paraguariensis*) processing. *Food Chem*. 2010;122:695-9.
12. Santos KA. Estabilidade da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) em embalagens plásticas. [dissertação de mestrado em tecnologia de alimentos]. Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná; 2004.
13. Barboza LMV. Desenvolvimento de bebida à base de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire) adicionada de fibra alimentar. [tese de doutorado em tecnologia de alimentos]. Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná; 2006.
14. Berté KAS. Tecnologia da erva-mate solúvel. [tese de doutorado em tecnologia de alimentos]. Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná; 2011.
15. Heinrichs R, Malavolta E. Composição mineral do produto comercial da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). *Ciênc Rural*. 2001;31(5):781-5.
16. Schmalko ME, Ramallo LA, Smorzewski M, Valdez EC, Paredes AM. Contenido de nutrientes em la yerba mate. Congresso Sul-Americano da Erva-Mate, 2000, Encantado. Anais do Congresso Sul-Americano da Erva-Mate. p. 74-5.
17. Berté KAS, Izidoro DR, Dutra FLG, Hoffmann-Ribani R. Desenvolvimento de gelatina funcional de erva-mate. *Ciênc Rural*. 2011;41(2):354-60.
18. Mello ACB, Freitas RJS, Waszczynskij N, Koehler HS, Wille GMFC, Berté KAS. Bebida gaseificada de erva-mate. *Bol CEPPA*. 2009;27(1):19-26.
19. Campos RML, Hierro E, Ordóñez JA, Bertol TM, Terra NN, Hoz L. Fatty acid and volatile compounds from salami manufactured with yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extract and pork back fat and meat from pigs fed on diets with partial replacement of maize with rice bran. *Food Chem*. 2007;103:1159-67.
20. Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4. ed. Brasília: Anvisa; 2005.
21. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC n. 360, de 23 de dezembro de 2003. Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados. Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil. Brasília, DF, 26 dez 2003.
22. Teixeira E, Meinert EM, Barbeta PA. Análise sensorial de alimentos. Florianópolis (SC): Editora da UFSC; 1987.
23. Damodaran S, Parkin KL, Fennema OR. Química de alimentos de Fennema. 4. ed. Porto Alegre (RS): Editora ArtMed; 2010.
24. Gutkoski LC, Schulz JG, Sampaio MB, Silva DR. Avaliação de parâmetros físicos e químicos de marcas de erva-mate processadas em diferentes épocas. *Bol CEPPA*. 2001;19(1):95-104.
25. Lima JCR, Freitas JB, Czedler LP, Femande DC, Naves MMV. Qualidade microbiológica, aceitabilidade e valor nutricional de barras de cereais formuladas com polpa e amêndoa de baru. *Bol CEPPA*. 2010;28(2):331-43.
26. Torres ER. Desenvolvimento de barra de cereais formuladas com ingredientes regionais. [dissertação de mestrado em engenharia de processos]. Aracaju (SE): Universidade Tiradentes; 2009.

Fécula de mandioca e farinha de albedo de laranja na formulação de bolos de chocolate

Cassava starch and orange albedo flour in chocolate cakes formulation

RIALA6/1441

Izabel Cristina Veras SILVA^{1*}, Aline Alves Oliveira SANTOS^{1*}, Aline Rezende ALVES², Mayra Crystiane de Aragão BATISTA², Paulo Sergio MARCELLINI³

*Endereço para correspondência: ¹Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Sergipe, Cidade Universitária Prof. José Aloísio de Campos, São Cristóvão, Sergipe, Brasil, CEP 49100-000. E-mail: izabelveras@hotmail.com, alinealveseng@hotmail.com.

²Núcleo de Nutrição, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE, Brasil.

³Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Recebido: 23.05.2011 - Aceito para publicação: 03.01.2012

RESUMO

A formulação do bolo de chocolate foi otimizada efetuando-se a substituição parcial da farinha de trigo por fécula de mandioca e farinha de albedo de laranja. A metodologia utilizada adotou um planejamento fatorial 2³, com variáveis independentes – fécula de mandioca (X), açúcar (Y) e farinha de albedo da laranja (Z) – e variáveis dependentes para os atributos da análise sensorial – aparência, aroma, sabor, textura e impressão global. Os bolos foram avaliados sensorialmente por 50 provadores, por meio de teste de aceitação, e intenção de compra, utilizando-se escala hedônica. Os parâmetros de otimização foram definidos por planejamento fatorial e análise gráfica de superfície de resposta. Os dados obtidos quanto a preferência, intenção de compra e resultados físico-químicos das formulações otimizadas, padrão e comercial foram submetidos a análise de variância, e as médias comparadas, pelo teste de Tukey (p < 0,05). Os bolos elaborados obtiveram avaliações médias para todos os atributos sensoriais, situadas na região positiva da escala. O produto otimizado foi constituído de 7,5% de farinha de albedo, 27,5% de fécula de mandioca e 110% de açúcar. A formulação otimizada de fécula de mandioca demonstrou características físico-químicas adequadas, com melhor e maior teor de fibras.

Palavras-chave. *Manihot esculenta*, farinhas mistas, produtos otimizados, testes sensoriais, alimentos enriquecidos de fibras.

ABSTRACT

This investigation was conducted to optimize the chocolate cake formulation by using cassava starch and flour of orange albedo as a partial substitute for wheat flour. The methodology followed the factorial design 2³, including independent variables – cassava starch (X), sugar (Y) and orange albedo flour (Z) – and dependent sensory attributes variables – appearance, aroma, flavor, texture, and overall impression. The cakes were evaluated by 50 tasters by means of acceptance testing and purchase intention by using hedonic scale. The optimization parameters were defined by factorial design and graphical analysis of surface response. Preference, purchase intention and physicochemical analyses data on optimized, standard and commercial formulations were evaluated by analysis of variance, and mean values were compared by Tukey test (p < 0.05). The formulated cakes obtained average grades for all sensory attributes, which were situated in the positive region of the scale. The optimized product showed 7.5% of orange albedo flour, 27.5% of cassava starch and 110% of sugar. The cassava starch formulation resulted in a product with adequate physical and chemical characteristics and the best and highest fiber contents.

Keywords. *Manihot esculenta*, flours mixed, optimized products, sensory tests, fiber-enriched foods.

INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma das mais tradicionais culturas brasileiras, cultivada em praticamente todo o território nacional. A produção brasileira de mandioca em 2011 foi de 25.329.667 milhões de toneladas¹, e, no estado de Sergipe, a produção estimada foi de 485.360 mil toneladas, no ano de 2010², sendo cultivada em praticamente todo o território sergipano e constituindo a principal fonte de renda e subsistência para inúmeras famílias.

As raízes de mandioca apresentam alto teor de amido e são largamente utilizadas na alimentação humana e animal, além de serem utilizadas como matéria-prima para diversos perfis de indústrias³. Segundo Fernandes⁴, o amido de mandioca, também conhecido como fécula, polvilho doce ou goma, é um pó fino, branco, inodoro, insípido e produz ligeira crepitação quando comprimido entre os dedos. Seu processo de produção consiste em lavagem, descascamento e desintegração das raízes, separação das fibras, purificação e separação do amido e secagem⁵.

A laranja pertence ao grupo denominado genericamente como *citrus*, tem forma arredondada, casca fibrosa e polpa suculenta. Morfologicamente, é composta de três diferentes partes: exocarpo (flavedo ou casca exterior), mesocarpo (albedo ou pele interior) e endocarpo (lôculo ou membrana carpelares)⁶.

O Brasil é um dos maiores produtores de laranja do mundo, com 19.831.787 milhões de toneladas no ano de 2011¹, e o estado de Sergipe teve um montante de 805.962 mil toneladas em 2010⁷. A maior parte dessa produção destina-se à indústria de suco⁸, cuja produção gera grandes quantidades de resíduos; cascas e albedos são alguns dos resíduos da laranja, ricos em carboidratos, fibras, pectina, proteína e matéria mineral⁶.

A divulgação da importância da fibra alimentar na nutrição, junto com a recomendação de aumentar seu consumo, tem levado a indústria alimentícia ao desenvolvimento de novos alimentos e preparados alimentares enriquecidos com fibras. A ingestão de fibra alimentar pode-se realizar por meio de alimentos naturais e processados de origem vegetal (frutas, cereais, verduras, legumes etc.) ou enriquecidos com fibras, tais como biscoitos, cereais matinais, pães, bolos e outros⁹.

Dentre as alternativas para melhorar a ingestão de fibra, há o enriquecimento de alimentos que já fazem parte da alimentação diária da população. Entre os produtos mais suplementados estão os de panificação, por meio da

substituição parcial da farinha de trigo por subprodutos ricos em fibras. Embora a farinha de trigo seja o principal componente das formulações dos produtos panificados, sua substituição parcial por outros tipos de farinha, pela elaboração de farinhas mistas, pode ser aplicada a esses produtos sem ocasionar prejuízo à qualidade dos mesmos.

A viabilidade técnica e econômica da utilização de farinhas mistas na produção de alimentos foi amplamente demonstrada e empregada na indústria¹⁰. Como exemplo, tem-se o bolo, um produto obtido de mistura, homogeneização e cozimento conveniente de massa preparada com farinhas, fermentadas ou não, e outras substâncias alimentícias, como leite, ovos e gorduras¹¹.

O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito da substituição parcial da farinha de trigo por fécula de mandioca e farinha de albedo de laranja na otimização de bolo de chocolate, visando a avaliar a aceitação e a viabilidade tecnológica deste produto.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção da farinha de albedo de laranja

A farinha de albedo de laranja foi elaborada por metodologia proposta por Santana⁶. Inicialmente as laranjas foram lavadas, sanitizadas e descascadas manualmente. Em seguida, a trituração úmida foi realizada em liquidificador, numa proporção volumétrica de 1:5 para albedo e água. O material foi acondicionado em sacos de algodão e lavado sob água corrente por um período de aproximadamente 30 minutos. A secagem foi realizada em estufa a 100 °C durante aproximadamente 5 horas. Posteriormente, triturou-se o albedo seco no liquidificador até a obtenção de uma farinha, sendo peneirada em tamis de 500 µm. O acondicionamento da farinha de albedo de laranja se deu em potes plásticos, armazenados em local seco e à temperatura ambiente.

Processamento dos bolos de chocolate

A formulação-padrão e o preparo dos bolos seguiram a metodologia descrita por Centenaro et al.¹², utilizando 280 g de farinha de trigo, 280 g de açúcar cristal, 100 g de gordura vegetal, 13 g de fermento químico, 6 g de sal, 24 g de leite em pó, 40 g de achocolatado em pó, 138 g de água, 150 g de clara de ovo e 6 gotas de essência de baunilha. Foram pesados em balança semianalítica, misturados em batedeira planetária na ordem da formulação e levados ao forno a 270 °C por 30 minutos.

Planejamento experimental

Na elaboração das formulações de bolos de chocolate, foi aplicado um delineamento experimental 2^3 (Tabela 1), com variáveis independentes – concentrações de fécula de mandioca (X), açúcar (Y) e farinha de albedo da laranja (Z) – e variáveis dependentes, isto é, os atributos sensoriais aparência, aroma, sabor, textura e impressão global.

Análise sensorial dos bolos

A avaliação sensorial dos bolos foi realizada em duas etapas. Inicialmente, as formulações elaboradas a partir do planejamento experimental foram analisadas por 50 provadores. Posteriormente, foi efetuado o teste afetivo (comparativo entre as formulações comercial, padrão e otimizada) com 100 provadores. Ambas as etapas avaliaram de forma monádica o quanto se gostava e desgostava do produto, por meio de um teste de aceitação baseado numa escala hedônica estruturada de 9 pontos (9 = gostei muitíssimo, 5 = não desgostei nem gostei, 1 = desgostei muitíssimo) e um teste de intenção de compras, utilizando escala hedônica estruturada de 7 pontos (7 = certamente compraria, 4 = talvez comprasse/ talvez não comprasse, 1 = certamente não compraria), conforme descrito por Stone e Sidel¹³.

Análises físico-químicas

A caracterização físico-química da farinha de albedo de laranja e dos bolos foi realizada segundo metodologia descrita por AOAC¹⁴ e Instituto Adolfo Lutz¹⁵. O teor de umidade, lipídeos, cinzas, proteínas foi calculado em triplicata. O teor de fibra bruta foi feito em duplicata. O teor de carboidratos foi determinado por diferença entre a massa seca total (100%) e a soma das porcentagens dos teores de umidade, cinzas, proteínas, lipídeos e fibra bruta. O valor calórico (kcal/100 g) foi calculado pela soma dos resultados da multiplicação dos fatores gerais de conversão para lipídeos e para carboidratos e proteínas, 9 kcal/g e 4 kcal/g, respectivamente.

Análise estatística

Os parâmetros de otimização foram definidos por meio de planejamento fatorial, com os cálculos de Anova e os coeficientes de determinação obtidos a partir do programa Statistic/Windows 8.0¹⁶. Os resultados físico-químicos e os testes afetivos foram submetidos a análise de variância (Anova), e as médias, comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando o programa Assistat/Windows 7.5¹⁷.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A farinha de albedo de laranja apresenta características favoráveis à elaboração de novos produtos: umidade (4,82%) favorece a boa conservação do produto, encontrando-se dentro do padrão estabelecido pela legislação brasileira¹⁸. Baixos teores de cinzas (4,29%), proteínas (3,15%) e lipídeos (0,39%) são satisfatórios, pois representam uma fração de alta concentração energética ou calórica. A fibra bruta apresentou teor (39,15%) seis vezes superior ao padrão de “rico em fibras” e doze vezes maior que o padrão para “fonte de fibras”, de acordo com o proposto pela legislação¹⁷. Os percentuais para carboidratos e valor calórico encontrados na farinha de albedo de laranja foram 48,20% e 208,91 kcal/100 g, respectivamente.

Aceitação sensorial dos bolos

As médias das notas da avaliação sensorial (Tabela 1) dos bolos ficaram entre 5,72 e 8,04, em todos os atributos sensoriais, correspondendo aos termos hedônicos “não gostei nem desgostei” e “gostei muito”, respectivamente, o que mostra que a substituição parcial da farinha de trigo por fécula de mandioca e farinha de albedo de laranja obteve boa aceitação sensorial.

Resultados similares de aceitação positiva foram observados em Borges²⁰, em que bolos elaborados com a substituição parcial de farinha de trigo por farinha de banana verde obtiveram médias entre 5,78 e 8,02. Moscato²¹, ao incorporar farinha de yacon e inulina em bolos, obteve notas que variaram de 6,1 a 7,5. Santos²², que incorporou farinha da casca do maracujá-amarelo em diferentes concentrações na produção de bolos de chocolate, obteve boa aceitação para todos os parâmetros sensoriais analisados.

Com relação à aparência, observa-se variação média entre 6,34 e 7,52, correspondendo aos termos hedônicos “gostei ligeiramente” e “gostei moderadamente”, respectivamente. Isso mostra que a substituição parcial da fécula de mandioca no bolo não causou influência negativa na aparência, já que este atributo sensorial representa o primeiro contato visual do consumidor com o produto.

No atributo aroma, observa-se que a maioria dos ensaios apresentou as maiores notas de avaliação sensorial para aroma, mostrando que a substituição parcial da fécula de mandioca não alterou negativamente o aroma do bolo.

Para o atributo sabor, as médias das notas sensoriais encontram-se entre 6,34 e 8,04, correspondendo aos termos hedônicos “gostei ligeiramente” e “gostei muito”, respectivamente. A variável açúcar pode ter influência positiva nesses resultados em comparação às demais variáveis, conforme comprovado pela Anova (Tabela 2).

Em contrapartida, a menor média é constatada no atributo textura (5,72), para a formulação com uma concentração de açúcar de 74,80% (ensaio 11). De maneira geral, ao elevar-se a concentração desse ingrediente ao máximo, há uma resposta positiva na média da textura e na aceitação dos provadores, o que pode ser explicado pelo fato de o açúcar contribuir não somente como adoçante, mas também por aumentar a coesividade e, quando associado a gordura, melhorar a maciez dos bolos²³.

O atributo impressão global apresenta médias das notas sensoriais entre 6,44 e 7,54, situando-se na escala hedônica entre “gostei ligeiramente” e “gostei moderadamente”, respectivamente (Tabela 1).

A Tabela 2 apresentam os valores de p para os atributos sensoriais.

Verificam-se diferenças significativas para a variável fécula de mandioca apenas no atributo aparência. Já a variável açúcar apresentou diferenças significativas em todos os atributos avaliados, indicando que este parâmetro influenciou todos os atributos, principalmente aroma, sabor e textura. Em relação às interações, destacou-se a interação fécula de mandioca e farinha de albedo de laranja ($p < 0,05$), indicando que esses dois parâmetros influenciaram aroma e textura.

A quantidade de farinha de albedo adicionada não interferiu na aceitação dos atributos sensoriais analisados, ou seja, a variável independente não foi significativa em nenhum dos atributos, havendo apenas significância ($p < 0,05$) na interação com a variável fécula de mandioca nos atributos aroma e textura.

Analisando o atributo impressão global, observa-se que apenas a variável açúcar linear foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$), o que pode estar associado à concentração variada de açúcar utilizada nas formulações. Para a escolha das concentrações, foi utilizado o atributo “impressão global”. Pela análise conjunta dos gráficos (Figura 1A e 1B), nota-se que, quanto maior a concentração de açúcar, maior é a aceitação. Embora valores próximos a 130% estejam na região otimizada, optou-se pela concentração de açúcar de 110% por motivos relacionados a saúde.

O teor de fécula de mandioca não é significativo para a impressão global. Optou-se, então, pelo teor de 27,5%, a fim de favorecer maior valorização da cultura regional e menor custo associado, garantindo ao produto viabilidade econômica. O teor de farinha de albedo de laranja também não é significativo, sendo escolhida uma concentração de 7,5%, com o propósito de tornar o bolo mais enriquecido como fonte de fibras de acordo com os parâmetros da legislação brasileira¹⁹.

Os valores dos coeficientes de determinação (R^2) (Tabela 2) de cada modelo preditivo podem ser considerados altos em se tratando de testes sensoriais com consumidores (provadores não treinados), os quais pela própria natureza mostram grande variabilidade nos resultados.

Para o teste comparativo, as formulações padrão, comercial e otimizada apresentaram médias sensoriais na região positiva da escala (Tabela 3) em todos os atributos sensoriais analisados, apresentando diferenças significativas ($p < 0,05$) apenas nos atributos aparência e aroma. Nos atributos sensoriais sabor, textura e impressão global, as formulações não diferem estatisticamente ($p < 0,05$). A formulação-padrão difere significativamente ($p < 0,05$) da formulação otimizada de fécula de mandioca, mesmo essa encontrando-se na região positiva da escala.

Análise de aceitação e intenção de compra

A Tabela 3 apresenta as médias das notas de aceitação e do teste de intenção de compra para os bolos comercial, padrão e otimizado.

De acordo com a Tabela 3, os atributos sabor, textura e impressão global não diferiram significativamente entre as amostras. Para os atributos aparência e aroma, a amostra comercial apresentou o maior valor, 7,15 e 6,90, respectivamente, e não diferiu estatisticamente das amostras padrão e otimizada.

Observou-se que as médias das notas de aceitação de intenção de compra (Tabela 3) encontraram-se na região intermediária da escala hedônica (“talvez comprasse, talvez não comprasse”). Por meio da análise de dados Anova, verificou-se que os consumidores preferiram a formulação-padrão, maior média ($p < 0,05$) entre todas. No entanto a formulação-padrão diferiu significativamente ($p < 0,05$) da formulação otimizada.

Estatisticamente ($p < 0,05$), as formulações apresentam similaridades, o que evidencia um potencial de comercialização do bolo com incorporação de fécula de mandioca e farinha de albedo de laranja.

Tabela 1. Valores médios da avaliação sensorial dos bolos com incorporação de diferentes teores de fécula de mandioca, açúcar e farinha de albedo de laranja

Ensaio	Variáveis Codificadas			Atributos				
	X	Y	Z	Aparência	Aroma	Sabor	Textura	I. Global
1	20%	85%	5%	6,90	6,56	6,94	6,18	6,92
2	20%	85%	7,50%	7,34	7,44	7,46	7,24	7,60
3	20%	115%	5%	7,10	7,36	7,32	7,36	7,42
4	20%	115%	7,50%	7,22	7,56	7,82	7,42	7,46
5	35%	85%	5%	6,90	7,34	7,30	7,40	7,28
6	35%	85%	7,50%	7,20	6,82	7,12	6,80	7,12
7	35%	115%	5%	7,32	7,40	7,62	7,26	7,46
8	35%	115%	7,50%	7,12	7,06	7,10	6,82	7,24
9	14,90%	100%	6,25%	7,42	7,32	7,64	7,48	7,46
10	40,10%	100%	6,25%	7,02	7,40	7,40	7,00	7,10
11	27,50%	74,80%	6,25%	6,34	6,20	6,34	5,72	6,44
12	27,50%	125,20%	6,25%	7,52	7,58	8,04	7,56	7,54
13	27,50%	100%	4,15%	7,06	7,18	7,42	7,20	7,16
14	27,50%	100%	8,35%	7,24	7,50	7,38	7,36	7,36
15	27,50%	100%	6,25%	6,68	7,10	7,20	6,88	7,16
16	27,50%	100%	6,25%	7,06	6,98	7,44	7,20	7,38
17	27,50%	100%	6,25%	6,60	7,06	7,28	7,16	7,18
18	27,50%	100%	6,25%	6,66	6,80	7,06	6,96	7,02

X: concentração de fécula de mandioca; Y: concentração de açúcar, em relação à concentração 100% de açúcar da formulação padrão; Z: concentração de farinha de albedo de laranja

Tabela 2. Valores de p para aceitação sensorial em relação aos atributos aparência, aroma, sabor, textura e impressão global

Variáveis	Valores de p para os atributos sensoriais				
	Aparência	Aroma	Sabor	Textura	Impressão global
FM(L)	0,4720	0,8451	0,4397	0,5589	0,3066
FM(Q)	0,0367	0,0729	0,2757	0,4709	0,3328
AR(L)	0,0306	0,0025	0,0042	0,0066	0,0122
AR(Q)	0,3314	0,5658	0,7120	0,1518	0,5209
FA(L)	0,3245	0,3828	0,8045	0,7771	0,4451
FA(Q)	0,0638	0,0870	0,5616	0,3880	0,3877
FM x AR	0,7207	0,3828	0,5768	0,1433	0,8731
FM x FA	0,5306	0,0149	0,0526	0,0453	0,1185
AR x FA	0,2764	0,4491	0,6469	0,3840	0,3081
R ²	0,81	0,69	0,75	0,83	0,81

FM = fécula de mandioca; AR = açúcar; FA = farinha de albedo de laranja; L = fator linear; Q = fator quadrático; R² = coeficiente de determinação

Resultados semelhantes foram reportados por Santos²², que incorporou farinha da casca do maracujá-amarelo em diferentes concentrações na produção de bolos de chocolate. O autor avaliou a aceitabilidade das formulações incorporadas, padrão e comercial, e obteve médias sensoriais na região positiva da escala para todos os parâmetros sensoriais analisados.

Tabela 3. Médias de aceitação e intenção de compra para bolos: comercial, padrão e otimizado

Atributos sensoriais	Formulações		
	Comercial	Padrão	Otimizado
Aparência	7,15a ³	6,83ab	6,86ab
Aroma	6,90a	6,52ab	6,55ab
Sabor	6,45a	6,84a	6,29a
Textura	6,99a	7,11a	6,62 ^a
Impressão global	6,83a	6,98a	6,55 ^a
Aceitação	4,85ab	5,20a	4,54b
% de aprovação ¹	53	65	48
% de rejeição ²	15	11	21

¹% de aprovação corresponde às notas > 4

²% de rejeição corresponde às notas < 4

³Médias seguidas pelas mesmas letras, na linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey (p < 0,05)

Tabela 4. Resultados das análises físico-químicas dos bolos comercial, padrão e otimizado

Parâmetros	Formulações		
	Comercial	Padrão	Otimizado
Umidade (%)	26,32a ²	21,49b	20,75b
Cinzas (%)	1,78a	1,72ab	1,60ab
Proteínas (%)	7,26a	5,09b	4,44bc
Lipídios (%)	10,77a	11,37a	11,04a
Fibra bruta (%)		1,03	2,81
Fibra alimentar ¹ (%)	2,19		
Carboidratos (%)	51,65	59,30	59,32
Valor energético (kcal/100 g)	332,57	359,96	354,50

¹Valor declarado no rótulo do bolo de chocolate

²Letras iguais na mesma linha indicam não haver diferença significativa entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Análises físico-químicas dos bolos

A Tabela 4 mostra os resultados das análises físico-químicas dos bolos.

Para umidade, há diferenças significativas (p < 0,05) entre a formulação comercial e as formulações

padrão e otimizada, que não diferiram significativamente entre si (Tabela 4). Em relação ao teor de cinzas, não houve diferença significativa (p < 0,05) entre as formulações.

O teor de proteínas da formulação otimizada não diferiu significativamente da formulação padrão (p < 0,05), porém ambos diferiram em relação ao comercial (Tabela 4). Para os teores de lipídeos, as médias das amostras não apresentaram diferenças significativas (p < 0,05). Do ponto de vista calórico, os valores encontrados são satisfatórios, uma vez que os lipídeos fornecem cerca de 9 kcal, enquanto proteínas e carboidratos fornecem em média 4 kcal.

O teor de fibra bruta do bolo otimizado foi maior (2,81%) que do bolo padrão (1,03%) e que o teor de fibra alimentar do bolo comercial.

Quanto ao teor de carboidratos, as amostras otimizada e padrão apresentaram resultados similares (59,32% e 59,30%, respectivamente) e maiores que a amostra comercial (51,65%).

Comparando-se as formulações analisadas, a formulação otimizada apresentou características físico-químicas adequadas e melhor aceitação junto aos consumidores, comparáveis com as formulações padrão e comercial de bolo de chocolate.

CONCLUSÃO

A formulação otimizada apresentou concentrações de 7,5% de farinha de albedo de laranja, 27,5% de fécula de mandioca e 110% de açúcar da formulação-padrão.

A substituição parcial da farinha de trigo por fécula de mandioca e farinha de albedo de laranja não modificou significativamente a formulação do bolo de chocolate de forma a alterar sua preferência ou aceitação, o que denota um potencial de comercialização de um produto nutricionalmente mais adequado, sem comprometimento das características sensoriais.

REFERÊNCIAS

1. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Levantamento Sistemático da Produção (LSPA). Produção Confronto das Safras de 2011 e 2012. Brasil, maio 2012. [acesso 2012 jun 6]. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201205_5.shtm].
2. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Produção Agrícola Municipal – Sergipe. Lavoura Temporária 2010. [acesso 2012 jun 6]. Disponível em: [http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=1612&z=p&o=22&i=P].

3. Lorenzi JO. Mandioca. 1. ed. CATI Boletim Técnico 245. Campinas (SP): Cati; 2003.
4. Fernandes RF. A internalização dos custos ambientais ao produto final: o caso de uma organização cooperativista no oeste do Paraná. [dissertação de mestrado]. Florianópolis (SC): Universidade Federal de Santa Catarina; 2004.
5. Arias LVB. Fécula de mandioca e polvilho azedo para fabricação de pão de queijo. *In*: Pizzinato A, Ormese R CSS. Seminário Pão de Queijo: ingredientes, formulação e processo. Anais. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos/Centro de Tecnologia de Cereais e Chocolate; 2000. p. 1-14.
6. Santana MFS. Caracterização físico-química de fibra alimentar de laranja e maracujá. [tese de doutorado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2005.
7. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Produção Agrícola Municipal – Sergipe. Lavoura Permanente 2010. [acesso 2012 jun 6]. Disponível em: [<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=1613&z=p&o=31&i=P>].
8. Associação Brasileira dos Exportadores de Cítricos – Abecitrus. Subprodutos da laranja. São Paulo (SP). [acesso 2009 nov 27]. Disponível em: [<http://www.abecitrus.com.br/subprodutos.html>].
9. Lajolo FM, Saura-Caura-Calixto F, Penna EW, Menezes EW. Fibra dietética en IberoAmérica: tecnología y salud, obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación en alimentos. São Paulo (SP): Varela; 2001.
10. El-Dash A, Germani R. Tecnologia de farinhas mistas: uso de farinhas mistas na produção de bolos. Brasília (DF): Embrapa; 1994. v. 7, p. 31.
11. Borges JTS, Pirozi MR, Lucia SMD, Pereira PC, Moraes ARF, Castro VC. Utilização de farinha mista de aveia e trigo na elaboração de bolos. *Bol CEPPA*. 2006;24(1):145-62.
12. Centenaro GS, Feddern V, Moraes KS, Zavareze ER, Salasmellado M. Elaboração de produtos de panificação enriquecidos com subprodutos da indústria de alimentos. *In*: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Anais. Recife (PE): SBCTA; 2004. CD-ROM.
13. Stone H, Sidel J. Sensory evaluation practices. 3. ed. Nova York: Academic Press; 2004.
14. AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International. 17. ed. Arlington: AOAC; 2000. CD-ROM.
15. Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 4. ed. Brasília (DF): Anvisa; 2005.
16. STATISTICA for Windows, Release 8.0 A. Tulsa: Stat Soft, Inc., 2006. CD-ROM.
17. ASSISTAT – Assistência Estatística, Versão 7.5 beta (2008). [acesso 2009 out 24]. Disponível em: [<http://www.assistat.com/indexp.html>].
18. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. Portaria n. 593, de 25 de agosto de 2000. Regulamento técnico para produtos de cereais, amido, farinhas e farelos. Brasília (DF). [acesso 2008 nov 22]. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/divulga/consulta/index.htm>>.
19. BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 27, de 13 de janeiro de 1998. Aprova o regulamento técnico referente à Informação Nutricional Complementar (declarações relacionadas ao conteúdo de nutrientes). Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 16 jan 1998.
20. Borges AM. Caracterização e estabilidade de pré-misturas para bolos à base de farinha de banana verde. [dissertação de mestrado]. Lavras (MG): Universidade Federal de Lavras; 2007.
21. Moscatto JA, Prudêncio-Ferreira SH, Haully MC. Farinha de yacon e inulina como ingredientes na formulação de bolo de chocolate. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2004;24(4):634-40.
22. Santos AV. Obtenção e incorporação de farinha de casca de maracujá na produção de bolos de chocolate. [dissertação de mestrado]. Aracaju (SE): Universidade Tiradentes; 2008.
23. Esteller MS, Yoshimoto RMO, Amaral RL, Lannes SCS. Uso de açúcares em produtos panificados. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2004;24:602-3.

Teor de gordura e de água: fatores determinantes na textura e na aceitabilidade de requeijão *light*

Fat and moisture contents: determining factors on the light processed cheese texture and acceptability

RIALA6/1442

Rita de Cássia dos Santos Navarro da SILVA*, Valéria Paula Rodrigues MINIM, Márcia Cristina Ribeiro Teixeira VIDIGAL, Jocielle Almeida TEIXEIRA, Liliane Elen da Silva MORAES, Luiz Paulo LIMA, Luis Antônio MINIM

*Endereço para correspondência: Laboratório de Propriedades Tecnológicas e Sensoriais dos Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Avenida P. H. Rolfs s/n, Campus Universitário, CEP 36570-000, Viçosa, MG, Brasil. Tel.: +55 (31) 3899-1623. E-mail: rita.navarro@ufv.br.

Recebido: 06.07.2011 - Aceito para publicação: 10.01.2012

RESUMO

Neste trabalho, foi avaliada a influência dos teores de gordura e água na textura e na aceitação de requeijão *light* adicionado de concentrado proteico de soro, determinando-se os teores de gordura, água, proteína, carboidratos, cinzas e extrato seco desengordurado (ESD). As formulações foram analisadas instrumentalmente por meio da análise do perfil de textura, e a aceitabilidade sensorial foi avaliada por 100 consumidores. Os resultados foram examinados por meio da análise de variância, ajuste de modelos de regressão e mapa de preferência interno. O modelo de regressão linear de primeiro grau apresentou melhor ajuste aos dados em nível de 10% de probabilidade. Os constituintes gordura e água contribuíram inversamente para a intensidade das propriedades de textura. Os requeijões originados de diferentes combinações de proporção de gordura e água, com ESD de aproximadamente 19,30%, apresentaram intensidades intermediárias de textura e obtiveram melhor aceitação pelos consumidores; e este evento indicou que o equilíbrio no ESD otimizou a aceitabilidade sensorial. Este estudo evidencia que a redução de gordura em requeijão deve ser aliada ao aumento do teor de água, para que a indústria possa oferecer diversidade de produtos que atendam às expectativas dos consumidores e ainda por menor custo de produção.

Palavras-chave. análise de perfil de textura, requeijão *light*, aceitação, extrato seco desengordurado.

ABSTRACT

The present study evaluated the effect of fat and moisture on the texture and acceptance of light processed cheese supplemented with whey protein concentrate. Concentrations of fat, moisture, protein, carbohydrates, ash and degreased dry extract (DDE) were determined. The formulations were evaluated instrumentally by texture profile analysis, and sensory acceptability was assessed by 100 consumers. Results were evaluated by analysis of variance, regression models fitting and internal preference mapping. The first grade linear regression model showed the best suitability to the data at 10% of probability. Fat and moisture constituents contributed inversely to the intensity of texture characteristics. Cheesecurd made from different combinations of fat and moisture, with DDE of approximately 19.30%, showed intermediate texture intensities, which were mostly accepted by consumers. These findings indicate that balance in DDE optimizes sensory acceptability. This study demonstrates that fat reduction in cheesecurd should be combined with increased moisture contents, and this procedure enables the industries to offer a diversity of products which meet consumer expectations and also at a lower production cost.

Keywords. texture profile analysis, light processed cheese, acceptance, degreased dry extract.

INTRODUÇÃO

O requeijão cremoso é um tipo de queijo fundido tipicamente brasileiro, fabricado em todo o território nacional, com variações de tecnologia e características¹. Este produto tem como particularidade o elevado teor de gordura, o que torna seu consumo indevido para consumidores que apresentam problemas de saúde ou que se encontram em dieta com restrição de gordura. A versão com teor reduzido de gordura é uma alternativa para os grupos supracitados, porém desenvolver um requeijão que atenda a este público e com a qualidade sensorial esperada pelos consumidores não é uma tarefa simples, mas, sim, um grande desafio à indústria de alimentos².

A redução do teor de gordura do requeijão pode ser responsável pela rejeição sensorial deste produto, particularmente devido à diminuição da cremosidade conferida pela gordura³, sendo que tal defeito na textura do produto está associado ao concomitante aumento do extrato seco desengordurado (ESD), como resultado da redução da gordura⁴.

Entre as estratégias de substituição da gordura em requeijão estão as várias modificações de processamento, o uso de cultura láctica selecionada ou modificada e a utilização de substitutos^{5,6,7,8}. Nenhuma dessas estratégias pode substituir completamente todas as propriedades e funções da gordura. Entretanto, diversas pesquisas nessa área têm o objetivo de melhorar o sabor e a textura de queijos *light*⁹.

Zalazar et al.¹⁰ avaliaram o queijo cremoso argentino com elevado teor de umidade e com adição de substituto de gordura à base de proteína (Dairy-Lo) e obtiveram queijos com redução desejável de gordura no produto final.

Noronha et al.¹¹ estudaram a substituição da gordura em queijo mimético de mozzarella por amido resistente (Novelose® 240) e concluíram que é possível substituir cerca de 90% da gordura com fibra funcional, obtendo características desejáveis de textura, tais como firmeza e coesividade.

Koca e Metin¹² avaliaram a textura instrumental, o derretimento e propriedades sensoriais de queijo kashar fresco (queijo de origem turca), com redução de 70% de gordura. Foram utilizados dois substitutos de gordura à base de proteína (1,0% p/p Simplesse® D-100 e 1,0% p/p Dairy-Lo) e um à base de carboidrato (5,0% p/p Raftiline®). Os resultados desse estudo mostraram que os substitutos Simplesse® D-100 e Raftiline® melhoram

a textura e as propriedades sensoriais do queijo kashar fresco, com redução de gordura.

Em relação ao requeijão cremoso, Ferreira et al.¹³ caracterizaram os atributos sensoriais e reológicos do requeijão cremoso adicionado de concentrado proteico de leite. Nas formulações, a proporção de concentrado proteico adicionada foi de 0%, 15%, 30% e 45% sobre a quantidade de proteína total da massa. Os autores concluíram que o requeijão com 45% do teor de proteína da massa substituído por concentrado proteico foi o que obteve maior porcentagem de aprovação em todos os atributos sensoriais e também apresentou viscosidade aparente maior que nas demais formulações.

Alves e Silva¹⁴ substituíram parcialmente a gordura do requeijão cremoso por géis formados a partir de linhaça desengordurada (5%, 10% e 15%), substituindo a gordura em 10%, 20% e 30%, respectivamente. Na análise sensorial, o atributo menos favorecido foi a aparência das amostras com 20% e 30% de substituição, devido à presença de pontos escuros. O mesmo não foi observado para a amostra com 10% de substituição. A textura foi o atributo menos afetado ($p > 0,10$), uma vez que as amostras foram consideradas semelhantes ao controle (sem linhaça), independentemente do nível de substituição. Os autores concluíram que a linhaça pode ter seu uso potencializado na alimentação humana por meio da substituição da gordura.

Os substitutos de gordura contribuem significativamente para a melhoria da qualidade de queijos fundidos com teor reduzido de gordura e, quando usados nas dosagens corretas, podem servir para ampliar o mercado consumidor, e não apenas como opção em dietas¹⁵. Muitos ingredientes são usados como substitutos totais ou parciais da gordura dos alimentos, sendo divididos em, basicamente, três categorias: à base de proteínas, à base de carboidratos e os sintéticos¹⁶. Os substitutos sintéticos e à base de carboidratos (com exceção das fibras) são constituintes que resultam em boa melhoria da textura do produto com redução de gordura, porém não agregam valor nutricional aos produtos, somente melhoram suas características sensoriais.

Por outro lado, a adição de concentrado proteico de soro (CPS) como substituto de gordura em requeijão confere uma série de benefícios nutricionais ao produto, uma vez que apresenta todos os aminoácidos essenciais para o metabolismo celular (triptofano, lisina, metionina, cistina, leucina, isoleucina, fenilalanina, valina e treonina) e atende às recomendações da FAO para todas

as idades¹⁷. A adição de CPS no requeijão *light* promove o aumento da elasticidade do requeijão, devido à interação das proteínas do soro parcialmente desnaturadas com a caseína, por meio de ligações sulfidrilas¹⁸. Porém o CPS não promove a recuperação da maciez do produto, propriedade de textura alterada pela redução da gordura, sendo necessário o aumento do conteúdo de água com consequente diminuição do ESD, a fim de diminuir a firmeza do requeijão e recuperar sua maciez^{10,19}.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência dos teores de gordura e água na textura e na aceitabilidade de requeijão *light* adicionado de concentrado proteico de soro.

MATERIAIS E MÉTODOS

Requeijões *light* avaliados

Para definir as formulações, foi utilizado delineamento composto central rotacional (DCCR) com dois fatores (gordura (G) e água (A)) em dois níveis (2^2), mais quatro pontos axiais (2×2) e o ponto central. O ponto central foi repetido três vezes para estimativa do erro puro, perfazendo um total de 11 ensaios ($2^2 + 2 \times 2 + 3$) (Figura 1).

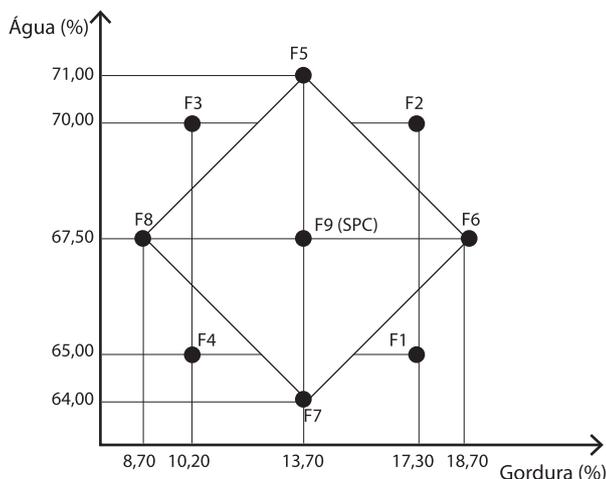


Figura 1. Disposição dos pontos experimentais no delineamento composto central rotacional (DCCR)

Os níveis de gordura em estudo foram definidos de maneira que a formulação com maior percentual de gordura (18,70%) atendesse à redução mínima (25%) exigida pela legislação para ser considerada *light*²⁰. O nível mínimo de gordura (8,70%) e os níveis de água máximo e mínimo (71,00% e 64,00%) foram definidos por meio de testes preliminares. Os demais níveis de gordura e água

foram estipulados pelo próprio delineamento estatístico, de forma que todos os pontos se encontrassem a uma distância α do ponto central (PC).

Os requeijões foram processados utilizando massa obtida por acidificação direta do leite com ácido láctico 85% P.A. à temperatura de 70 °C, conforme tecnologia descrita por Alves et al.²¹. Os produtos foram constituídos de massa (leite desnatado e ácido láctico), creme de leite 40% de gordura (Funarbe), concentrado proteico de soro (2,0% – CPS34 Gemacom), NaCl (0,80% – Cisne), sal fundente (0,70% – Joha S9) e conservantes sorbato de potássio (0,020% – Gemacom) e nisina (0,017% – Danisco). O processamento foi realizado em tacho aberto provido de agitador mecânico a 50 rpm.

Análise de composição centesimal

As determinações de gordura (032/IV), água (012/IV), proteínas (036/IV) e resíduo mineral fixo (018/IV) dos requeijões foram realizadas seguindo os métodos descritos em “Métodos físico-químicos para análise de alimentos”²². As análises para determinação da composição centesimal dos requeijões foram realizadas em duplicata para cada repetição.

Osteores de carboidratos e extrato seco total foram obtidos pelo método indireto. O teor de carboidratos foi calculado pela diferença percentual entre o conteúdo total e a soma dos demais nutrientes (%Carboidratos = $100\% - [\%Proteínas + \%Gordura + \%Resíduo\ mineral\ fixo + \%Água]$)²³. O teor de extrato seco desengordurado (ESD) foi calculado pela diferença percentual entre o conteúdo total e a porcentagem de gordura e água das formulações (%ESD = $100\% - \%Gordura - \%Água$), conforme recomendado²².

O conteúdo calórico foi calculado em função da composição dos requeijões em termos de proteínas, gorduras e carboidratos, utilizando os fatores de conversão de cada nutriente, ou seja, 4, 9 e 4 kcal/g de alimento, respectivamente²⁴.

Análise do perfil de textura (TPA)

As propriedades de textura dos requeijões foram determinadas por meio da análise de perfil de textura²⁵, a qual foi conduzida em máquina universal de teste mecânico (Instron – Série 3367, Estados Unidos, 2005). As análises foram realizadas a 10 ± 1 °C, representando a temperatura de armazenamento do requeijão.

Uma probe de 15 mm de diâmetro foi movida perpendicularmente sobre a amostra de requeijão

contida em uma embalagem de formato cilíndrico de 50 mm de diâmetro e 40 mm de altura²⁶. As condições do teste foram: célula de carga de 1 KN, distância de compressão de 20% da altura do produto, velocidade de 1,0 mm/s, tempo de contato de 5 segundos, com dois ciclos de penetração, conforme descrito por Rapacci et al.²⁷ e por Gallina et al.²⁸.

A força exercida sobre o produto foi automaticamente registrada, e as propriedades de textura firmeza (N), gomosidade (N), coesividade (adimensional), mastigabilidade (J) e elasticidade (mm) foram automaticamente calculadas pelo software Blue Hill 2.0 (Instron, Estados Unidos, 2005) a partir das curvas de força (N) × tempo (s) geradas durante o teste. Foram realizadas cinco análises para cada repetição (replicatas).

Aceitabilidade sensorial

Foram recrutados, no Campus da Universidade Federal de Viçosa, 100 consumidores de requeijão. As formulações de requeijão foram servidas aos consumidores de forma aleatória e monádica, em copos descartáveis contendo aproximadamente 10 g do produto. Utilizou-se a escala hedônica estruturada de nove pontos, variando de “gostei extremamente” (escore 9) a “desgostei extremamente” (escore 1), para os consumidores expressarem a aceitação em relação à textura dos produtos^{29,30}. Foi servido juntamente às amostras um copo de água à temperatura ambiente (25 °C) para os consumidores promoverem o enxágue das papilas gustativas entre as avaliações dos requeijões.

Análise estatística dos dados experimentais

Para verificar se os teores de gordura e de água dos requeijões processados corresponderam aos níveis

estipulados pelo delineamento experimental (DCCR), foi realizado um teste t para amostras independentes entre o valor teórico e o obtido na prática por meio da determinação da composição centesimal.

O efeito dos teores de gordura e de água nas propriedades de textura (firmeza, gomosidade, coesividade, mastigabilidade e elasticidade) dos requeijões foi analisado por meio da análise de variância (teste F) e pelo ajuste de modelos de regressão. Para a seleção do modelo de melhor ajuste aos dados, foram avaliados os seguintes parâmetros: não significância da falta de ajuste ($p > 0,10$), significância dos coeficientes da regressão ($p < 0,10$) e, por último, a explicação do modelo por meio do coeficiente de determinação R^2 ($SQ_{REGRESSÃO}/SQ_{TRATAMENTOS}$).

Na aceitabilidade sensorial, os dados de aceitação da textura foram analisados por meio da técnica multivariada mapa de preferência interno, em que os dados de aceitação (teste de consumidor) foram organizados numa matriz de amostras (em linhas) e consumidores (em colunas), e esta foi submetida a análise de componentes principais (ACP). Também procedeu-se à análise de superfície de respostas (ASR), a fim de verificar o comportamento da aceitabilidade sensorial da textura em função do teor de gordura e de água.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o pacote STAT/SAS do *software* estatístico Statistical Analysis System, versão 9.1, licenciado para a Universidade Federal de Viçosa em 2011.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Composição centesimal dos requeijões *light*

A composição centesimal dos requeijões *light* está apresentada na Tabela 1. Os níveis teóricos e

Tabela 1. Composição centesimal dos requeijões *light* adicionados de CPS (médias e desvios-padrões das medidas)

Formulações	Constituintes (%)					ESD (%)	Valor calórico (kcal)
	Água	Gordura	Proteína	Cinzas	Carboidratos		
F1	64,90 ± 0,10	16,50 ± 0,20	14,02 ± 0,25	3,14 ± 0,09	1,44 ± 0,14	18,60 ± 0,30	210,34
F2	69,75 ± 0,10	16,40 ± 0,10	10,01 ± 0,20	2,69 ± 0,18	1,15 ± 0,02	13,85 ± 0,00	192,24
F3	69,75 ± 0,10	10,50 ± 0,13	14,35 ± 0,25	3,28 ± 0,46	2,12 ± 0,68	19,75 ± 0,03	165,02
F4	65,47 ± 0,10	11,50 ± 0,32	18,14 ± 0,04	3,19 ± 0,11	1,70 ± 0,28	23,03 ± 0,22	182,86
F5	71,02 ± 0,10	13,00 ± 0,18	12,07 ± 0,30	2,65 ± 0,01	1,26 ± 0,01	15,98 ± 0,28	170,32
F6	67,20 ± 0,00	18,50 ± 0,53	10,54 ± 0,09	2,51 ± 0,02	1,26 ± 0,45	14,31 ± 0,52	213,7
F7	63,50 ± 0,10	13,10 ± 0,08	18,46 ± 0,25	2,96 ± 0,01	1,98 ± 0,06	23,40 ± 0,18	199,66
F8	66,67 ± 0,05	8,45 ± 0,13	19,40 ± 0,17	3,40 ± 0,29	2,08 ± 0,28	24,88 ± 0,18	161,97
F9	67,15 ± 0,00	13,60 ± 0,15	15,09 ± 0,20	2,80 ± 0,00	1,37 ± 0,05	19,26 ± 0,15	188,24

F1: 17,3% G e 65% A; F2: 17,3% G e 70% A; F3: 10,2% G e 70% A; F4: 10,2% G e 65% A; F5: 13,7% G e 71% A; F6: 18,7% G e 67,5% A; F7: 13,7% G e 64% A; F8: 8,7% G e 67,5% A; F9 (ponto central): 13,7% G e 67,5% A

experimentais de gordura e água dos requeijões não apresentaram diferença significativa pelo teste t, tendo p-valores de 0,8670 e 0,7887 respectivamente. Isso indica que as formulações processadas atenderam aos requisitos estipulados pelo delineamento.

As diferentes combinações entre gordura e água produziram requeijões com teor de ESD diferenciado, devido a este constituinte ser calculado pela diferença percentual entre o conteúdo total e o teor de gordura e de água. Portanto, a redução dos teores de gordura e de água acarretou em aumento do teor de proteína (caseína) nos requeijões. Resultado semelhante foi encontrado por Soares et al.¹⁶ e Cunha et al.³¹ na determinação da composição centesimal de queijos com baixo teor de gordura.

Assim, para um mesmo nível do conteúdo de água, o teor de extrato seco desengordurado aumentou com a redução do teor de gordura, conforme observado nas formulações F2 e F3, as quais apresentaram aumento de 13,85% para 19,76% do ESD quando o teor de gordura foi reduzido de 16,40% para 10,50%. O mesmo comportamento foi verificado para os requeijões F6, F9 e F8 (67,50% A) e também para as formulações F1 e F4 (65,00% A).

O conteúdo de água também provocou alterações no ESD dos requeijões. Comparando as formulações dentro do mesmo nível de redução de gordura, verificou-se que o ESD das formulações F1 e F2 aumentou de 13,85% para 18,06% quando o teor de água diminuiu de 69,75% para 64,90%. O mesmo foi observado para as formulações F5, F9 e F7 (13,70% G) e também para F3 e F4 (10,20% G).

Assim, foi identificado que os teores de gordura e de água influenciaram inversamente o percentual de ESD dos requeijões, sendo que produtos com combinações

diferentes de gordura e água (F1, F3 e F9) apresentaram teores de ESD semelhantes (aproximadamente 19,30%), devido à compensação do conteúdo de água no teor de ESD gerado pela redução de gordura.

As formulações em que a redução da gordura não foi acompanhada do aumento do teor de água (F4, F7 e F8) apresentaram elevado conteúdo proteico (aproximadamente 23,80% de ESD). Já os requeijões que continham maiores percentuais de gordura e foram combinados com níveis mais altos de água (F2, F5 e F6) apresentaram baixo teor de ESD (aproximadamente 14,70%).

Quanto ao valor calórico, o requeijão com menor teor de gordura (10,20%) combinado com o maior teor de água (70,00%) apresentou menor energia que as demais formulações, o que é muito interessante para a indústria, uma vez que este produto terá menor custo de produção (menor utilização de creme e de massa) e oferecerá baixo conteúdo calórico. Sem contar o apelo de marketing devido ao fato de este requeijão apresentar uma redução de 65% do teor de gordura do produto tradicional.

Textura instrumental

As formulações de requeijão apresentaram diferença significativa ($p < 0,10$) em relação às propriedades de textura firmeza, gomosidade, mastigabilidade, coesividade e elasticidade, pelo teste F. As médias obtidas para cada amostra em relação a cada uma das medidas instrumentais estão descritas na Tabela 2.

As formulações F4, F7 e F8 (elevado ESD) foram caracterizadas por apresentarem maior intensidade das propriedades firmeza, gomosidade, mastigabilidade e elasticidade, e as formulações F2, F5 e F6 (baixo ESD), por apresentarem menor intensidade desses parâmetros. Os requeijões F1, F3 e F9 (ESD intermediário) apresentaram

Tabela 2. Médias e desvios-padrões obtidos para as propriedades de textura dos requeijões *light* adicionados de CPS

Amostras	Propriedades de Textura				
	Firmeza (N)	Gomosidade (N)	Mastigabilidade (J)	Coesividade (adimensional)	Elasticidade (mm)
F1	0,29 ± 0,05	0,25 ± 0,05	1,18 ± 0,44	0,87 ± 0,05	4,46 ± 1,08
F2	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,20 ± 0,32	0,00 ± 0,00
F3	0,23 ± 0,01	0,08 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,96 ± 0,22	0,00 ± 0,00
F4	1,64 ± 0,12	1,26 ± 0,04	8,78 ± 0,37	0,77 ± 0,08	6,95 ± 0,41
F5	0,04 ± 0,01	-0,04 ± 0,08	0,00 ± 0,00	-1,24 ± 2,40	0,00 ± 0,00
F6	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,02	0,00 ± 0,00	1,45 ± 0,50	0,00 ± 0,00
F7	1,93 ± 0,20	1,42 ± 0,06	10,09 ± 0,84	0,74 ± 0,07	7,10 ± 0,31
F8	2,34 ± 0,12	1,58 ± 0,11	10,51 ± 0,84	0,67 ± 0,04	6,66 ± 0,17
F9	0,23 ± 0,01	0,23 ± 0,06	0,92 ± 0,41	0,96 ± 0,17	4,16 ± 0,31

intensidades intermediárias das medidas instrumentais. A combinação entre diferentes teores de gordura e de água permitiu a obtenção de produtos com diferentes perfis de textura.

A influência dos constituintes gordura (G) e água (A) nas propriedades de textura dos requeijões foi modelada estatisticamente pelas equações (1) a (4):

- Firmeza = $18,1828 - 0,1663 \cdot G - 0,2260 \cdot A$; $R^2 = 0,7072(1)$
- Gomosidade = $13,8786 - 0,1251 \cdot G - 0,1751 \cdot A$; $R^2 = 0,7510(2)$
- Mastigabilidade = $95,9890 - 0,7932 \cdot G - 1,2160 \cdot A$; $R^2 = 0,7086(3)$
- Elasticidade = $81,9766 - 0,4209 \cdot G - 1,0786 \cdot A$; $R^2 = 0,8796(4)$

Os modelos foram testados quanto a falta de ajuste e significância dos parâmetros da regressão e também apresentaram coeficiente de determinação (R^2) superior a 70%. Os efeitos de segundo grau e a interação não foram significativos ($p > 0,10$), pelo teste t. Para a propriedade coesividade, os parâmetros da regressão não apresentaram significância ao nível de 10% de probabilidade.

Verificou-se que todas as propriedades de textura apresentaram influência negativa dos fatores gordura e água, o que se deve à relação destes constituintes com o ESD – quanto menor o teor de gordura e de água, maior é o conteúdo de caseína, o que favorece as interações proteína-proteína e causa o enrijecimento da matriz proteica^{4,32}. O incremento da intensidade das propriedades de textura com a redução do teor de gordura dos requeijões é consistente com os resultados obtidos por estudos anteriores^{3,4,6,31}.

As formulações F1, F3 e F9, teor intermediário de ESD (aproximadamente 19,30%), apresentaram intensidade moderada das propriedades de textura devido à compensação do conteúdo de água no teor de ESD gerado pela redução de gordura.

É importante ressaltar que algumas formulações apresentaram teor de água acima do limite superior permitido pelo Regulamento Técnico de Qualidade e Identidade de Requeijão – RTIQ³³, o qual preconiza o máximo de 65% de umidade no requeijão cremoso. Porém verifica-se, por meio dos dados obtidos neste trabalho, que na versão *light* este limite é inviável, uma vez que, atendendo ao requisito da composição química,

obtem-se um produto fora das recomendações sensoriais deste mesmo regulamento, o qual estabelece que o requeijão cremoso deve apresentar consistência untável, cremosa, fina e lisa.

Ressalta-se também que, ao reduzir a gordura do requeijão, ainda que seja a redução mínima, fica impossível atender ao requisito do RTIQ referente ao teor de gordura (mínimo de 55% de gordura no extrato seco) sem que haja alterações sensoriais desagradáveis. Assim, fica claro que a versão *light* do produto deve atender aos requisitos do regulamento técnico referente a informação nutricional complementar²⁰, e não as recomendações técnicas do produto na versão tradicional. O mesmo procedimento foi utilizado por Baroni et al.³⁴, Bosi³⁵, Gomes e Penna³⁶ no desenvolvimento de requeijão *light*. Nessas pesquisas, foram obtidos requeijões com cerca de 10% de gordura e 70% de água, os quais não atenderam os requisitos do RTIQ³³, mas atenderam às exigências contidas no regulamento técnico referente a informação nutricional complementar²⁰.

Verifica-se que o ajuste do teor de água no requeijão *light* adicionado de concentrado proteico de soro possibilitou a recuperação da maciez do produto, atributo perdido com a redução do teor de gordura. Este efeito fica evidente ao se observar firmeza das formulações em que o teor de água não aumentou concomitantemente à redução da gordura (F4, F7 e F8), as quais apresentaram firmeza de aproximadamente 1,97 N, frente aos produtos em que o teor de água foi ajustado em função do nível de redução de gordura (F1, F3 e F9), apresentando firmeza de aproximadamente 0,23 N.

Aceitabilidade sensorial dos requeijões *light*

O mapa de preferência interno da textura dos requeijões está apresentado na Figura 2. Observa-se que o primeiro componente principal explicou 54,22%, e o segundo, 21,72%, totalizando, portanto, 75,94% de variância entre as nove formulações de requeijão quanto a aceitação da textura.

A separação espacial dos requeijões sugere a formação de quatro grupos distintos de acordo com a aceitação sensorial da textura, sendo um formado pelos requeijões F1, F3 e F9 (primeiro quadrante), outro, pelas formulações F4, F7 e F8 (segundo quadrante), um terceiro, pelo requeijão F2 (terceiro quadrante), e um último grupo constituído pelas formulações F5 e F6.

Na Figura 2, cada ponto representa as correlações entre os dados de aceitação de um consumidor e os dois

primeiros componentes principais. Os consumidores correlacionados com pelo menos um dos componentes consideram diferença na aceitação dos requeijões. Dessa forma, os consumidores localizados na região central do gráfico não estão correlacionados com nenhum dos dois componentes e, portanto, não discriminam os requeijões quanto a aceitação. Observa-se na Figura 2 que poucos consumidores localizaram-se na região central e que a maioria correlacionou positivamente com o primeiro ou com o segundo componente, indicando que as formulações F1, F3 e F9 foram mais aceitas pela maioria dos consumidores.

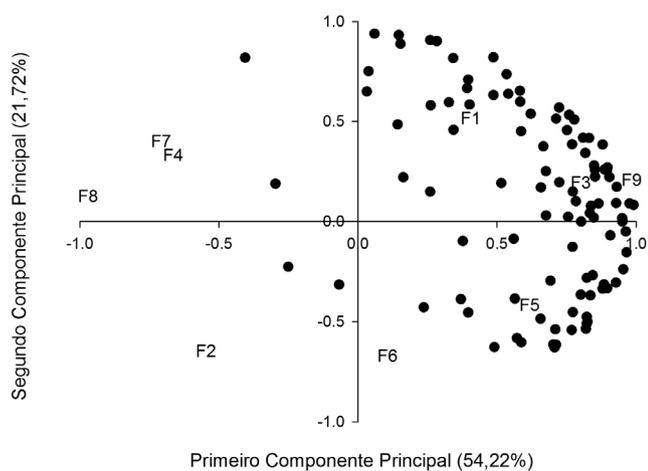


Figura 2. Representação gráfica das formulações de requeijão e dos consumidores em relação aos dois componentes principais

Os requeijões F5 e F6 também foram aceitos, porém por um grupo menor de consumidores; já os requeijões F2, F4, F7 e F8 (situadas no segundo e terceiro quadrantes) não foram aceitos pelos consumidores em relação a textura.

A não aceitação sensorial dos requeijões F4, F7 e F8 pode ser explicada pelo elevado teor de ESD (aproximadamente 24,80%) desses produtos, os quais apresentaram matriz proteica muito firme (aproximadamente 1,97 N), desfavorecendo a textura dos requeijões. Já para o requeijão F2, o inverso foi verificado, em que a elevação do teor de água a 70,00% combinada com 17,30% de gordura resultou em alta dissolução do ESD, conferindo textura pouco firme (0,02 N) ao requeijão, o que também prejudicou a aceitação do produto.

Verificou-se que os requeijões F1, F3 e F9, formulações com diferentes níveis de gordura, obtiveram aceitação sensorial semelhante quando combinados

com diferentes teores de água, ou seja, o requeijão com 17,30% G e 65,00% A (F1) apresentou aceitabilidade sensorial equivalente ao produto com 10,20% G e 70,00% A (F3) e, também, equivalente ao requeijão com 13,70% G e 67,50% A (F9). É importante ressaltar que essas formulações apresentaram teores de ESD muito próximos (aproximadamente 19,30%), o que evidencia que a redução de gordura em requeijão deve ser aliada ao aumento no teor de água para que ocorra equilíbrio na textura do produto.

Assim, o aumento do teor de água concomitante à redução de gordura no requeijão *light* adicionado de concentrado proteico de soro possibilitou a recuperação da maciez do produto e otimizou a aceitação da textura do requeijão. A relação existente entre o teor de ESD e a aceitabilidade sensorial pode ser facilmente visualizada na Figura 3, uma representação gráfica da superfície de resposta da aceitabilidade sensorial em função do teor de gordura e água.

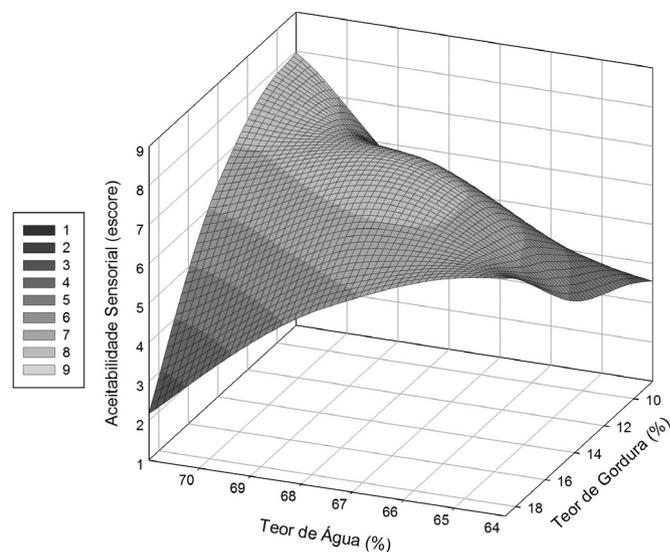


Figura 3. Representação gráfica da análise de superfície de resposta da aceitabilidade sensorial em função do teor de gordura e de água do requeijão

Por meio da análise de superfície de resposta (ASR), é possível identificar diversas combinações entre gordura e água que atendam às expectativas dos consumidores em relação à textura dos requeijões. Assim, quanto menor é o teor de gordura, maior deve ser o conteúdo de água do produto para que este apresente textura agradável. Tal informação é de grande valia para as indústrias, pois será possível oferecer uma diversidade de produtos que atendem às expectativas dos consumidores

e ainda apresentam baixo custo de produção (menor quantidade de matéria-prima utilizada). Sem contar as estratégias de marketing que poderão ser realizadas devido à possibilidade de produzir um requeijão com baixo teor de gordura e com qualidade sensorial.

CONCLUSÃO

Os teores de gordura e de água influenciaram as propriedades de textura avaliadas, indicando os constituintes estudados como fatores determinantes da textura de requeijão *light*.

Diferentes combinações de gordura e água produziram requeijões com propriedades de textura semelhantes, evidenciando que a redução do teor de gordura em requeijão deve ser aliada ao aumento do conteúdo de água do produto final, para que ocorra equilíbrio no extrato seco desengordurado e, conseqüentemente, na textura do requeijão.

A análise de superfície de resposta possibilitou identificar inúmeras combinações entre gordura e água que atendem às expectativas dos consumidores quanto à textura dos requeijões, possibilitando o desenvolvimento de produtos com diferentes níveis de redução de gordura e com aceitabilidade sensorial semelhante. Tal informação é de grande valia para as indústrias, pois poderá oferecer grande diversificação de produtos que, além de atenderem às expectativas dos consumidores, apresentarão baixo custo de produção.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ e à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (Fapemig) sob o processo APQ-01830-09, pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Munck AV, Campos WA. Requeijão: um produto brasileiro. *Inf Agropec*. 1998;10:35-8.
2. Romeih EA, Michaelidou A, Biliaderis CG, Zerfiridis GK. Low-fat white-brined cheese made from bovine milk and two commercial fat mimetics: chemical, physical and sensory attributes. *Int Dairy J*. 2002;12:525-40.
3. Flourey J, Camier B, Rousseau F, Lopez C, Tissier J, Famelart M. Reducing salt level in food: Part 1. Factors affecting the manufacture of model cheese systems and their structure-texture relationships. *Food Sci Technol - LWT*. 2009;42:1611-20.
4. Sheehan JJ, Guinee TP. Effect of pH and calcium level on the biochemical, textural and functional properties of reduced-fat Mozzarella cheese. *Int Dairy J*. 2004;14:161-72.
5. Perry DB, McMahon DJ, Oberg CJ. Manufacture of low fat Mozzarella cheese using exopolysaccharide-producing starter cultures. *J Dairy Sci*. 1998;81:563-6.
6. Rudan MA, Barbano DM, Yun J J, Kindstedt PS. Effect of fat reduction on chemical composition, proteolysis, functionality, and yield of Mozzarella cheese. *J Dairy Sci*. 1999;82:661-72.
7. Poudaval VS, Mistry VV. Manufacture of reduced-fat Mozzarella cheese using ultrafiltered sweet buttermilk and homogenized cream. *J Dairy Sci*. 1999;82:1-9.
8. Metzger LE, Barbano DM, Kindstedt PS, Guo MR. Effect of milk preacidification on low fat Mozzarella cheese: II. Chemical and functional properties during storage. *J Dairy Sci*. 2001;84:1348-56.
9. Drake MA, Swanson B G. Reduced and low fat cheese technology: a review. *Trends Food Sci Tech*. 1995;6:336-69.
10. Zalazar CA, Zalazar CS, Bernal S, Bertol N, Bevilacqua A, Zaritzky N. Effect of moisture level and fat replacer on physicochemical, rheological and sensory properties of low fat soft cheeses. *Int Dairy J*. 2002;12:45-50.
11. Noronha N, O'Riordan ED, O'Sullivan M. Replacement of fat with functional fibre in imitation cheese. *Int Dairy J*. 2007;17:1073-82.
12. Koca N, Metin M. Textural, melting and sensory properties of low-fat fresh kashar cheeses produced by using fat replacers. *Int Dairy J*. 2004;14:365-73.
13. Ferreira CV, Ohata SM, Viotto WH, Cunha RL. Influência da adição de concentrado proteico de leite na qualidade do requeijão cremoso. *Rev Ind Latic*. 2000;28:64-7.
14. Alves LL, Silva LP. Substituição parcial da gordura do requeijão por gel de linhaça. *Simpósio Latino-Americano de Ciência de Alimentos, 6º, Campinas. Anais... Campinas, 2005 (CD-ROM)*.
15. Anon. The principles of fat replacements. *Dairy Ind Int*. 1994;2:37.
16. Soares FM, Fonseca LM, Martins RT, Machado EC, Pereira Jr. FN, Fonseca CSP. Influência do concentrado proteico de soro na composição do requeijão em barra com teor reduzido de gordura. *Arq Bras Med Vet Zoo*. 2002;54:1-7.
17. Sgarbieri VC. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. *Rev Nutr*. 2004;17:397-409.
18. Metzger LE, Mistry VV. A new approach using homogenization of cream in the manufacture of reduced fat cheddar cheese. *J Dairy Sci*. 1995;78:1883-95.
19. Olson NF, Price WV. Composition and bacterial growth as factors affecting the body of pasteurized process cheese spread. *J Dairy Sci*. 1961;44:1394-404.
20. Brasil. Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde (ANVISA). Portaria n. 27, de 13 de janeiro de 1998. Regulamento Técnico de Informação Nutricional Complementar. *Diário Oficial da União*. Brasília; 1998.
21. Alves RMV, Van Dender AGF, Jaime SBM, Moreno I, Pereira BC. Effect of light and packages on stability of spreadable processed cheese. *Int Dairy J*. 2007;17:365-73.
22. Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 4. ed. Brasília: ANVISA; 2005.
23. Costa EGF. Desenvolvimento de uma bebida à base de proteína de soja, enriquecida com vitaminas A e D. [dissertação de mestrado]. Viçosa (MG): Universidade Federal de Viçosa; 2003.

24. United States Department of Agriculture. Composition of Foods. Washington: USDA; 1963.
25. Bourne MC. Food Texture and viscosity: concept and measurement. 2. ed. Elsevier Science & Technology Books; 2002.
26. Pons M, Fiszman SM. Instrumental texture profile analysis with particular reference to gelled systems. *J Texture Stud*. 1996;27:597-624.
27. Rapacci M, Campos SDS, Van Dender AGF. Requeijão cremoso: avaliação do perfil de textura. *Rev Ind Latic*. 1998;3:64-9.
28. Gallina DA, Van Dender AGF, Yotsuyanagi K, Rodrigues de Sá PBZ. Influence of storage temperature on the texture profile and colour characteristics of UHT requeijão cremoso. *Braz J Food Technol*. 2008;11:169-74.
29. Meilgaard MC, Civille GV, Carr BT. Sensory evaluation techniques. 4. ed. Boca Raton: CRC Press; 2006.
30. Minim VPR. Análise sensorial: estudo com consumidores. 2. ed. Viçosa: Editora da Universidade Federal de Viçosa; 2010.
31. Cunha CR, Viotto WH, Viotto, LA. Use of low concentration factor ultrafiltration retentates in reduced fat "Minas Frescal" cheese manufacture: effect on composition, proteolysis, viscoelastic properties and sensory acceptance. *Int Dairy J*. 2006;16:215-24.
32. Fox PF, Guinee TP, Cogan TM, McSweeney PLH. Cheese rheology and texture. *Fundamentals of cheese science*. Gaithersburg: Aspen Publishers; 2000.
33. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa). Portaria n. 359, de 4 de setembro de 1997. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Requeijão ou Requesón. Brasília; 1997.
34. Baroni AF, Freitas IC, Cunha RL, Hubinger MD, Menegalli FC. Caracterização reológica de requeijão cremoso tradicional e com teor reduzido de gordura: viscosidade extensional e em cisalhamento. *Braz J Food Technol*. 1999;2:21-9.
35. Bosi MG. Desenvolvimento de processo de fabricação de requeijão *light* e de requeijão sem adição de gordura com fibra alimentar. [tese de doutorado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2008.
36. Gomes RG, Penna AB. Caracterização de requeijão cremoso potencialmente prebiótico pela adição de inulina e proteína de soja. *Bol CEPPA*. 2010;28:289-302.

Concentrado proteico do soro e yacon agregam valor nutricional e sensorial em iogurte *diet*

Whey protein concentrate and yacon enhance the nutritional and sensory values in diet yogurt

RIALA6/1443

Maria Inês DANTAS¹, Christiane Mileib VASCONCELOS², Carina Aparecida PINTO¹, Valéria Paula Rodrigues MINIM², Hércia Stampini Duarte MARTINO^{1*}

* Endereço para correspondência: ¹Departamento de Nutrição e Saúde, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Av. P. H. Rolfs s/n, Campus da UFV, CEP 36570-000, Viçosa, MG. Tel.: +55 (31) 3899-3741. E-mail: hercia@ufv.br.

²Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil

Recebido: 20.06.2011 - Aceito para publicação: 17.01.2012

RESUMO

Neste estudo, foram analisadas a composição química e a aceitabilidade de iogurte *diet* em que foram acrescentados concentrado proteico do soro de leite (CPS) e diferentes concentrações de doce de yacon (DY). Foram desenvolvidas quatro formulações de iogurtes utilizando-se leite parcialmente desnatado, 1,5% de CPS, 1,1% de edulcorante, 1,0% de essência de salada de fruta e concentrações de 8%, 15% e 25% de DY. A composição centesimal das quatro formulações foi analisada segundo os critérios da legislação brasileira. A aceitabilidade das amostras foi avaliada por 82 consumidores e examinadas por meio de análise de regressão, com ajustamento de um modelo de regressão e mapa de preferência interno. Os teores de proteínas em todas as formulações mostraram valores adequados conforme previsto na legislação brasileira. As formulações apresentaram valores abaixo de 2,9 g . 100 g⁻¹ nos teores de lipídios, sendo classificadas como produtos parcialmente desnatados. Quanto maior a adição de doce de yacon, maior foi a aceitação do iogurte pelos consumidores. Desta forma, os iogurtes desenvolvidos atendem às exigências do mercado consumidor atual, que deseja produtos com boa qualidade sensorial e nutricional, capazes de agregar vantagens de alimentos funcionais e trazer benefícios à saúde.

Palavras-chave. concentrado proteico de soro, yacon, iogurte.

ABSTRACT

This study aimed at evaluating the chemical composition and acceptability of diet yogurt formulated by adding whey protein concentrate (WPC) and different concentrations of sweet yacon. Four formulations of yogurt were developed using partially skimmed milk, 1.5% of WPC, 1.1% of sweetener, 1.0% of fruit salad essence and concentrations of 8%, 15% and 25% of sweet yacon. The chemical composition of four formulations was analyzed according to the Brazilian regulation criteria. The acceptability of the formulations was evaluated by 82 consumers. The results were evaluated by means of analysis of variance and regression, and using an internal preference mapping. In all the formulations, the protein showed appropriate values as required by the Brazilian regulation. Regarding fat contents, the formulations showed values below 2.9 g × 100 g⁻¹, being classified as partially skimmed product. The higher was the sweet yacon addition, the greater was the yogurt acceptance by consumers. The developed yogurts comply with the requirements of the current consumer market, which cares for products with high nutritional and sensory qualities, and to combine the advantage of functional foods and health benefits.

Keywords. whey protein concentrate, yacon, yogurt.

INTRODUÇÃO

Grande parte das indústrias alimentícias no Brasil tem encontrado na inovação de produtos a chave para a sobrevivência no mercado. Uma forte tendência é o lançamento de produtos que, além da alta qualidade sensorial e nutricional, apresentem benefícios associados à saúde, os denominados alimentos funcionais¹. Dentre os alimentos cujas alegações de saúde têm sido amplamente divulgadas destaca-se o iogurte, pois, além de ser um produto de consumo rápido e prático, de fácil aceitação e rico em nutrientes, possui qualidades sensoriais e de saúde associadas. Alguns estudos reconhecem as características nutricionais do iogurte e a presença de uma série de fatores multidimensionais implicados na promoção da saúde humana²⁻⁴. Além dos tipos de iogurte já considerados tradicionais, como os aromatizados, líquidos, com pedaços de frutas e desnatados, a evolução tecnológica da produção conduziu à entrada de novos produtos, com maior valor nutricional agregado, que progressivamente têm conquistado os consumidores⁴.

O concentrado proteico do soro de leite (CPS) vem sendo aplicado em diversos produtos dietéticos devido a suas propriedades funcionais tecnológicas, entre as quais agir mimetizando a gordura⁵, apresentar boa solubilidade, a capacidade emulsificante, geleificante e de retenção de ar, adequadas viscosidade e adesividade e a capacidade de realçar cor, sabor e textura^{6,7}.

Além das propriedades tecnológicas, as proteínas do soro são de alto valor biológico, fácil digestão, excelente eficiência metabólica e ricas em aminoácidos sulfurados. Possuem propriedades funcionais, como: facilitar a ação das proteínas e enzimas digestivas no organismo humano, melhorar o sistema imunológico, reduzir o colesterol sérico, facilitar a absorção de cálcio, fósforo, ferro e ser fonte de galactose, que é importante na síntese de tecidos nervosos e cerebrosídeos em crianças^{8,9}.

Assim como as proteínas do soro, a raiz de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) também possui alegação de saúde, sendo considerada alimento funcional devido, principalmente, a seu elevado conteúdo de frutanos do tipo inulina e fruto-oligossacarídeos (FOS) como carboidratos de reserva¹⁰. A importância da inulina e do FOS deve-se ao fato de esses compostos sofrerem mínima (< 10%) hidrólise enzimática no intestino delgado. Assim, eles entram no intestino grosso e são quase completamente metabolizados pela microflora. Quando fermentados, tendem a favorecer a produção de

ácidos graxos de cadeia curta, como o ácido propiônico, o qual, por sua vez, diminui a relação ácido acético-ácido propiônico, levando à diminuição do colesterol sérico total e da LDL, que são importantes fatores de risco para doença arterial coronariana¹¹.

Dentre os benefícios para a saúde humana associados ao consumo de yacon, podem ser citados: valor energético reduzido; eliminação de bactérias patogênicas e putrefativas por efeito da multiplicação das bifidobactérias; redução dos lipídios no sangue; aumento da absorção de minerais como cálcio, magnésio e ferro; inibição dos estágios iniciais do câncer de cólon; e diminuição da velocidade de absorção dos açúcares¹². Diante disso, sugere-se que tais efeitos podem estar associados à prevenção de diversas doenças crônicas não transmissíveis.

Com base nessas alegações, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver iogurte *diet* acrescido de concentrado proteico do soro de leite e doce de yacon e avaliar o efeito desses ingredientes na composição química e na aceitabilidade sensorial do produto, visando proporcionar ao consumidor uma nova opção de produto fermentado enriquecido com proteínas de alto valor biológico e fibras alimentares, especialmente FOS, e que apresente boas características sensoriais.

MATERIAL E MÉTODOS

Processamento do doce de yacon

O processamento do doce de yacon foi obtido a partir das raízes *in natura*, adquiridas no comércio local de Viçosa-MG. As raízes foram lavadas em água corrente, descascadas manualmente, picadas em cubos de 0,5 cm de espessura e imersas em solução aquosa contendo 0,1% de bissulfito de sódio por 15 minutos. Posteriormente, as raízes em cubos foram adicionadas de 4,5% (p/p) de edulcorante em pó, ciclamato de sódio e sacarina sódica, e submetidas à cocção até atingir 33 °Brix, obtendo um completo cozimento dos pedaços de yacon. O doce de yacon (DY) foi acondicionado em vasilhame inox e armazenado sob temperatura de refrigeração (4 °C) até a elaboração do iogurte.

Processamento do iogurte com CPS e doce de yacon

O preparo do iogurte foi conduzido segundo o delineamento inteiramente casualizado (DIC). Três concentrações de doce de yacon (8%, 15% e 25%) foram adicionadas aos iogurtes formulados a partir de leite parcialmente desnatado, CPS, edulcorantes ciclamato

de sódio e sacarina sódica e essência de salada de fruta (Tabela 1). Além dessas três formulações de iogurte, foi desenvolvida uma mistura-base diferenciada apenas pela ausência do doce de yacon (controle). A utilização de 1,5% de CPS nos iogurtes foi definida com base nos estudos conduzidos por Ribeiro¹³ e Bastiani⁴.

Tabela 1. Proporção dos ingredientes nas formulações de iogurtes diet adicionados de doce de yacon e de concentrado proteico do soro de leite (CPS)

Concentração dos ingredientes	Iogurtes			
	Controle	8 % DY*	15 % DY*	25 % DY*
Leite parcialmente desnatado	100	100	100	100
Doce de yacon	–	8,0	15,0	25,0
CPS	1,5	1,5	1,5	1,5
Edulcorante	1,1	1,1	1,1	1,1
Essência de salada de frutas	1,0	1,0	1,0	1,0

* DY – Doce de yacon.

As quatro formulações de iogurte foram processadas em escala piloto, utilizando iogurteira de aço inoxidável com capacidade para 20 L (Biasinox). No processamento do iogurte, o CPS foi previamente homogeneizado em 1 L de leite parcialmente desnatado utilizando um agitador mecânico (Omni Macro ES Digital Programmable Homogenizer) a 4.000 rpm por 10 minutos. Posteriormente, a mistura homogeneizada foi adicionada ao restante do leite e submetida a tratamento térmico a 83 °C por 30 minutos. Após aquecimento, a mistura foi resfriada até 42 °C e acrescida de 0,3% de fermento láctico contendo culturas de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* para iniciar o processo de fermentação. Esse processo ocorreu por aproximadamente 6 horas, até a mistura atingir acidez titulável de 0,70% a 0,75% de ácido láctico. Em seguida, procedeu-se ao resfriamento até a temperatura de 37 °C, para, então, realizar a quebra da massa, a adição dos edulcorantes e da essência de salada de fruta, até a completa homogeneização do iogurte. Ao final, adicionou-se o doce de yacon nas concentrações de 8%, 15% e 25% nos iogurtes, homogeneizando manualmente. Os produtos obtidos foram envasados em garrafas de polietileno com capacidade de 860 mL e armazenados a 4 °C.

Determinação da composição química centesimal e valor calórico dos iogurtes com CPS e doce de yacon

As amostras de iogurte foram liofilizadas em equipamento semi-industrial (modelo Super Modulyo,

marca Edwards), para posterior avaliação química. A umidade foi determinada calculando-se a diferença do peso antes e após a liofilização das amostras de iogurtes. Os teores de lipídios, proteínas e cinzas foram determinados seguindo as metodologias propostas pela AOAC¹⁴.

Os teores de FOS e de fibra alimentar total (somatório de fibras insolúveis, solúveis, FOS e inulina) foram determinados a partir dos resultados obtidos por Vasconcelos et al.¹⁵, que estudaram a composição centesimal de yacon adquirido na mesma origem do yacon utilizado neste trabalho.

FOS e inulina são consideradas fibras solúveis, mas, no yacon, esses carboidratos apresentam grau de polimerização (GP) entre 3 e 10 monômeros¹⁶, o que dificulta sua quantificação por métodos enzimático-gravimétricos, que são capazes de determinar apenas a fração solúvel da fibra com GP maior ou igual a 12¹⁷. Assim, para determinação de fibra alimentar total em alimentos contendo frutanos, deve-se somar a quantidade de fibras solúveis e insolúveis determinada pelo método enzimático-gravimétrico com outro método que detecta separadamente os monômeros de GP menor que 12¹⁵.

O conteúdo de fibra alimentar total e, conseqüentemente, FOS não foi utilizado no somatório da composição centesimal, visto que estes constituintes são considerados carboidratos.

O total de carboidratos de cada iogurte foi obtido pela diferença entre o total da amostra (100%) e os teores de umidade, proteínas, lipídios e cinzas. O valor calórico dos iogurtes desenvolvidos foi calculado utilizando-se os coeficientes de Atwater, que considera 4 kcal/g para proteínas e carboidratos e 9 kcal/g para lipídios¹⁸.

Aceitabilidade sensorial dos iogurtes com CPS e doce de yacon

A análise sensorial foi realizada por meio do teste de aceitação utilizando escala hedônica estruturada de nove pontos, variando de “desgostei muitíssimo” (nota 1) a “gostei muitíssimo” (nota 9)¹⁹ em um supermercado de Viçosa-MG. A aceitação global foi avaliada por 82 consumidores, na faixa etária de 15 a 60 anos, sendo 67% do sexo feminino. Amostras dos quatro iogurtes foram servidas monadicamente, em ordem aleatória, em copos descartáveis de 50 mL identificados com códigos de três dígitos, juntamente com a ficha de avaliação e um copo de água filtrada para cada consumidor.

Os resultados do teste de aceitação foram avaliados por análise estatística univariada (Análise de Variância –

Anova e regressão a 5% de probabilidade) utilizando modelo de delineamento em blocos casualizados (DBC), com 4 formulações de iogurte e 82 consumidores. Os resultados também foram avaliados por meio da técnica multivariada mapa de preferência interno (MPI), na qual os dados do teste de aceitação foram organizados numa matriz, com as amostras nas linhas e os consumidores nas colunas, e então submetidos a análise de componentes principais (ACP). Os resultados foram expressos em um gráfico de dispersão das amostras em relação aos dois primeiros componentes principais e representando os *loadings* (cargas) da ACP (correlações dos dados de cada consumidor com os dois primeiros componentes principais)²⁰. Os resultados do teste de aceitação foram analisados utilizando o programa estatístico SAS²¹ (Statistical Analysis System) versão 9.1, licenciado para a Universidade Federal de Viçosa.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Composição química centesimal e valor calórico dos iogurtes com CPS e doce de yacon

Os resultados das análises de composição química centesimal dos iogurtes estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Valores médios, desvio-padrão da composição centesimal e valor calórico dos iogurtes com CPS e doce de yacon

Componentes (%)	Iogurtes			
	Controle	8 % DY*	15 % DY*	25 % DY*
Umidade	87,8	87,8	87,7	87,6
Proteína	4,0 ± 0,06	3,1 ± 0,04	2,9 ± 0,04	2,9 ± 0,04
Cinzas	0,9 ± 0,010	0,9 ± 0,001	0,9 ± 0,005	0,8 ± 0,010
Lipídios	1,4 ± 0,12	1,2 ± 0,07	1,2 ± 0,06	1,0 ± 0,10
Carboidratos	5,9	7,0	7,2	7,7
Fibra alimentar total**	0,0	0,2	0,4	0,7
FOS**	0,0	0,1	0,2	0,3
Valor calórico***	52,0	51,4	51,4	51,3

*Doce de yacon.

**Calculado conforme concentração na polpa de yacon¹⁵.

*** Valor calórico (kcal/100 g), calculado a partir dos resultados de proteína, lipídios e carboidratos.

Desvio-padrão foi obtido a partir da média de duas repetições de cada iogurte.

Os iogurtes elaborados apresentaram elevado teor de umidade (superior a 87,6%), valor muito próximo ao encontrado em iogurte natural desnatado (89,2%), conforme apresentado pela Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (Taco)²².

Apesar da adição de raiz de yacon ter reduzido, em média, 26% o teor de proteína, todos os iogurtes

elaborados apresentaram teores deste nutriente igual ou superior a 2,9 g.100 g⁻¹, atendendo ao estabelecido pela legislação brasileira em vigor²³.

O teor de cinzas presente nos iogurtes foi semelhante à quantidade apresentada na Taco²² para iogurte natural, exceto para o iogurte com 25% de doce de yacon. Esse fato pode ser decorrente da baixa quantidade de cinzas presentes nas raízes de yacon, visto que sua matéria seca é composta basicamente de carboidratos^{15,24}. Assim, a adição de maior quantidade de doce de yacon permitiu substituir parte do teor de cinzas presentes no iogurte por carboidratos existentes em elevada quantidade no mesmo; comportamento semelhante foi observado em relação aos teores de proteínas e lipídios.

Observou-se redução média de 19% no teor de lipídios nos iogurtes com yacon, porém as formulações apresentaram teores entre a faixa de 0,6 a 2,9 g.100 g⁻¹, que os classificam como parcialmente desnatado, de acordo com a Resolução n. 5, de 13 de novembro de 2000, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento²³.

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa)²⁵, são considerados alimentos com alegação de propriedades funcionais ou de saúde aqueles capazes de fornecer 1,5 g de FOS ou de fibra alimentar total por porção do produto líquido. Sendo a porção de iogurte equivalente a 200 mL, apenas o iogurte com 25% de doce de yacon alcançou quantidade muito próxima ao recomendado pela legislação quanto ao teor de fibra alimentar total (1,4 g.200 mL⁻¹). Nos demais iogurtes, apesar de não poderem ser considerados fonte de FOS ou de fibras, a presença desses constituintes nos produtos desenvolvidos pode auxiliar na promoção da saúde.

A obtenção do doce de yacon, por meio do processo de cocção da raiz, permite o aumento da concentração dos componentes funcionais, FOS e inulina, visto que esses constituintes das fibras alimentares são estáveis a temperaturas superiores a 140 °C²⁶, e, além disso, o processo de cocção também permite a inativação de enzimas responsáveis pela degradação enzimática de FOS em glicose e frutose²⁴. Essas vantagens em relação ao processamento do doce de yacon indicam a possibilidade de uso do mesmo como ingrediente em uma ampla variedade de produtos, agregando diversos benefícios à saúde do consumidor.

A adição de doce de yacon nas formulações aumentou, em média, 24% o teor de carboidratos dos iogurtes (Tabela 2). Destaca-se que, diferentemente da maioria dos tubérculos que armazenam carboidratos

na forma de amido, o yacon armazena, principalmente, fruto-oligossacarídeos (FOS), açúcares que não podem ser digeridos pelas enzimas do trato digestório e são considerados compostos bioativos na alimentação humana²⁷.

Diante da variação dos componentes nutricionais dos iogurtes, foram ajustados modelos de regressão ao nível de 5% de probabilidade para prever o comportamento de proteínas, lipídios, fibra alimentar total e FOS em função da quantidade de doce de yacon utilizada no presente estudo (Tabela 3).

Tabela 3. Modelos de equação de regressão da variação do teor de proteínas, lipídios, fibra alimentar total e FOS em função da concentração de doce de yacon (X) e seus respectivos coeficientes de determinação (R²) e níveis de probabilidade (p)

Componente	Modelo de regressão	R ²	Prob > F
Proteínas	4,01 - 0,35X	0,68	0,0024
Lipídios	2,09 - 0,02X	0,94	0,0005
Fibra alimentar total	0,0293X	0,99	0,0062
FOS	0,0112X	0,99	<0,0001

X = doce de yacon.

Como aumento do teor de doce de yacon, observou-se redução linear da quantidade tanto de proteínas quanto de lipídios. Como as raízes de yacon possuem quantidades bastante reduzidas desses componentes, já era esperado que a adição do doce de yacon contribuísse para a redução da quantidade dos mesmos, e assim, quanto maior a adição do doce, maior também será a redução de proteínas e lipídios no iogurte. A quantidade de proteínas sofreu redução considerável do iogurte de controle para os iogurtes com doce de yacon. A adição de CPS permitiu que a quantidade presente no iogurte não ficasse aquém da recomendada pela legislação brasileira.

Em relação à quantidade de fibra alimentar total e FOS, observou-se o contrário, ou seja, com o aumento do doce de yacon no iogurte, tem-se o aumento linear com efeito positivo desses componentes, sugerindo que quantidades de doce de yacon maiores do que as estudadas neste trabalho podem tornar o iogurte um produto fonte de fibra alimentar total e/ou de FOS.

A adição de doce de yacon ao iogurte não apresentou diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade para teor de carboidratos, mas percebe-se que houve uma tendência em aumentar esse constituinte com o aumento da concentração do doce. Esse resultado sugere que, ao nível de probabilidade analisado, o aumento não mostrou-se relevante.

O acréscimo de diferentes concentrações de yacon nos iogurtes não alterou de forma considerável o valor calórico das formulações, que variou de 51,3 kcal a 51,4 kcal (Tabela 2), em comparação ao iogurte de controle (52,0 kcal), demonstrando pequena contribuição dos componentes calóricos do doce de yacon ao iogurte quando utilizados como ingredientes. No entanto, em comparação com alguns iogurtes saborizados, apresentados na Taco²², que variaram de 68 e 70 kcal.100 g⁻¹, houve redução do valor calórico dos iogurtes com doce de yacon, evidenciando mais uma vantagem da adição desse ingrediente ao produto.

Aceitabilidade dos iogurtes com CPS e doce de yacon

Todos os iogurtes avaliados apresentaram aceitação média alocadas entre os termos hedônicos “gostei extremamente” e “gostei ligeiramente”, sendo as notas referentes a esses termos dadas por 85,4%, 92,7%, 95,1% e 96,3% dos consumidores para os iogurtes de controle, com 8%, 15% e 25% de doce de yacon, respectivamente.

Considerando que neste estudo a aceitação foi significativamente (p < 0,05) diferente para as formulações de iogurte estudadas, foi gerado um modelo de regressão para prever a tendência da aceitação dos iogurtes em relação à quantidade de doce de yacon adicionada. Tal equação está descrita na Tabela 4.

Tabela 4. Resultados médios (n = 82), desvio-padrão e modelo de regressão da avaliação da aceitação sensorial dos iogurtes com e sem doce de yacon em função da quantidade de doce de yacon (X) e seus respectivos coeficiente de determinação (R²) e nível de probabilidade (p)

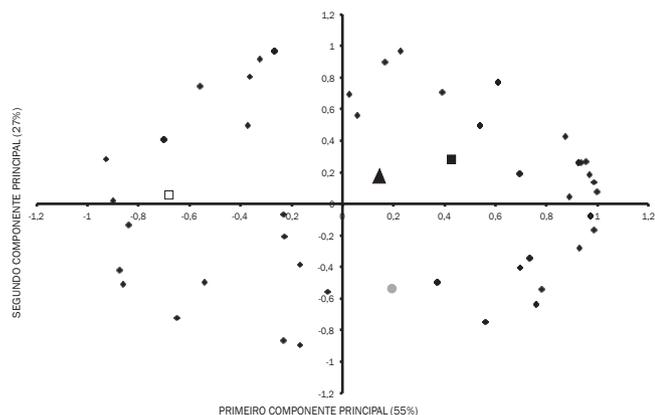
Iogurte	Média ± desvio-padrão	Modelo de regressão	R ²	Prob > F
Controle	7,0 ± 1,5			
8 % DY*	7,4 ± 1,3	7,08 + 0,02X	0,8817	0,0016
15 % DY*	7,5 ± 1,1			
25 % DY*	7,6 ± 1,2			

*DY = doce de yacon.

O modelo apresentou falta de ajuste não significativo, coeficiente de regressão significativo e alto coeficiente de determinação (R²), indicando que ele pode ser usado para prever o comportamento da aceitação dos iogurtes dentro do intervalo de variação estudado.

A partir do modelo gerado, observa-se o ajustamento de uma equação com efeito linear positivo, demonstrando que, quanto maior a concentração de doce de yacon nas formulações de iogurte, maior é sua aceitação.

Outra forma de visualizar os resultados do teste de aceitação foi por meio da construção do mapa de preferência interno (MPI), em que o primeiro componente principal explicou 55%, e o segundo, 27%, totalizando 82% da variância entre as amostras, sendo suficientes para discriminar as amostras quanto a aceitação (Figura 1).



□ controle; ● 8% doce de yacon; ▲ 15% de doce de yacon; ■ 25% de doce de yacon.

Figura 1. Mapa de Preferência Interno para as quatro formulações de iogurte com doce de yacon e concentrado proteico do soro de leite em relação à aceitação pelos consumidores

A separação espacial das formulações de iogurtes confirma a análise de variância, que demonstrou que existe diferença entre elas quanto a aceitação, havendo a formação de três grupos distintos, sendo um formado pelos iogurtes com 15% e 25% de doce de yacon, e os outros dois, pelo iogurte com 8% de doce de yacon e o iogurte de controle (Figura 1).

Cada ponto no gráfico representa a correlação entre os dados de aceitação de um consumidor e os dois primeiros componentes principais. A correlação dos consumidores com pelo menos um dos componentes indica diferença na aceitação dos iogurtes.

No MPI, os consumidores estão localizados próximos às amostras de que eles mais gostaram. Desta forma, as amostras com 15% e 25% de doce de yacon foram as mais aceitas pelos consumidores, pois correlacionaram positivamente com o primeiro ou com o segundo componente principal. Corroborando a equação de regressão, quanto maior a adição de doce de yacon, maior foi a aceitação do produto.

Esses resultados são bastante interessantes, pois sugerem que a adição do doce de yacon e do concentrado proteico de soro de leite ao iogurte conferiu ao produto características sensoriais agradáveis ao consumidor.

Qualidades sensoriais agregadas à funcionalidade do produto podem ter efeito bastante promissor no mercado, pois atendem à demanda do consumidor atual por produtos desse tipo.

CONCLUSÃO

O concentrado proteico do soro de leite e o doce de yacon propiciaram o desenvolvimento de iogurtes com baixo valor energético, reduzido teor de carboidratos e contendo fibras alimentares, em especial, FOS, além de características sensoriais agradáveis ao consumidor.

A concentração de doce de yacon apresentou-se diretamente relacionada com a aceitação dos iogurtes, visto que, quanto maior a adição, maior foi a aceitação dos mesmos pelos consumidores.

Os iogurtes desenvolvidos não apresentaram adequação da quantidade de fibras ou FOS para serem considerados alimentos com alegação funcional. No entanto, devido a sua aceitação, sugere-se, em estudos futuros, a adição de maior quantidade do doce de yacon, ou mesmo desse produto de forma mais concentrada para que se alcance a quantidade recomendada desses componentes funcionais.

Assim, conclui-se com esse estudo que a adição de CPS e doce de yacon constituem boa alternativa de ingredientes funcionais que podem ser adicionados ao iogurte.

REFERÊNCIAS

1. Pinto ALD, Paiva CL. Desenvolvimento de uma massa funcional pronta para tortas utilizando o método de desdobramento da função qualidade (QFD). *Ciênc Tecnol Aliment*, Campinas. 2010;30(1):36-43.
2. Ferreira CLLE, Malta HL, Dias AS, Guimarães A, Jacob FE, Cunha RM, et al. Verificação da qualidade físico-química e microbiológica de alguns iogurtes vendidos na região de Viçosa. *Rev Inst Latic Cândido Tostes*, Juiz de Fora. 2001;56 (321):152-8.
3. Krolow ACR. Iogurte integral sabor café. Comunicado técnico. Pelotas, RS, 2008. [Acesso 9 fev 2011]. Disponível em: [http://www.cpact.embrapa.br/publicacoes/download/comunicados/comunicado_193.pdf].
4. Bastiani MID. Iogurte adicionado de concentrado proteico de soro de leite e farinha de linhaça: desenvolvimento, qualidade nutricional e sensorial. [tese de doutorado]. Viçosa (MG): Universidade Federal de Viçosa; 2009.
5. Antunes AEC. Influência do concentrado proteico do soro de leite e de culturas probióticas nas propriedades de iogurtes naturais desnatados. [tese de doutorado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2004.
6. Milo-Ohr L. Nutraceuticals & functional foods. *Food Technol*. 2002;56(10):67-70.

7. Sodini I, Montell, J, Tong PS. Physical and rheological properties of yogurt fortified with various whey protein concentrates. *J Sci Food Agric*. 2005;85:853-9.
8. Bertolami MC. Evaluation of effects to new fermented milk products on primary hypercholesterolemia. *Eur J Clin Nutr*. 1999;53:97-110.
9. Buttriss J. Nutritional properties of fermented milk products. *Int J Dairy Tech*. 1997;50(1):21-7.
10. Seminario J, Valderrama M, Manrique I. El yacon: fundamentos para el aprovechamiento de un recurso promisorio. Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima: Universidad Nacional de Cajamarca, Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación; 2003.
11. Lattimer JM, Haub MD. Effects of dietary fiber and its components on metabolic health. *Nutrients*. 2010;2:1266-89.
12. Quinteros ETT. Produção com tratamento enzimático e avaliação do suco de yacon. [dissertação de mestrado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2000.
13. Ribeiro MM. Desenvolvimento e caracterização sensorial de iogurte *diet* sabor morango adicionado de concentrado proteico de soro. [dissertação de mestrado]. Viçosa (MG): Universidade Federal de Viçosa; 2008.
14. AOAC – Association of Official Analytical Chemist's. Official Methods of Analysis of AOAC International. 16. ed. Arlington; 1997.
15. Vasconcelos CM, Silva CO, Teixeira LJQ, Chaves JBP, Martino HSD. Determinação da fração da fibra alimentar solúvel em raiz e farinha de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) pelo método enzimático-gravimétrico e cromatografia líquida de alta eficiência. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2010;69(2):188-93.
16. Ohyama T, Ito O, Yasuyoshi S, Iharashi T, Minamizawa K, Kubota M, et al. Composition of storage carbohydrate in tubers of yacon (*Polymnia sonchifolia*). *Soil Sci Plant Nutr*. 1990;36(1):167-71.
17. Filisetti TMC. Fibra alimentar: definições, componentes e métodos analíticos. In: Silva SMCS, Mura JDP. Tratado de alimentação, nutrição e dietoterapia. São Paulo: Roca; 2007. p. 179-98.
18. Torres EAFS, Campos NC, Duarte M, Garbelotti ML, Philippi ST, Rodrigues RSM. Composição centesimal e valor calórico de alimentos de origem animal. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2000;20(2):145-50.
19. Stone H, Sidel JL. Descriptive analysis. In: Stone H, Sidel JL. Sensory evaluation practices. 3. ed. Elsevier Academic Press; 1985.
20. Reis RC, Regazzi AJ, Carneiro JCS, Minim VPRS. Mapa de preferência. In: Minim VPR. Análise sensorial: estudo com consumidores. Viçosa: UFV; 2006.
21. Statistical Analysis System – SAS. User's procedures guide. Version 9.1. Cary: SAS Institute; 1989.
22. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO. Campinas: Nepa-Unicamp. Versão 2, 2006. [Acesso 10 fev 2011]. Disponível em: [<http://www.unicamp.br/nepa/taco/tabela.php?ativo=tabela>].
23. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolução n. 5, de 13 de novembro de 2000. Regulamento técnico de identidade e qualidade de leites fermentados. [Acesso 20 mar 2011] Disponível em: [http://www.ngetecno.com.br/legislacao/leite_pig_leite_fermentado.htm].
24. Graefe S, Hermann M, Manrique I, Golombek S, Buerkert A. Effects of post-harvest treatments on the carbohydrate composition of yacon roots in the Peruvian Andes. *Field Crop Res*. 2004;86:157-65.
25. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e/ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. Atualizado em 11 de janeiro de 2005. IX – Lista das alegações aprovadas. [Acesso 23 mar 2011] Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm].
26. Moura CP. Aplicação de redes neuronais para a predição e otimização do processo de secagem de yacon (*Polymnia sonchifolia*) com pré-tratamento osmótico. [dissertação de mestrado]. Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná; 2004.
27. Castillo-Alafaro ME, Vidal-Melgarejo SA. El yacón: una nueva alternativa en la prevención y el tratamiento de la salud. 2005. [Acesso 2 fev 2011]. Disponível em: http://infoagro.net/es/apps/news/record_view.cfm?vsys=a5&id=8641.

Leite fermentado caprino sabor umbu: elaboração e aceitabilidade

Fermented umbu-flavored goat milk: elaboration and acceptance

RIALA6/1444

Rita Vieira GARCIA^{1*}, Antônio Eustáquio Rezende TRAVASSOS²

*Endereço para correspondência: ¹Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Baiano, Campus Santa Inês, BA, BR 420, Km 2,5, Rodovia Santa Inês-Ubaira, CEP 45320-000. E-mail: rvieiragarcia@gmail.com

²Centro de Tecnologia, Programa Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, UFPB

Recebido: 11.05.2011 - Aceito para publicação: 14.02.2012

RESUMO

Neste trabalho, foi desenvolvido um leite caprino fermentado adicionado de doce de umbu, e sua aceitabilidade foi avaliada para pesquisar alternativas tecnológicas de aproveitamento do leite caprino e do umbu. As etapas da elaboração consistiram em medição do leite, adição de leite em pó e amido modificado, tratamento térmico, resfriamento, inoculação da cultura “starter”, fermentação, resfriamento, quebra da coagulada e adição do doce de umbu. Foram elaborados três produtos diferentes nos teores do doce de umbu: Amostra A, 25%; Amostra B, 27%; e Amostra C, 30%. Realizou-se o teste sensorial com potenciais consumidores, servindo-se amostras aleatoriamente, de forma monádica, com o mesmo número de vezes na mesma ordem de apresentação. Os atributos obtiveram boas notas, correspondendo na escala hedônica a “gostei ligeiramente” e “gostei moderadamente”, cujas avaliações não diferiram significativamente entre as amostras. A variação de 2,5% no teor de doce de umbu não afetou as propriedades sensoriais das amostras. Os leites fermentados de cabra mostraram estar em conformidade com a legislação brasileira para produto elaborado com leite de vaca, e, portanto, esses produtos constituem boas opções para a indústria de laticínios. Contudo, estudos adicionais são necessários para obter produtos com melhores características sensoriais.

Palavras-chaves. análise sensorial, leite de cabra fermentado, frutas nativas, umbu.

ABSTRACT

In this study, a fermented umbu-flavored goat milk was developed, and its acceptance was evaluated aiming at achieving an alternative for making use of goat milk and umbu marmalade. The fermented milk production stages consisted of milk measuring, addition of powdered milk and modified starch, thermal treatment, cooling, inoculation into starter culture, fermentation, cooling, curdled milk split, and umbu marmalade addition. Three different products were made with different quantities of umbu: Sample A, 25%; Sample B, 27%; and Sample C, 30%. Sensorial characteristics were assessed by potential consumers, and the samples were randomly served, in a monadic form, the same number of times, in the same presentation order. The attributes received good rankings, which corresponded to the hedonic scale of “I slightly liked it” and “I liked it moderately”. No significant difference among the samples acceptance was found. The variation of 2.5% in the umbu marmalade contents did not affect the sensorial qualities of fermented milk. The fermented goat milks were in compliance with the Brazilian legislation for products made from cow milk. Goat milk showed to be a good option for dairy industries; however, further studies should be performed to get products with improved sensorial characteristics.

Keywords. sensory analysis, fermented goat milk, native fruits, umbu.

INTRODUÇÃO

O mercado dispõe de uma grande variedade de leites fermentados com adições de uma ou várias frutas, destacando-se o iogurte, que é o mais conhecido, de maior aceitação¹ e encontrado em diversas formas e nomes². O iogurte ganhou maior aceitação a partir de 1960, com a adição de frutas para atenuar o sabor ácido³, pois nem todos os consumidores gostam do produto natural⁴.

No Brasil, o consumo de iogurte é pequeno (3,0 kg/ano por pessoa) em relação com a França, o Uruguai e a Argentina (7 a 19 kg/ano)⁵, sendo o consumo urbano 300% superior ao rural⁶. A fabricação e o consumo de leites fermentados cresceram consideravelmente nos últimos anos devido ao apelo de alimento funcional⁷.

Os leites fermentados são produzidos mediante ação de um ou vários cultivos: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium sp.*, *Streptococcus salivarius subsp thermophilus* e/ou outras bactérias acidoláticas que contribuem com características do produto⁸. Os produtos feitos com essas bactérias apresentam grande aceitação, excelente valor nutritivo e constituem veículos em potencial para probióticos⁹.

No desenvolvimento ou melhoramento de produtos é crucial o estudo da aceitação pelos consumidores. Os testes afetivos requerem uma equipe numerosa de participantes e que represente a população de consumidores atuais e/ou potenciais do produto. Um dos métodos mais empregados para medir a aceitação é a escala hedônica, na qual o consumidor expressa sua opinião numa escala que varia gradativamente com base nos termos “gosta” e “desgosta”¹⁰. A escala hedônica estruturada de nove pontos é provavelmente mais utilizada devido a confiabilidade, validade dos resultados e simplicidade em ser utilizada pelos provadores¹¹. Os valores hedônicos são avaliados mediante análise de variância ou distribuição de frequência.

Estudos de análise sensorial revelam que os produtos com adições de frutas são bem aceitos. Foram bem apreciados nos testes de avaliação sensorial produtos sabor araticum, cagaita e mangaba¹²; araticum, buriti, cagaita, jatobá, mangaba e pequi^{13,14}; e café¹⁵. No Brasil, o sabor mais consumido é o de morango, devido principalmente à cor da fruta¹⁶.

O leite de cabra e o umbu são produtos tradicionais do Nordeste brasileiro. O leite caprino é produzido em pequena escala e, muitas vezes, processado em condições artesanais no próprio capril. O leite

caprino é recomendado na dieta infantil, de idosos e nos casos de alergia ao leite de vaca¹⁷. No entanto, seu sabor e odor característicos comprometem a aceitabilidade¹⁸. O umbu é um fruto de sabor peculiar, pouco explorado comercialmente e apresenta importância econômica devido a seu uso na forma de sucos, licores, umbuzada, doces e ao consumo da fruta *in natura*¹⁹.

Considerando-se o interesse dos consumidores por alimentos saudáveis, nutritivos e saborosos, bem como a importância dos produtos lácteos na nutrição humana, e visando a encontrar alternativas tecnológicas que proporcionem o aproveitamento dos frutos de umbu e o emprego do leite de cabra – o que pode gerar aumento do consumo e agregação de valores dessas matérias-primas, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um leite fermentado caprino adicionado de doce de umbu e avaliar sua aceitabilidade.

MATERIAL E MÉTODOS

Matéria-prima e ingredientes

Para o processamento do leite fermentado caprino, utilizou-se uma cultura láctea liofilizada probiótica, contendo *Lc. acidophilus*, *Bifidobacterium sp.* e *St. thermophilus da Chr.* Hansen, leite de cabra em pó (Caprilac), amido modificado de mandioca (Gemacon) e frutos do umbuzeiro, com grau de maturação de “de vez” a maduro, adquiridos em feiras livres de João Pessoa-PB.

Preparo do doce de umbu

Os frutos de umbu foram selecionados, lavados e higienizados com solução de hipoclorito de sódio (100 ppm/10 min) e, em seguida, despulpados. O doce foi elaborado a partir da cocção da mistura da polpa de umbu e açúcar cristal, numa proporção de 4:6, até atingir 56 °Brix. Em seguida, o produto foi embalado em recipiente de vidro, tampado e armazenado a temperatura de ± 5 °C.

Análises físico-químicas do leite e dos produtos elaborados

As análises físico-químicas das amostras de leite e dos leites fermentados foram realizadas conforme normas analíticas²⁰. A acidez titulável foi determinada por titulação com NaOH 1/9N, com os resultados expressos em ácido láctico; proteína, pelo método de Kjeldahl, usando-se o fator de correção 6,38; gordura, pelo método de Gerber; cinzas, por incineração em

forno mufla a 550 °C; lactose, por diferença e extrato seco total mediante a diferença de 100; e o valor do teor de umidade, determinado por secagem em estufa. O experimento foi repetido três vezes, e as análises foram realizadas em triplicata.

Elaboração dos leites fermentados

A elaboração do leite fermentado consistiu na medição do leite caprino, adição de 2% de leite caprino em pó e 1% de amido modificado, calculados em relação ao volume do leite a ser processado. A mistura foi submetida a tratamento térmico (90 °C/10 min), resfriamento a 43 °C e inoculação da cultura “starter” à taxa de 0,08% (p/v). O leite inoculado foi incubado a 42 ± 1 °C, em sistema de banho-maria, até atingir pH em torno de 4,6 e 0,60% de acidez, o que ocorria aproximadamente após quatro horas de fermentação. O produto foi resfriado até 10 °C e, em seguida, armazenado sob refrigeração. Após oito horas, procedeu-se à quebra da coalhada, agitando a massa de forma mecânica e adicionando o doce de umbu também refrigerado. Foram elaborados três produtos diferentes quanto aos teores do doce adicionado: Amostra A, 25%; Amostra B, 27%; e Amostra C, 30%. Os produtos foram envasados e armazenados à temperatura de 6 °C.

Análise sensorial

O teste de aceitação foi realizado no laboratório de Análise Sensorial do Centro de Tecnologia, da Universidade Federal da Paraíba, após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (HULW-UFPB, Protocolo 325/10), no período da manhã, das 09h00 às 11h00, com potenciais consumidores. O painel sensorial foi selecionado entre estudantes e servidores da UFPB, por meio de um questionário com base na frequência de consumo do produto, na disponibilidade e no interesse em participar do teste sensorial.

Os produtos foram apresentados aos provadores aleatoriamente, de forma monádica, com todas as amostras aparecendo o mesmo número de vezes, numa mesma ordem de apresentação. As amostras foram analisadas cinco dias após a elaboração e foram servidas, em temperatura aproximada de 8 °C, em copos descartáveis codificados com três dígitos e acompanhadas de água mineral, conforme recomendado por Faria e Yotsuyanagi²¹.

Os provadores receberam as amostras juntamente com uma escala hedônica de nove pontos (9 = gostei

muitíssimo; 1 = desgostei muitíssimo) para analisar os atributos aparência, cor, aroma, consistência, sabor e avaliação global; e uma escala de cinco pontos (5 = compraria; 1 = jamais compraria) para avaliar a intenção de compra.

Análise estatística

Os resultados foram avaliados por análise de variância (Anova), e as médias diferentes foram comparadas ao teste de Tukey, $p < 0,05$, conforme Stone e Sidel¹¹ e Meilgaard et al.²², usando o programa SPSS for Windows Evaluation Version – 14.0²³, e a intenção de compra, por meio da frequência das notas atribuídas pelos provadores.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O leite caprino empregado na elaboração das amostras de leite fermentado apresentou os seguintes valores médios nas características físico-químicas: pH 6,39; acidez 0,15%; lipídeos 2,55%; proteína 2,84%; lactose 4,78%; cinzas 0,64%; e 10,34% de extrato seco total.

Os valores da composição química do leite de cabra foram considerados normais conforme os requisitos mínimos de qualidade do leite de cabra para consumo humano²⁴, podendo ser usado no processamento do leite fermentado, exceto quanto ao teor de cinzas, que foi um pouco menor.

Segundo Ferreira²⁵, as modificações na composição do leite, bem como o emprego de leite integral, desnatado, parcialmente desnatado, fortificado (com leite em pó, soro em pó) ou modificado (deslactosado), podem atender aos aspectos econômicos e também de aceitação. Nos ensaios preliminares, as amostras de leite fermentado apresentaram consistência semilíquida, com característica bebível. Então, foram selecionadas condições de ensaio para encontrar um produto de consistência parecida ao produto elaborado com leite de vaca, que é mais conhecido pelos consumidores, optando-se pela adição de 2% de leite caprino em pó e 1% de amido modificado.

Na Tabela 1, estão representados os resultados das análises físico-químicas das amostras dos leites fermentados caprino sabor umbu.

Tabela 1. Valores médios das análises físico-químicas das amostras de leite fermentado caprino sabor umbu

Amostras	Proteína (g/100 g)	Gordura (g/100 g)	Acidez (g/100 g)
A	3,51 ± 0,14 ^a	2,9 ± 0,09 ^a	0,86 ± 0,01 ^a
B	3,29 ± 0,18 ^a	3,0 ± 0,03 ^a	0,94 ± 0,00 ^a
C	3,23 ± 0,05 ^a	3,0 ± 0,00 ^a	0,92 ± 0,02 ^a

Valores com letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença estatística ($p < 0,05$) entre si

Os resultados das análises físico-químicas das amostras estão de acordo com os padrões estabelecidos pela legislação para o produto elaborado com leite de vaca, que estabelece 3,0% a 5,9% de gordura (produto integral), no mínimo 2,9% de proteínas e 0,6% a 2,0% de acidez, sendo que os teores de gordura e proteína poderão ser inferiores nos produtos com adições⁸.

O painel sensorial foi formado por 42 provadores, sendo 22 homens e 20 mulheres, na faixa etária de 18 a 30 anos, 85,71% universitários e 14,29% pós-graduandos. A grande maioria (90,48%) dos provadores consome leite fermentado pelo menos uma vez por semana. A maioria (71,43%) prefere o produto adicionado de sabores ao produto natural, sendo os preferidos os sabores morango, ameixa e frutas vermelhas. Os provadores têm por hábito consumir leite fermentado integral de leite de vaca no café da manhã, no lanche e como sobremesa.

Os valores médios das notas atribuídas pelos provadores no teste de aceitabilidade do leite fermentado caprino sabor umbu estão na Tabela 2.

Os atributos sensoriais obtiveram boa aceitação, registrando-se valores médios entre 6,07 a 7,17, o que corresponde na escala hedônica a “gostei ligeiramente” e “gostei moderadamente”. Conforme Anzaldúa-Morale²⁶, a opinião dos provadores deve ser analisada considerando-se os valores médios que resultam dos outros degustadores, por tratar-se de uma análise subjetiva em que cada consumidor apresenta sensações diferentes ao provar um alimento.

Nos atributos sensoriais analisados, não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras, podendo-se afirmar que os teores de 25%, 27% e 30% do doce de umbu nas formulações não afetaram as propriedades sensoriais do

leite fermentado. Os atributos aparência, cor e consistência alcançaram os mais altos valores, o que representa um resultado positivo. A primeira impressão do consumidor sobre os alimentos está relacionada com a aparência, sendo rejeitados os produtos de aparência ruim²⁷. Viscosidade e consistência também podem determinar a aceitação por parte dos consumidores²⁸.

As frutas melhoram o valor nutricional do produto e conferem características sensoriais peculiares e intensas. Os atributos aroma e sabor deste trabalho alcançaram boa aceitação, possivelmente relacionada à contribuição do doce de umbu, uma vez que as maiores pontuações do aroma (6,90) e sabor (6,35) foram para o produto contendo maior teor do doce, mesmo não havendo diferença ($p < 0,05$) entre as amostras. A presença do doce de umbu pode ter mascarado as características sensoriais do leite caprino. Entretanto, alguns provadores declararam perceber um gosto estranho ao engolir o produto, e outros sentiram um sabor salgado.

De maneira geral, as amostras do leite fermentado com adições de doce de umbu obtiveram boa aceitação, podendo ser uma interessante opção para a indústria de laticínio. Sobre os leites fermentados com adições de frutas, Oliveira et al.¹⁴ encontraram boa aceitação nos produtos adicionados de polpa de araticum. Rocha et al.¹² relataram que iogurtes de leite bubalino adicionados de frutos do cerrado alcançaram boa aceitação. Bakirci et al.²⁹ concluíram que os produtos adicionados de purê de banana foram preferidos em relação ao de controle.

Geralmente, os estudos apontam que produtos de leite de cabra apresentam menor aceitabilidade que os de leite bovino. Estudando leite fermentado caprino natural, Martin-Diana et al.³⁰ encontraram menor aceitação que o produto bovino devido a sua textura líquida e ao sabor não típico de iogurte. Rojas-Castro et al.³¹ analisaram a aceitação de iogurtes elaborados com uma mistura de leite vaca e cabra e constataram menor aceitação para o produto que continha 100% de leite caprino.

O aroma e sabor característicos nos produtos caprinos parecem relacionar-se à concentração de ácidos graxos de cadeia curta³² e aos compostos liberados na

Tabela 2. Valores médios das propriedades sensoriais das amostras de leite fermentado caprino sabor umbu

Amostras	Aparência	Cor	Aroma	Consistência	Sabor
A	7,17 ± 1,23 ^a	6,93 ± 1,33 ^a	6,57 ± 1,33 ^a	6,81 ± 1,31 ^a	6,07 ± 1,61 ^a
B	7,00 ± 1,29 ^a	7,09 ± 1,30 ^a	6,69 ± 1,33 ^a	7,02 ± 1,30 ^a	6,19 ± 1,37 ^a
C	7,09 ± 1,19 ^a	7,12 ± 1,31 ^a	6,90 ± 1,26 ^a	7,14 ± 1,32 ^a	6,35 ± 1,64 ^a

Valores com letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença estatística ($p < 0,05$) entre si

fermentação, como o ácido láctico, acetaldeído, diacetil, ácido acético e outras substâncias voláteis³³. Além disso, o sabor também é afetado por alterações como proteólise, lipólise, glicólise, liberação de compostos nitrogenados não proteicos, aminoácidos livres, ácidos graxos livres e amônia³⁴.

O leite de cabra não deveria ser rejeitado pelo seu odor, atribuído aos ácidos graxos de cadeia curta e média, pois, quando adequadamente manipulado, é de difícil distinção do leite bovino. Os problemas com odor ocorrem quando a membrana dos glóbulos de gordura se rompe, liberando os ácidos que podem ser atacados por lipases³⁵. Outro aspecto diz respeito aos estábulos malcheirosos e alimentos odoríferos que podem intensificar o gosto típico do leite caprino, tornando-o mais forte e indesejável³⁶.

Em relação à intenção de compra, 30,95%, 35,71% e 42,86% dos consumidores optaram pelas notas 4 (provavelmente compraria) e 5 (compraria) nas amostras A, B e C respectivamente, representando que mais de um terço dos provadores podem adquirir os produtos se estiverem no mercado. Quanto à sentença “talvez comprasse”, 40,48%, 40,48% e 23,81% dos provadores escolheram os produtos A, B e C, respectivamente, o que pode denotar certa dúvida por parte dos provadores ao optar por aquisição dos produtos, e isso provavelmente está relacionado ao hábito de consumo de produtos lácteos bovinos.

CONCLUSÃO

Os resultados da caracterização dos leites fermentados de cabra estão em conformidade com os padrões estabelecidos pela legislação brasileira para iogurte elaborado com leite de vaca. Os resultados do teste sensorial mostraram boas notas nos atributos sensoriais, o que constitui boa aceitação junto ao consumidor. Entende-se, contudo, que o produto requer mais pesquisas para atingir melhores características sensoriais, visando a obter maiores pontuações na intenção de compra e se tornar uma opção viável para o setor lácteo.

REFERÊNCIAS

1. Coisson JD, Travaglia F, Piana G, Capasso M, Arloio M. Euterpe oleracea juice as a functional pigment for yogurt. *Food Res Int*. 2005;38:893-7.
2. Tarakci Z, Erdogan K. Physical, chemical, microbiological and sensory characteristics of some fruit-flavored yogurt. *YYU Vet Derg*. 2003;14:10-4.
3. Moreira SR, Schwan RF, Carvalho EP, Ferreira C. Análise microbiológica e química de iogurtes comercializados em Lavras-MG. *Ciênc Tecnol Aliment*. 1999;19(1):147-52.
4. Vedamuthu ER. The yogurt story: past, present and future. *Dairy Food Environ Sanit*; 1991.
5. Santana LRR, Santos LCS, Natalicio MA, Mondragon-Bernal OL, Elias EM, et al. Perfil sensorial de iogurte light, sabor pêssego. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2006;26(3):619-25.
6. Schlindwein MM, Kassouf AL. Mudanças no padrão de consumo de alimentos tempo-intensivos e de alimentos poupadores de tempo, por região do Brasil. *In: Silveira FG, et al. (org.). Gasto e consumo das famílias brasileiras contemporâneas*. Brasília: IPEA; 2007. p. 423-62.
7. Salgado JM, Almeida MA. Mercado de alimentos funcionais: desafios e tendências. São Paulo: Soc Bras Alimentos Funcionais. [Acesso 2010 jan 29]. Disponível em: [http://www.sba.org.br/artigos_cientificos.htm].
8. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolução n. 5, de 13 de novembro de 2000. Regulamento técnico de identidade e qualidade de leites fermentados. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 2 jan 2001, Seção I, p. 19-22.
9. Antunes AEC, Marasca ETG, Moreno I, Dourado FM, Rodrigues LG, Lerayer ALS. Desenvolvimento de buttermilk probiótico. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2007;27(1):83-90.
10. Chaves JBP, Sprosser RL. Práticas de laboratório de análise sensorial de alimentos e bebidas. Viçosa: UFV; 2001.
11. Stone HS, Sidel JL. Sensory evaluation practices. San Diego: Academic Press; 1993.
12. Rocha C, Siqueira MID, Cobucci RMA, Silva FD, Peixoto KL, Santana LVG. Iogurte de leite de búfala sabor frutos do cerrado. *Bol CEPPA*. 2004;22(1):97-106.
13. Rocha C, Cobucci MA, Maitan VR, Silva OC. Elaboração e avaliação de iogurte sabor frutos do cerrado. *Bol CEPPA*. 2008;26(2):255-66.
14. Oliveira KAM, Ribeiro LS, Oliveira GV, Pereira JMATK, Mendonça RCS, Assumpção CF. Desenvolvimento de formulação de iogurte de araticum e estudo da aceitação sensorial. *Rev Alim Nutr*. 2008;9(3):277-81.
15. Krolow ACR. Iogurte integral sabor café. Comunicado 193. Pelotas: Embrapa Clima Temperado; 2008.
16. Moraes PCBT. Avaliação de iogurtes líquidos comerciais sabor morango: estudo de consumidor e perfil sensorial. [dissertação de mestrado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2004.
17. Alférez MJM, López-Aliaga I, Nestares T, Diaz-Castro J, Barrionuevo M, Ross PB, et al. Dietary goat milk improves iron bioavailability in rats with induced ferropenic anemia in comparison with cow milk. *J Dairy Res*. 2003;70:181-7.
18. Luiz MTB, Drunkler DA, Henn R, Fett R. Leite de cabra: hipoalergenicidade, composição química e aspectos nutricionais. *Rev ILCT*. 1999;54:23-31.
19. Cavalcanti NB, Resende GM, Brito LT. Processamento do fruto do umbuzeiro (*Spondia tuberosa* Arruda Câmara). *Rev Ciênc Agrotec*. 2000;24:252-9.

20. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 68, de 12 de dezembro de 2006. Métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 14 dez 2006, Seção 1, p. 8.
21. Faria EV, Yotsuyanagi K. Técnicas de análise sensorial. Campinas: ITAL; 2002.
22. Meilgaard M, Civille GV, Carr BT. Sensory evaluation techniques. Florida: CRC Press; 1987.
23. SPSS. INC. 14.0 for Windows Evaluation Version [Computer program]; LEAD Technologies SPSS Inc., 2005.
24. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 37, de 31 de outubro de 2000. Regulamento técnico de identidade e qualidade de leite de cabra. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 8 nov 2000, Seção 1, p. 23.
25. Ferreira CLLF. Produtos lácteos fermentados: aspectos bioquímicos e tecnológicos. Caderno Didático 43. Viçosa: UFV; 2005.
26. Anzaldúa-Morales A. La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica. Zaragoza: Acribia; 1994.
27. Sivieri K, Oliveira MN. Avaliação da vida-de-prateleira de bebidas lácteas preparadas com "fat replacers" (Litesse e Dairy-lo). *Rev Ciênc Tecnol Aliment*. 2002;22(1):24-31.
28. Penna ALB, Oliveira MN, Baruffaldi R. Análise de consistência de iogurte: correlação entre medida sensorial e instrumental. *Ciênc Tecnol Aliment*. 1997;17(2):98-101.
29. Bakirci I, Kavaz A. An investigation of some properties of banana yogurts made with commercial ABT-2 starter culture during storage. *Int J Dairy Technol*. 2008;61(3):270-6.
30. Martín-Diana AB, James C, Peláez C, Requena T. Development of a fermented goat's milk containing probiotic bacteria. *Int Dairy J*. 2003;13:827-33.
31. Rojas-Castro WN, Chacón-Villalobos A, Pineda-Castro ML. Características del yogurt batido de fresa derivadas de diferentes proporciones de leche de vaca y cabra. *Agronomía Mesoamericana*. 2007;18(2):221-37.
32. Park YW. Proteolysis and lipolysis of goat milk cheese. *J Dairy Sci*. 2001;84:84-92.
33. Tamime AY, Robinson RK. Yogur: ciencia y tecnología. Zaragoza: Acribia; 1991.
34. Haenlein GFW. Milk and meat products. Nutritional value of dairy products of ewe and goat milk. 2002. [acesso: 2009 ago 02]. Disponível em: [http://goatconnection.com/articles/publish/article_74.shtml].
35. Villalobos AC. Aspectos nutricionales de la leche de cabra (*Capra hircus*) y sus variaciones en el proceso agroindustrial. *Agron Mesoam*. 2005;16(2):239-52.
36. Le Jaouen JC. Milking and the technology of milk and milk products. In: Gall C. Goat production. Londres: Academic Press; 1981. p. 345-77.

Análise descritiva quantitativa e aceitação sensorial de iogurte obtido pela mistura de leite caprino e bubalino

Quantitative and descriptive analysis and sensory acceptance of yoghurt made from caprine and bubaline milk mixtures

RIALA6/1445

Maria de Fátima BEZERRA, Roberta Targino Pinto CORREIA

Endereço para correspondência: Laboratório de Compostos Bioativos e Tecnologia Animal (LABTA), Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Campus Lagoa Nova, Natal, RN, Brasil, CEP 59075-180. Tel.: + 55 (84) 3215-3753, fax: (84) 3206-6507. Email: roberta@eq.ufrn.br

Recebido: 07.06.2011 - Aceito para publicação: 10.01.2012

RESUMO

O presente trabalho trata da avaliação sensorial de formulações de iogurte de sabor morango elaboradas com misturas dos leites bubalino e caprino, por meio de análise descritiva quantitativa (ADQ) em associação ao teste de aceitação por escala hedônica. Foram avaliadas 5 amostras contendo diferentes proporções de leite caprino e bubalino: C (100% leite de cabra), 7C3B (70% leite de cabra e 30% leite de búfala), 5C5B (50% leite de cabra e 50% leite de búfala), 3C7B (30% leite de cabra e 70% leite de búfala) e B (100% leite de búfala). Os resultados da ADQ mostraram que o iogurte produzido somente com leite bubalino (B) apresentou-se mais firme e ácido do que os demais. Todas as amostras desenvolvidas pela mistura dos dois tipos de leites obtiveram escores sensoriais de aceitação semelhantes. Esses dados mostraram que a adição do leite de búfala ao leite caprino pode ser uma estratégia eficiente na elaboração de um novo produto com consistência mais adequada e sabor agradável.

Palavras-chave. iogurte, leite caprino, leite bubalino, análise descritiva quantitativa, teste de aceitação.

ABSTRACT

This research deals with sensory evaluation of a strawberry-flavored yoghurt made from caprine, bubaline and caprine-bubaline milk mixtures by using the quantitative and descriptive analysis (QDA) and the sensory acceptance test. 5 experimental milk groups were assessed: C (100% caprine milk), 7C3B (70% caprine milk and 30% bubaline milk), 5C5B (50% caprine milk and 50% bubaline milk), 3C7B (30% caprine milk and 70% bubaline milk) and B (100% bubaline milk). According to QDA results, the yoghurt made from bubaline milk (group B) showed highest firmness and acidity than all other milk sample groups. All the experimental groups made from the mixtures of two milks achieved similar good sensory scores. These findings evidenced that the mixture of caprine and bubaline milks might be an efficient strategy to produce a new dairy product with good consistency and pleasant flavor.

Keywords. yoghurt, goat milk, buffalo milk, quantitative and descriptive analysis, sensory acceptance.

INTRODUÇÃO

O iogurte ocupa importante posição no mercado de bebidas lácteas em função de suas reconhecidas características nutricionais e sensoriais. No Brasil, o iogurte é produzido predominantemente a partir de leite bovino, apesar de outros tipos de leite apresentarem potencial para serem utilizados com sucesso¹⁻³.

O Nordeste tem sido, ao longo dos anos, a principal região brasileira produtora de leite caprino, com 66,74% da produção total em 2006⁴. O leite de cabra é considerado hipoalergênico, tendo em vista que a proteína α_{s1} -caseína, reportada por alguns estudiosos como principal proteína responsável por desencadear processos alergênicos⁵⁻⁷, encontra-se em pequena quantidade ou ausente⁸. Além disso, apresenta proteínas e gorduras com características diferenciadas, que conferem ao produto vantagens nutricionais e maior digestibilidade^{9,10}.

O iogurte produzido a partir do leite caprino apresenta problemas tecnológicos associados ao coágulo pouco firme e sabor diferenciado, que dificultam sua aceitação no mercado^{3,11}. A fragilidade do coágulo do iogurte caprino, apontada por vários autores^{12,13}, é justificada pelas características intrínsecas desse tipo de leite, tais como menor teor de caseína, maior dispersão micelar, presença de cálcio coloidal, entre outros¹³⁻¹⁵. Sobre isso, Domagala¹⁶ afirma que as condições de processamento, bem como a composição e/ou propriedades do leite caprino a ser utilizado para a produção de iogurte, precisam ser ajustadas com o objetivo de se obter produto final com textura apropriada e sinerese reduzida.

Estratégias possíveis para contornar o problema seriam a adição de sólidos, a utilização de cepas produtoras de exopolissacarídeos, a concentração por membrana ou misturas de leites^{3,12,17}. No que diz respeito a essa última alternativa, estudos foram conduzidos com sucesso a partir de mistura de leites de diferentes espécies animais^{3,11,18,19}, de forma a aproveitar as características inerentes a cada matéria-prima láctea em prol de um produto final com características apropriadas. Na literatura, é possível encontrar trabalhos abordando a produção de iogurte pela mistura com leite ovino ou bovino, mas não foram encontrados relatos de associação dos leites caprino e bubalino, este reconhecido por proporcionar maior consistência aos iogurtes do que aqueles elaborados com leites de outras espécies, devido a seu elevado teor de sólidos totais²⁰⁻²³. Além disso, o leite de búfala apresenta alto rendimento industrial e, quando

comparado ao leite bovino, possui glóbulos de gordura com diâmetros superiores e maior presença de cálcio e fosfato inorgânico nas micelas proteicas²⁴.

Tendo em vista as características intrínsecas dos leites caprino e bubalino^{1,25-27}, decidiu-se avaliar sensorialmente o iogurte produzido pela mistura de diferentes proporções de leites caprino e bubalino. Para isso, foi utilizada a técnica da análise descritiva quantitativa (ADQ) em associação ao teste afetivo de aceitação utilizando a escala hedônica de nove pontos. Pretende-se com isso obter informações sobre as características sensoriais de um novo tipo de iogurte que tira proveito das características individuais desses dois tipos de leite, os quais, apesar de todo seu potencial tecnológico, ainda são pouco explorados comercialmente no Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

O leite de búfala pasteurizado foi adquirido de unidade produtora localizada no município de Taipu-RN. O leite de cabra pasteurizado utilizado na pesquisa foi proveniente da Associação dos Pequenos Agropecuaristas do Sertão de Angicos (Apasa), sediada no município de Angicos-RN, e da Fazenda Estância Caprichosa, em Macaíba-RN. Os leites foram acondicionados em embalagens plásticas de 1 litro e mantidos sob refrigeração até sua utilização.

Foi utilizado fermento láctico contendo as culturas liofilizadas *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Y 4.50B (Sacco Fermentos, Brasil), preparado de morango (Gemacon Ltda., Brasil) e sacarose adquirida no comércio local.

Elaboração dos iogurtes

A preparação do iogurte foi baseada em Correia et al.²⁶ com modificações. O inóculo foi preparado mediante diluição em câmara asséptica da cultura *starter* Sacco Y4.50B (5UC) em 500 mL de leite UHT (*ultra high temperature*). O material foi acondicionado em tubos Eppendorf de 2 mL e submetidos a congelamento até o uso.

Os iogurtes foram desenvolvidos a partir de leite de cabra, leite de búfala e mistura dos dois, constituindo cinco grupos experimentais (C: 100% leite de cabra; 7C3B: 70% leite de cabra e 30% leite de búfala; 5C5B: 50% leite de cabra e 50% leite de búfala; 3C7B: 30% leite

de cabra e 70% leite de búfala; B: 100% leite de búfala). A cada uma das misturas lácteas, adicionou-se 8% (p/p) de sacarose, proporção definida a partir dos resultados de testes sensoriais prévios. A mistura foi homogeneizada e submetida a tratamento térmico a 90 °C durante 15 minutos e, em seguida, resfriada rapidamente até 42 °C. Nessa temperatura, foram adicionados 3% (v/v) de preparado de morango e 4 mL de inóculo. Optou-se por adicionar o preparado de morango anteriormente à etapa de fermentação, tendo como base experimentos preliminares que demonstraram cor mais intensa e desejável para o iogurte final produzido dessa forma. Após a homogeneização, a mistura foi acondicionada em recipientes de vidro e levada a câmara de fermentação (Tecnal, Brasil) com temperatura controlada de 42 °C. O procedimento experimental foi repetido quatro vezes para cada grupo experimental.

Análise descritiva quantitativa (ADQ)

Foi utilizado o método de análise descritiva quantitativa com julgadores treinados para determinar

o perfil sensorial de cada amostra de iogurte²⁸. Os testes foram realizados em cabines individuais com iluminação adequada. As amostras foram apresentadas em porções de 20 g em recipientes plásticos descartáveis codificados com números de três dígitos, aproximadamente à temperatura de 12 °C.

Para o levantamento inicial de descritores do iogurte sabor morango, foram apresentadas duas amostras obtidas no comércio, que representavam o universo de variação entre as amostras a serem analisadas no que se refere a aparência, aroma, textura e sabor. As amostras foram apresentadas simultaneamente, solicitando ao julgador que descrevesse as similaridades e as diferenças entre elas quanto a aparência, aroma, textura e sabor. Após a avaliação realizada por cada julgador, o grupo se reuniu sob a supervisão de um moderador, no intuito de agrupar os termos semelhantes e eliminar aqueles que não eram percebidos pela maioria dos julgadores. Em seguida, foi preparada ficha de avaliação contendo os termos descritos escolhidos em consenso pela equipe (Figura 1). Nessa etapa, foi também elaborada uma lista

Tabela 1. Definição dos termos descritivos e materiais de referência para iogurte sabor morango produzido a partir de leite caprino, bubalino e suas misturas

Descritores	Definição	Referências
Aparência		
Cor rosa	Tonalidade que varia do rosa claro ao rosa escuro	Claro: preparo de morango diluído na proporção 1/80 g de leite bovino Escuro: preparado de morango diluído na proporção 4/20 g de leite bovino
Aroma		
Aroma de morango	Aroma característico de morango	Fraco: iogurte natural Forte: preparado de morango diluído na proporção 4/20 g de iogurte natural
Sabor		
Sabor de cabra	Sabor característico de leite de cabra	Nenhum: leite bovino Muito: leite caprino
Ácido	Sabor característico de iogurte natural decorrente da presença de ácido láctico	Nenhum: leite bovino Muito: iogurte natural
Doce	Sabor associado à presença de sacarose	Pouco: iogurte natural adicionado de 1% de sacarose Muito: iogurte natural adicionado de 20% de sacarose
Morango	Sabor de preparado de morango	Pouco: iogurte natural Muito: preparado de morango diluído na proporção 1/10 g de iogurte natural
Textura		
Consistência firme	Firmeza, textura espessa, encorpado	Pouco: iogurte natural diluído na proporção de 1/1 g de água Muito: sobremesa láctea desenvolvida com queijo <i>petit suisse</i> e polpa de morango
Homogeneidade	Visual uniforme, presença de uma só fase contínua, ausência de grumos	Pouco: mingau de amido de milho com grumos (1 g de leite em pó, 1 g de amido de milho e 10 mL de água) Muito: iogurte natural

Nome: _____ Data: _____

Prove cuidadosamente as amostras de iogurte que estão sendo apresentadas. Marque com um traço a intensidade percebida do atributo. Obrigada.

APARÊNCIA
Cor rosa _____
pouco muito intenso

AROMA
Aroma de morango _____
pouco muito intenso

FLAVOUR
Flavour de cabra _____
pouco muito intenso

SABOR
Sabor ácido _____
pouco muito intenso

Sabor doce _____
pouco muito intenso

Sabor de morango _____
pouco muito intenso

TEXTURA
Consistência firme _____
pouco muito intenso

Homogeneidade _____
pouco muito intenso

Figura 1. Ficha utilizada no treinamento e avaliação das amostras de iogurte sabor morango produzidas a partir de leite caprino, bubalino e suas misturas

de definições dos termos descritivos, com as respectivas referências para melhor uniformizar a avaliação dos julgadores (Tabela 1).

Em seguida, realizou-se o treinamento dos julgadores, por meio da avaliação das amostras experimentais de iogurte sabor morango. Os julgadores receberam a ficha de análise elaborada na etapa anterior, os materiais de referência e a relação de descritores com suas respectivas definições. O treinamento foi encerrado quando os julgadores demonstraram suficiente compreensão dos conceitos e habilidade em avaliar as amostras por meio da ficha de avaliação. A partir dos resultados do treinamento, foi realizada análise de variância para os resultados de cada julgador para cada atributo. Os julgadores que apresentaram poder discriminatório ($p_{\text{amostras}} < 0,50$), reprodutibilidade nos

juízos ($p_{\text{repetições}} \geq 0,05$) e consenso com os demais membros do grupo foram selecionados para compor a equipe treinada e definitiva.

O perfil sensorial das cinco amostras de iogurte foi avaliado pelos oito julgadores selecionados, de forma que a intensidade de cada descritor foi determinada por meio de escala não estruturada de 9 centímetros. Foi utilizado o delineamento em blocos completos com três repetições, usando-se a técnica de apresentação monádica.

Teste de aceitação

A aceitação das amostras de iogurte foi avaliada por 60 consumidores de iogurte, com idades entre 18 e 60 anos, conforme Borges et al.¹. O teste foi realizado em cabines individuais, sob condições controladas (luz

branca, temperatura entre 20 e 25 °C e ausência de ruídos). Cada julgador recebeu as amostras em copos plásticos descartáveis codificados com números de três dígitos aleatórios, avaliando-as por meio da escala hedônica de nove pontos ancoradas nos extremos 1 (desgostei muitíssimo) e 9 (gostei muitíssimo) para os atributos aparência, aroma, consistência e sabor.

Análise estatística

Os resultados da ADQ e aceitação foram submetidos a análise de variância (Anova) seguida pelo teste de Tukey a 5% de significância. A correlação entre variáveis foi determinada pelo coeficiente de Pearson, considerando-se 5% de significância. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Statistica 7.0 (Tucsa, Estados Unidos).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise descritiva quantitativa (ADQ)

Os escores médios da ADQ obtidos a partir da avaliação dos julgadores para cada atributo encontram-se na Tabela 2. Observou-se que entre os grupos experimentais não existem diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$) para a cor rosa, sabor morango e homogeneidade.

Tabela 2. Médias obtidas por meio da ADQ dos atributos sensoriais para iogurte sabor morango produzido a partir de leite caprino, bubalino e suas misturas

DESCRITORES	TRATAMENTOS				
	C	7C3B	5C5C	3C7B	B
Cor rosa	4,71 ^a	4,22 ^a	4,52 ^a	3,63 ^a	4,06 ^a
Aroma de morango	4,81 ^a	4,64 ^a	3,62 ^{a,b}	3,89 ^{a,b}	2,94 ^b
Flavour de cabra	5,14 ^a	5,16 ^a	4,93 ^{a,b}	4,92 ^{a,b}	4,74 ^b
Sabor ácido	1,87 ^a	2,88 ^{a,b}	2,20 ^{a,b}	3,31 ^{a,b}	3,58 ^b
Sabor doce	7,25 ^a	5,32 ^b	5,54 ^b	4,88 ^{b,c}	3,46 ^c
Sabor morango	5,03 ^a	5,27 ^a	4,84 ^a	4,83 ^a	4,09 ^a
Consistência firme	0,85 ^a	3,00 ^b	4,76 ^c	6,00 ^c	8,04 ^d
Homogeneidade	4,79 ^a	5,39 ^a	5,69 ^a	4,76 ^a	5,15 ^a

a,b,c,d - médias em uma mesma linha acompanhadas de letras diferentes diferem entre si ($p < 0,05$)

C: 100% leite de cabra; 7C3B: 70% leite de cabra e 30% leite de búfala; 5C5B: 50% leite de cabra e 50% leite de búfala; 3C7B: 30% leite de cabra e 70% leite de búfala; B: 100% leite de búfala.

O aroma de morango apresentou tendência a diminuir à medida que se aumenta a concentração de leite bubalino. Nesse atributo, a média da amostra C (4,81) foi estatisticamente diferente ($p < 0,05$) da média da amostra B (2,94). Comportamento idêntico foi observado para o sabor de cabra, o que já era esperado, uma vez que tal característica é intrínseca aos produtos derivados do leite caprino e acontece em função da alta concentração de ácidos graxos de cadeia curta^{15,29}. Vale salientar que o sabor do leite caprino pode ser influenciado pelo tipo de alimentação do rebanho, que pode proporcionar variações nas concentrações dessas substâncias voláteis^{30,31}.

O iogurte com maior percentagem de leite caprino foi apontado como menos ácido ($p < 0,05$) do que a amostra com maior teor de leite bubalino. A acidez inicial do leite é profundamente influenciada pelo tipo de raça do qual foi obtido^{3,15}, ao passo que a acidez desenvolvida durante o processo fermentativo está relacionada ao metabolismo dos carboidratos pelas culturas lácticas utilizadas, o qual pode variar frente a diferentes tipos de leite ou como consequência de diferentes concentrações de sólidos totais^{32,33}.

Da mesma forma, a percepção do sabor doce foi maior nos grupos com maior concentração de leite caprino utilizado na formulação dos iogurtes ($p < 0,05$), sendo que não se observaram diferenças estatísticas entre os iogurtes desenvolvidos a partir da mistura dos dois leites (7C3B, 5C5B, 3C7B). Idêntica quantidade de sacarose foi adicionada a cada um dos grupos estudados, o que leva a supor que outros componentes presentes no leite e suas interações possam modificar a identificação do sabor. Acredita-se também que a concentração inicial de lactose presente na matéria-prima teria importância reduzida, tendo em vista o baixo poder edulcorante da lactose³⁴ e as pequenas variações no teor de lactose reportadas na literatura entre esses dois tipos de leite^{21,35,36}.

Foram observados escores sensoriais crescentes para a consistência firme com o aumento da concentração de leite bubalino. Os valores médios de consistência firme significativamente superiores para as amostras com maiores quantidades de leite bubalino ($p < 0,05$) são explicados pela maior concentração de gordura e sólidos totais deste tipo de leite³⁷, que favorece a formação de coágulo mais firme^{1,23}. Além disso, o escore médio significativamente inferior ($p < 0,05$) relativo à consistência do produto obtido para o iogurte produzido somente com leite caprino confirma os relatos existente na

literatura, que apontam o já comentado coágulo frágil do iogurte caprino^{3,12}. Sabe-se que a estrutura físico-química do leite caprino, que possui glóbulos de gordura de menor diâmetro, micelas de proteínas menores e quantidade de α_{s1} -caseína reduzida ou ausente, proporciona a formação de coágulo mais suave e frágil^{8,11}.

O perfil sensorial para as cinco amostras de iogurte sabor morango é mostrado na Figura 2, em que as médias de intensidade para cada termo descritor são dispostas em eixos distintos. O ponto zero da escala é representado no centro da figura, e a intensidade dos atributos aumenta do centro para a periferia. O perfil sensorial é revelado ao se fazerem ligações entre os pontos. Pode-se perceber que o iogurte bubalino (amostra B) se destaca com maiores notas para consistência firme e sabor ácido, enquanto o iogurte caprino apresenta valores superiores para os demais atributos, com exceção da homogeneidade, em que a amostra 5C5B alcançou a maior média (5,69). Quanto aos iogurtes obtidos pelas misturas dos dois tipos de leite, a amostra 5C5B atingiu valores médios intermediários para os atributos analisados.

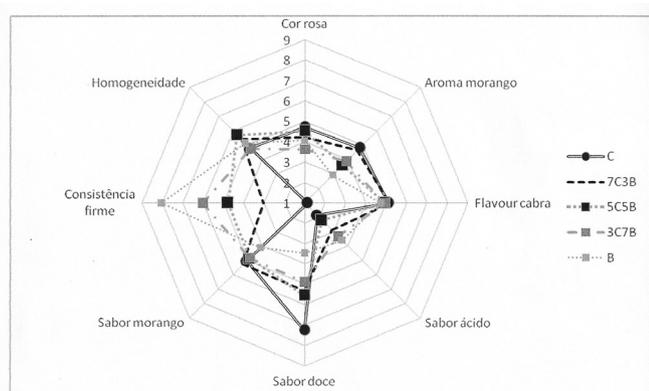


Figura 2. Perfil sensorial dos grupos experimentais de iogurte produzido a partir de leite caprino, bubalino e suas misturas (C: 100% leite de cabra; 7C3B: 70% leite de cabra e 30% leite de búfala; 5C5B: 50% leite de cabra e 50% leite de búfala; 3C7B: 30% leite de cabra e 70% leite de búfala; B: 100% leite de búfala)

Apesar da reconhecida contribuição socioeconômica da caprinocultura para as pequenas comunidades rurais, ainda existem entraves mercadológicos que dificultam a plena comercialização dos produtos derivados de caprinos, não só no Brasil, mas em outras partes do mundo^{38,39}. Apesar disso, existe um segmento de consumidores que consomem o leite de cabra em virtude do conhecimento de suas reconhecidas qualidades nutricionais, além daqueles que o utilizam como substituto ao leite bovino, em função de problemas

de intolerância. Os produtos caprinos sofreram ao longo dos anos atribuições negativas, tais como alegações relacionadas a seu sabor e aroma^{25,39}, que contribuíram para discriminação e resistência ao consumo do leite caprino e seus derivados de forma mais ampla. Levando em consideração tais aspectos, defende-se que o mercado de leite e derivados caprinos poderia ser incrementado se o sabor de seus produtos fosse atraente e suave, o que pode ser alcançado pelo desenvolvimento de produtos centrados no equacionamento de seus atributos sensoriais⁴⁰.

Teste de aceitação dos iogurtes sabor morango

Na Tabela 3, as médias obtidas no teste de aceitação são exibidas para os cinco grupos de iogurte em análise. Os escores referentes à aceitação para o iogurte C ficaram entre “indiferente” e “gostei regularmente”, notas inferiores ($p < 0,05$) ao julgamento obtido para o iogurte B, em praticamente todos os itens, exceto aparência. No que diz respeito aos iogurtes elaborados com misturas de leites, de maneira geral, estes receberam avaliação entre 6 e 7 para os atributos considerados, o que representa opiniões entre “gostei ligeiramente” e “gostei regularmente”.

De maneira similar ao observado no teste ADQ, os iogurtes alcançaram maiores notas à medida que se aumentou a adição de leite de búfala, desempenho esperado em função do maior teor de sólidos do leite bubalino, que confere, sobretudo, melhor aparência, textura e, mais especificamente, consistência. Este último é um importante critério para avaliação da qualidade global de iogurte, sobretudo para o iogurte de consistência firme, objeto da presente pesquisa. Os resultados mostram que a mistura com leite de búfala pode ser uma estratégia eficiente no sentido de gerar produto lácteo misto com consistência mais adequada que aquele obtido somente com leite caprino. Os resultados da ADQ mostram que o escore sensorial relativo a consistência pode ser incrementado cerca de cinco vezes ao se promover a mistura dos leites caprino e bubalino na proporção 1:1, ou mesmo mais de seis vezes ao se utilizar a proporção de mistura de 3:7. Tendência similar é observada nos resultados do teste de aceitação, os quais revelam valores estatisticamente superiores para o 3C7B do que para o iogurte C ($p < 0,05$) no atributo consistência.

O efeito positivo do teor de sólidos totais sobre a consistência do iogurte já foi observado³². De forma

Tabela 3. Médias e respectivos desvios-padrão dos escores sensoriais obtidos no teste de aceitação dos iogurtes elaborados a partir de leite de cabra, de búfala e suas misturas

Atributos	Tratamentos				
	C	7C3B	5C5B	3C7B	B
Aparência	6,45 ± 0,75 ^{a,b,c}	7,02 ± 0,55 ^{a,b,c}	6,21 ± 0,78 ^b	6,58 ± 0,38 ^{a,b,c}	7,33 ± 0,18 ^c
Aroma	6,38 ± 0,59 ^a	6,71 ± 0,44 ^{a,b}	6,45 ± 0,35 ^{a,b}	6,37 ± 0,42 ^a	7,30 ± 0,57 ^b
Consistência	5,03 ± 1,15 ^a	6,10 ± 0,25 ^{a,b}	6,20 ± 0,66 ^{a,b}	6,47 ± 0,49 ^{b,c}	7,38 ± 0,28 ^c
Sabor	5,34 ± 0,49 ^a	5,64 ± 0,60 ^{a,b}	5,43 ± 0,49 ^a	6,10 ± 0,91 ^{a,b}	6,63 ± 0,45 ^b

a,b,c – Letras diferentes em uma mesma linha indicam resultados estatisticamente diferentes ($p < 0,05$)

C: 100% leite de cabra; 7C3B: 70% leite de cabra e 30% leite de búfala; 5C5B: 50% leite de cabra e 50% leite de búfala; 3C7B: 30% leite de cabra e 70% leite de búfala; B: 100% leite de búfala.

similar, Vargas et al.¹¹, ao analisarem iogurtes elaborados a partir da mistura de leite de cabra e vaca, relataram que, quanto maior a quantidade de leite de cabra, menor consistência apresentou o coágulo. Da mesma forma, Hafemann et al.¹⁸, quando estudaram iogurte bubalino, bovino e misturas dos dois, observaram textura mais firme nos iogurtes com leite de búfala. Essa característica intrínseca do leite bubalino dispensa adição de leite em pó, procedimento usual para melhorar a consistência de iogurte de leite de vaca e indispensável para iogurte caprino. De maneira semelhante, Stelios e Emmanuel³ mostraram previamente que é possível diminuir a sinérese e melhorar a textura e a aceitação global do iogurte caprino mediante a adição de leite ovino ao leite caprino.

Os escores dos iogurtes produzidos a partir das misturas apresentaram valores semelhantes para o atributo sabor ($p > 0,05$), mas os grupos C e B são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). O sabor diferenciado do iogurte caprino, muitas vezes reportado como atípico, resulta não só da maior concentração de ácidos graxos de cadeia curta, mas também da baixa produção de acetaldeído durante o processo fermentativo¹¹.

Acredita-se que as características sensoriais do iogurte aqui propostos podem ser valorizadas e/ou incrementadas com adição de elementos que favoreçam aparência, consistência, aroma e sabor, como frutas, mel e preparados especiais desenvolvidos para leites fermentados, além da adição de sólidos lácteos ou não.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos na presente pesquisa permitem concluir que a adição de leite bubalino ao

leite caprino proporcionou melhor avaliação sensorial, principalmente nas características relacionadas a sabor e consistência.

Os resultados da análise descritiva quantitativa (ADQ) revelaram diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) entre os iogurtes elaborados somente com leite caprino e bubalino. No teste de aceitação, o iogurte produzido apenas a partir de leite caprino alcançou baixos escores sensoriais para consistência e sabor. No Brasil, a industrialização do leite caprino ainda é limitada na maioria dos estados produtores. Não há variedade de produtos disponíveis no mercado, e existe necessidade de pesquisas que apontem para tecnologias voltadas para esse tipo de leite, bem como uma maior divulgação de seus benefícios à saúde. Acredita-se que a mistura de leite caprino e bubalino consiste em uma alternativa viável para o desenvolvimento de formulações de iogurtes, de forma a contornar os problemas tecnológicos associados ao coágulo pouco firme e ao sabor do iogurte caprino.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pelo apoio financeiro; a APASA, Fazenda Estância Caprichosa e Vieira Alimentos, pelas gentis doações.

REFERÊNCIAS

1. Borges KC, Medeiros AC; Correia RTP. Iogurte de leite de búfala sabor cajá (*Spondias lutea L.*): caracterização físico-química e aceitação sensorial entre indivíduos de 11 a 16 anos. *Alim Nutr*. 2009;20(2):295-300.
2. Jumah R, Shaker R, Abu-Jdayil B. Effect of milk source on the rheological properties of yogurt during the gelation process. *Int J Dairy Tech*. 2003;54(3):89-93.

3. Stelios K, Emmanuel A. Characteristics of set type yoghurt made from caprine or ovine milk and mixtures of the two. *Intl J Food Sci Technol*. 2004;39(3):319-24.
4. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Censo Agropecuário 2006. [acesso 22 maio 2009]. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br].
5. El-Agamy E. The challenge of cow milk protein allergy. *Small Rum Res*. 2007;68(1):64-72.
6. Park Y. Hypoallergenic and therapeutic significance of goat milk. *Small Rum Res*. 1994;14(2):151-9.
7. Wal JM. Structure and function of milk allergens. *Allergy*. 2001;56(67):35-8.
8. Clarck S, Sherbon JW. Genetic variants of alpha s1-CN in goat milk: breed distribution and associations with milk composition and coagulation properties. *Small Rum Res*. 2000;38(1):135-43.
9. Barrionuevo M, Alférez M, Lopes-Aliaga I, Sanz-Sampelayo M, Campos M. Beneficial effect of goat milk on nutritive utilization of iron and copper in malabsorption syndrome. *J Dairy Sci*. 2002;85(9):657-64.
10. Lara-Villoslada F, Debras E, Nieto A, Concha A, Galvez J, Lopez-Huertas, et al. Oligosaccharides isolated from goat milk reduce intestinal inflammation in a rat model of dextran sodium sulfate-induced colitis. *Clin Nutr*. 2006;25(3):477-88.
11. Vargas M, Cháfer M, Albors A, Chirat A, González-Martínez C. Physicochemical and sensory characteristics of yogurt produced from mixtures of cows' and goats' milk. *Int Dairy J*. 2008;18(12):1146-52.
12. Martín-Diana AB, Janer C, Peláez C, Requena T. Development of a fermented goat's milk containing probiotic bacteria. *Int Dairy J*. 2003;13(10):827-33.
13. Storry J, Grandison A, Milliard D, Owen A, Ford G. Chemical composition and coagulation properties of rennet milk from different breeds and species of ruminant. *J Dairy Res*. 1983;50(2):215-24.
14. Park Y. Rheological characteristics of goat and sheep milk. *Small Rum Res*. 2007;68(1):73-87.
15. Park Y, Juárez M, Ramos M, Haenlein G. Physicochemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Rum Res*. 2007;68(1):88-113.
16. Domagala J. Instrumental texture, syneresis and microstructure of yoghurts prepared from goat, cow and sheep milk. *Int J Food Properties*. 2009;12(3):605-15.
17. Ordóñez JA. Tecnologia de alimentos: alimentos de origem animal. Porto Alegre: Artmed; 2005.
18. Hafemann J, Benedet HD, Teixeira E. Caracterização físico-sensorial do iogurte produzido com leite bubalino em mistura com leite bovino. *Rev Inst Latic Cândido Tostes*. 2007;62(354):23-30.
19. Uysal H, Kilic S, Kavas G, Akbulut N, Kesencas H. Some properties of set yoghurt made from caprine milk and bovine-caprine milk mixtures fortified by ultrafiltration or the addition of skim milk powder. *Int J Dairy Tech*. 2003;56(3):177-81.
20. Verruma MR, Salgado JM. Análise química do leite de búfala em comparação ao leite de vaca. *Sci Agric*. 1994;51(1):131-7.
21. Han B, Meng Y, Li M, Yang Y, Ren F, Zeng Q, et al. A survey on the microbiological and chemical composition of buffalo milk in China. *Food Cont*. 2007;18(6):742-6.
22. Ahmad S, Gaucher I, Rousseau F, Beaucher E, Pito M, Grongnet J, et al. Effects on the acidification on physical-chemical characteristics of buffalo milk: a comparison with cow's milk. *Food Chem*. 2008;106(1):11-7.
23. Cunha Neto OC, Oliveira CAF, Hota RM, Sobral PJA. Avaliação físico-química e sensorial do iogurte natural produzido com leite de búfala contendo diferentes níveis de gordura. *Ciênc Tecnol Alim*. 2005;25(3):448-53.
24. Menard O, Ahmad S, Rousseau F, Briard-Bion V, Gaucheron F, Lopez C. Buffalo vs. cow milk: fat globules: size distribution, zeta potential, compositions in total fatty acids and in polar lipids from the milk fat globule membrane. *Food Chem*. 2010;120(2):544-51.
25. Correia R, Borges K. Posicionamento do consumidor frente ao consumo de leite de cabra e seus derivados na cidade de Natal-RN. *Rev Inst Latic Cândido Tostes*. 2009;64(366):36-43.
26. Correia R, Clementino I, Bezerra MF, Silva PDL. Avaliação do procedimento utilizado para elaboração de iogurte de leite de cabra. *Rev Inst Latic Cândido Tostes*. 2006;61(351):317-20.
27. Magalhães M, Silva J, Pedrini M, Correia R. Néctares de frutas tropicais enriquecidos com iogurtes de leite de cabra comparados com formulações utilizando leite bovino. *Rev Inst Cândido Tostes*. 2006;353(61):44-50.
28. Stone H, Sidel JL. *Sensory Evaluation Practices*. 2. ed. Orlando: Academic Press; 1992.
29. Eknaes M, Skeie S. Effect of different level of roughage availability and contrast levels of concentrate supplementation on flavor of goat milk. *Small Rum Res*. 2006;66(1):32-43.
30. Mesquita IVU, Costa RG, Queiroga RC, Medeiros AN. Efeito da dieta na composição química e características sensoriais de leite de cabra. *Rev Inst Latic Cândido Tostes*. 2004;58(337):1-14.
31. Queiroga RC, Costa RG, Madruga MS. Leite caprino: aspectos aromáticos e nutricionais. *Rev Inst Latic Cândido Tostes*. 2003;58(330):3-20.
32. Mahdian E, Tehrani M. Evaluation of the effect of milk total solids on the relationship between growth and activity of starter cultures and quality of concentrated yoghurt. *Eur J Agric Environ Sci*. 2007;2(5):587-92.
33. Özer B, Robinson R. The behavior of starter cultures in concentrated yoghurt (labneh) produced by different techniques. *LWT*. 1999;32(7):391-5.
34. Ribeiro EP, Seravalli EAG. *Química de alimentos*. 2. ed. São Paulo: Blucher; 2007.
35. Ceballos L, Morales Z, Adarve G, Castro J, Martínez L, Sampelayo M. Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analyzed by identical methodology. *J Food Compos Anal*. 2009;22(4):322-9.
36. Jandal JM. Comparative aspects of goat and sheep milk. *Small Rum Res*. 1996;22(2):177-85.
37. Macedo MP, Wechsler FS, Ramos AA, Amaral JB, Souza JC, Resende FD, et al. Composição físico-química e produção do leite de búfalas da raça mediterrâneo no oeste do estado de São Paulo. *Rev Bras Zootec*. 2001;30(3):1084-8.
38. Haenlein G. Goat milk in human nutrition. *Small Rum Res*. 2004;51(2):155-61.
39. Mowlem A. Marketing goat dairy produce in the UK. *Small Rum Res*. 2005;60(1-2):207-13.
40. Ribeiro AC, Ribeiro SDA. Specialty products made from goat milk. *Small Rum Res*. 2010;89(2-3):225-33.

Investigação da presença de anorexígenos, benzodiazepínicos e antidepressivos em formulações fitoterápicas emagrecedoras

Investigation on the occurrence of anorexigens, benzodiazepines and antidepressants in the weight-reducer phytotherapy formulations

RIALA6/1446

Daniela Santos Maia ANDRIOLO^{1,2}, Luzia Helena da CUNHA¹, Amália Soares SANTANA¹, Maria Eloíza SAMPAIO¹, Virgínia del Carmen Troncoso VALENZUELA¹, Maria Gorette Resende DUARTE¹, Eliana de Faria GARCIA^{2*}

*Endereço para correspondência: ²Centro Universitário Newton Paiva, Av. Silva Lobo, 1720, 30460-000, Nova Granada, Belo Horizonte, MG, Brasil. Tel.: (31) 3516-2623. E-mail: elianafgh@yahoo.com.br

¹Divisão de Vigilância Sanitária, Fundação Ezequiel Dias (Funed), Rua Conde Pereira Carneiro, 80, Gameleira, 30510-010, Belo Horizonte, MG, Brasil

Recebido: 05.09.2011 - Aceito para publicação: 20.01.2012

RESUMO

No Brasil, são comumente comercializadas formulações fitoterápicas emagrecedoras adicionadas de substâncias sintéticas não declaradas, o que constitui um grave problema de saúde pública. No presente trabalho, foram analisadas amostras de formulações emagrecedoras naturais com suspeita de adição de substâncias anorexígenas, ansiolíticas e/ou antidepressivas apreendidas pela Gerência de Vigilância Sanitária em Medicamentos e Congêneros/Serviço de Vigilância Sanitária de Minas Gerais (GVMC/SVS-MG). Por meio de ensaios cromáticos e do teste de espuma foi constatada a ausência de pelo menos uma classe dos metabólitos secundários pesquisados (flavonoides, saponinas e quinonas) em todas as amostras analisadas. A presença de femproporex, fluoxetina e clordiazepóxido, em forma isolada ou em associação foi detectada em todas as amostras por meio de CG-EM. As amostras analisadas em sua totalidade foram discordantes dos padrões de qualidade aceitáveis, em virtude de adição não declarada de substâncias sintéticas em sua composição, além de associação de anorexígeno e ansiolítico, o que não é permitido pela legislação vigente. Comprovou-se, assim, a necessidade premente de um sistema de fiscalização mais atuante em relação a produtos irregulares comercializados, juntamente com a conscientização dos profissionais da área de saúde.

Palavras-chave. adulteração, formulação fitoterápica, anorexígenos, ansiolíticos, antidepressivos.

ABSTRACT

Several weight-reducer phytotherapeutic formulations commercialized in Brazil contain undeclared synthetic drugs. This situation constitutes a public health issue for the country. This study aimed at evaluating the occurrence of anorexigenic, benzodiazepinic and antidepressant drugs in the phytopharmaceutical preparations monitored and collected by the Public Health Surveillance of the State of Minas Gerais, Brazil. By chemical tests, the absence of at least one class of the analyzed secondary metabolites (flavonoids, saponins and quinones) was found in all analyzed samples. Fenproporex, fluoxetine and chlordiazepoxide, alone or in association, were identified by GC-MS in all formulations. Therefore, the analyzed samples did not comply with the established quality standards, as these formulations contain undeclared synthetic compounds in their compositions, along with the association of anorexigens and anxiolytics drugs, which are not allowed by the Brazilian sanitary legislation. Hence, a more effective quality control of the weight-reducer phytotherapy formulations is demanded, as well as improving educational actions addressed to health professionals and consumers.

Keywords. adulteration, phytomedicines, anorexigens, anxiolytics, antidepressants.

INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2008, cerca de 1,5 bilhões de pessoas no mundo estavam acima do peso e, deste total, mais de 500 milhões eram obesas¹. No Brasil, dados do IBGE indicam que em todas as faixas de renda aumentou contínua e substancialmente o percentual de pessoas com excesso de peso e obesas. O sobrepeso atinge aproximadamente 48% das mulheres e 50% dos homens acima de 20 anos². Considerando-se os índices de crescimento atuais da obesidade, esta pode ser considerada um problema de saúde pública no Brasil, assim como em outros países¹.

Frequentes têm sido as ofertas de fórmulas emagrecedoras naturais manipuladas ou industrializadas, quase sempre de composição química duvidosa, sendo estas muito procuradas e difundidas entre os consumidores, devido aos apelos da mídia para o consumo de produtos naturais. Em geral, esses medicamentos são na verdade associações de princípios ativos de natureza diversa, sem racionalidade e de elevado risco. Vários estudos realizados no Brasil comprovaram que os produtos emagrecedores vendidos como “naturais” apresentam em suas formulações adição não declarada de substâncias anorexígenas, antidepressivas e/ou ansiolíticas³⁻⁶, o que significa um grande risco para a saúde dos consumidores.

O Brasil lidera o mercado mundial em consumo de anorexígenos. Em 2009, foram vendidos no país 3 toneladas de anfepramona, 1,8 toneladas de sibutramina, 1 tonelada de femproporex e 2 quilos de mazindol⁷. O consumo elevado de anorexígenos no Brasil pode demonstrar que suas indicações clínicas e seu acesso, tanto em farmácias de manipulação quanto em drogarias, estão muito distantes do preconizado pela OMS e pelos órgãos sanitários, o que pode indicar um uso irracional. Ressalta-se que esses medicamentos não são mais comercializados nos Estados Unidos e na Europa por serem considerados medicamentos de elevado risco aos usuários⁸.

Segundo avaliação constante da Nota Técnica divulgada pela Anvisa, não existem, na literatura, dados científicos suficientes e compatíveis com as normas regulatórias vigentes de comprovação da eficácia e segurança desses medicamentos para efeitos de sua manutenção no mercado⁸. Assim, a resolução RDC n. 52, publicada em outubro de 2011, proibiu o uso de anfepramona, femproporex e mazindol e estabeleceu

medidas de controle da prescrição e dispensação da sibutramina⁹, devido a estudos recentes que associam o consumo dessas substâncias a doenças cardiovasculares e a distúrbios comportamentais^{7,10-12}.

A Divisão de Vigilância Sanitária da Fundação Ezequiel Dias (Funed) recebe frequentemente amostras de órgãos, como a Secretaria de Saúde/Vigilância Sanitária (SES/MG) e Delegacias de Polícia, com solicitação de constatação de composição e/ou verificação de adulteração de medicamentos manipulados e industrializados, buscando avaliar a presença de substâncias sujeitas a controle especial.

Neste contexto, o presente trabalho foi desenvolvido a fim de avaliar amostras de formulações emagrecedoras naturais com suspeita de adição não declarada de substâncias anorexígenas, ansiolíticas e/ou antidepressivas, apreendidas pela Gerência de Vigilância Sanitária em Medicamentos e Congêneres/Serviço de Vigilância Sanitária de Minas Gerais (GVMC/SVS-MG).

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras avaliadas

Foram analisadas 40 amostras (A1 a A40) de formulações fitoterápicas emagrecedoras apreendidas pela GVMC/SVS-MG. Cada frasco continha 90 cápsulas, sendo seu conteúdo constituído de pó de plantas usualmente empregadas em formulações emagrecedoras, tais como carqueja, centelha, garcínia, ginkgo, cáscara sagrada, frângula, sene, castanha-da-índia, passiflora, além de fucus e colágeno hidrolisado.

Caracterização organoléptica

Para os pós das cápsulas, foram avaliados os parâmetros aspecto, odor e cor, sendo as amostras observadas sob luz artificial¹³. Na determinação do parâmetro cor, foi empregado o padrão de cores descrito por Melo¹⁴.

Caracterização dos metabólitos secundários

Considerando-se as espécies constituintes da formulação, fizeram-se a caracterização cromática para flavonoides (reação da cianidina) e quinonas (reação de Bornträger) e o teste de espuma para saponinas¹⁵⁻¹⁷. Amostras de ginkgo, sene e ginseng, provenientes do banco de drogas vegetais de referência do Serviço de Microscopia da Fundação Ezequiel Dias, foram empregadas como controle positivo das reações cromáticas.

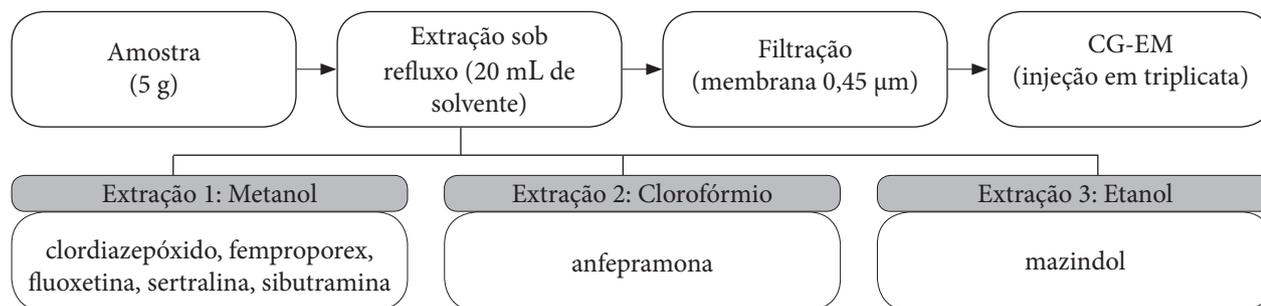


Figura 1. Fluxograma do preparo das amostras

Identificação das substâncias sintéticas por CG-EM

Preparo das amostras: as amostras foram pesadas em triplicata (5 g) e fez-se uma extração sob refluxo das substâncias sintéticas, possivelmente presentes nas formulações fitoterápicas, empregando-se metanol, etanol e clorofórmio, grau HPLC, marca Merck. Foram utilizados três diferentes solventes em função da solubilidade das substâncias sintéticas a serem avaliadas^{18,19} (Figura 1).

Preparo das soluções de referência: soluções de mazindol e cloridrato de sibutramina (Gerbrás Química e Farmacêutica Ltda., Lote 060310) foram preparadas em triplicata (2,5 mg/mL em EtOH e MeOH, respectivamente), devido à ausência de dados referentes a essas substâncias na biblioteca do espectrômetro de massas¹⁹. A identificação de anfepramona, clordiazepóxido, femproporex, fluoxetina e sertralina foi feita por comparação com os espectros de massas das bibliotecas NIST 107, NIST 21 e PMW tox2.

Condições cromatográficas: empregou-se cromatógrafo gasoso CG-17A equipado com detector de massas SHIMADZU, modelo CG/EM QP5050, gerenciado pelo software CGMSolution; coluna capilar de sílica DB-5 (30 m × 0,25 mm e 0,25 µm de espessura do filme), utilizando-se hélio como gás de arraste (1 mL/min); injetor a 240 °C (modo *splitless*); interface a 260 °C; programação do forno: temperatura inicial de 50 °C (1 min), seguida de aumento de 5 °C/min até 100 °C (5 minutos); posterior aumento da temperatura de 5 °C/min até 150 °C (5 minutos) e de 5 °C/min até 200 °C (10 minutos). O espectrômetro de massas foi operado no modo scan, com impacto de elétrons (70 eV), tempo de aquisição 4 a 60 minutos e corte de solvente em 3 minutos. As amostras e soluções de referência foram injetadas em triplicata (1,0 µL)¹⁹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os pós das cápsulas apresentaram aspecto homogêneo e coloração variando entre tons de amarelo,

marrom e cinza. As variações de cor observadas podem ser atribuídas a diferenças nas drogas vegetais empregadas nas formulações.

De acordo com a literatura, quinonas, saponinas e/ou flavonoides são os principais constituintes encontrados nas espécies vegetais presentes nas formulações fitoterápicas em estudo¹⁷. No entanto, para todas as amostras, foram obtidos resultados negativos para uma ou duas das classes de metabólitos avaliadas, indicando a ausência das espécies vegetais declaradas ou mesmo o emprego de matéria-prima vegetal de má qualidade.

Além de material vegetal em pó, nas amostras analisadas, foi identificada a presença das seguintes substâncias sintéticas: femproporex, fluoxetina e clordiazepóxido. Anfepramona, sertralina, sibutramina e mazindol não foram detectados nas amostras avaliadas (Tabela 1). Dentre as amostras analisadas, 52,5% apresentaram femproporex, enquanto 25% exibiram fluoxetina em sua composição. A presença de clordiazepóxido foi observada sempre em associação com fluoxetina (17,5%) ou com femproporex (5%). Nas condições cromatográficas empregadas, os picos relativos ao femproporex, fluoxetina e clordiazepóxido apresentaram tempos de retenção de 28,29, 34,71 e 50,03 minutos, respectivamente. A ocorrência de dois ou mais desses picos era indicativo da associação dessas substâncias.

Vale salientar que os resultados obtidos estão em desacordo com as legislações vigentes, visto que, segundo a RDC n° 14²⁰, é proibida a presença de substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, em formulações fitoterápicas. Além disso, em medicamentos e preparações magistrais, não é permitida a associação de anorexígenos entre si ou com ansiolíticos, diuréticos, hormônios ou extratos hormonais e laxantes, bem como quaisquer outras substâncias com ação medicamentosa, conforme resolução RDC n° 58²¹, resolução Mercosul/GMC n° 39²², Portaria SVS/MS n° 344 – artigo 47²³ e Resolução

CFM nº 1.477²⁴. Ansiolíticos e antidepressivos são usualmente associados aos anorexígenos em formulações emagrecedoras para combater os efeitos colaterais provocados por substâncias desta última classe, como depressão, euforia, irritação, tremor e insônia^{25,26,27}. Os medicamentos anorexígenos anfepramona, femproporex e mazindol estão no mercado brasileiro há mais de 30 anos, e a sibutramina foi introduzida em 1998. Todavia, em outubro de 2011, a ANVISA publicou a resolução RDC nº 52 proibindo o uso de anfepramona, femproporex e mazindol e estabelecendo maior controle na prescrição e dispensação da sibutramina⁹, pois os benefícios dessas substâncias não superam os riscos à saúde do paciente. A decisão da Anvisa baseou-se em estudos científicos e no parecer da Câmara Técnica de Medicamentos (Cateme)⁸.

Tabela 1. Substâncias sintéticas identificadas por CG-EM nas amostras analisadas

Amostra	Substâncias sintéticas
A1, A2, A4, A5, A7, A10, A11, A12, A13, A14, A15, A17, A18, A22, A23, A27, A31, A34, A38, A39, A40	Femproporex
A3, A6, A8, A16, A24, A25, A28, A29, A32, A33	Fluoxetina
A9, A19, A20, A21, A26, A35, A36	Fluoxetina e clordiazepóxido
A30 e A37	Femproporex e clordiazepóxido

CONCLUSÃO

A presença não declarada de anorexígenos, ansiolíticos e antidepressivos em formulações ditas “naturais” é frequente em produtos irregulares comercializados no mercado brasileiro e constituem um problema de saúde pública, visto que essas substâncias possuem restrições e contraindicações de uso, podendo levar a tolerância, dependência química e síndrome de abstinência. Além disso, considerando-se que o paciente irá ingerir essas substâncias sem conhecimento e sem controle de dosagem, poderão ocorrer interações perigosas com outra medicação em uso.

Diante dos resultados obtidos no presente trabalho, ressalta-se a importância de um sistema de fiscalização mais eficaz e maior conscientização por parte dos profissionais da saúde quanto às formulações fitoterápicas, devendo-se promover seu uso racional.

AGRADECIMENTOS

À farmacêutica Ana Luiza Belo de Carvalho, pela colaboração nas análises por CG-EM.

À farmácia de manipulação Formas & Fórmulas, que gentilmente nos cedeu a amostra de referência de cloridrato de sibutramina.

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization – WHO. Media Centre. Obesity and overweight. Fact sheet n. 311. [acesso 2011 set 1]. Disponível em: [http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html].
2. IBGE. Pesquisa de orçamentos familiares – POF 2008-2009. Antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil. Comunicação Social de 27 de agosto de 2010. [acesso 2011 ago 25]. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1699&id_pagina=1].
3. Auricchio MT, Batistic MA, Markman BEO. Detecção de anorexígenos e benzodiazepínicos em formulações “naturais” empregadas em regimes de emagrecimento. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 1991;51(1/2):105-10.
4. Azeredo FS, Guimarães RI, Paula JR, Cunha LC. Validação de técnica analítica em cromatografia em camada delgada comparativa para identificação de fármacos anorexígenos sintéticos em produtos fitoterápicos. *Rev Eletr Farm*. 2004;1:17-24.
5. Moritz MIG, Lang KL, Baratto L, Caro MSB, Falkenberg M, Schenkel EP. Identification of undeclared synthetic drugs in herbal products commercialized in Brazil: the “Indiano Talun” case. *Lat Am J Pharm*. 2008;27(2):274-9.
6. Yano, HM, Santos AP, Bugno A, Auricchio MT. Pesquisa de anorexígenos e benzodiazepínicos em formulações emagrecedoras e avaliação de rotulagem, em análises da Seção de Farmacognosia do Instituto Adolfo Lutz no período de junho de 2004 a março de 2007. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2008;67(1):78-82.
7. Federação Nacional dos Farmacêuticos – Fenafar. Anvisa promoveu audiência sobre uso de anorexígenos. [acesso 2011 ago 29]. Disponível em: [http://www.fenafar.org.br/portal/medicamentos/62-medicamentos/758-anvisa-promoveu-audiencia-sobre-uso-de-anorexigenos.html].
8. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Nota técnica sobre eficácia e segurança dos medicamentos inibidores de apetite. Brasília: Anvisa; 2011. [acesso 2011 ago 29]. Disponível em: [http://www.abeso.org.br/pdf/Nota%20tecnica%20Anvisa%5B1%5D.pdf].
9. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 52, de 6 de outubro de 2011. Dispõe sobre a proibição do uso das substâncias anfepramona, femproporex e mazindol, seus sais e isômeros, bem como intermediários e medidas de controle da prescrição e dispensação de medicamentos que contenham a substância sibutramina, seus sais e isômeros, bem como intermediários. Diário Oficial da República Federativa [do] Brasil. Brasília, 10 out 2011. [acesso 2012 jan 10]. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res0052_06_10_2011.html].

10. Mariz SR. Aspectos toxicológicos do femproporex. *Rev Bras Toxicol*. 2004;17(1):39-47.
11. Florentin M, Liberopoulos EN, Elisaf MS. Sibutramine-associated adverse effects: a practical guide for its safe use. *Obes Rev*. 2008;9:378-87.
12. Drugdex System. [Base de dados da internet] Greenwood Village: Thompson Reuters (Healthcare). Atualizado periodicamente.
13. Farmacopeia Brasileira, v. 1. 5 ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2010.
14. Melo MS. Caracteres organolépticos de alimentos e bebidas. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 1946;VI(1):77-91.
15. Matos AFJ. Introdução a fitoquímica experimental. 2. ed. Fortaleza: Editora UFC; 1997.
16. Costa AF. Farmacognosia, v. 3. 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian; 2000.
17. Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia da planta ao medicamento. 5. ed. Rio Grande do Sul/Florianópolis: Editora da UFSC e Editora da UFRGS; 2004.
18. Moffat AC, Osselton MD, Brian W, organizadores. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons. 3. ed. Londres: Pharmaceutical Press; 2004. v. 2, Part II.
19. Carvalho ALB. Identificação de anorexígenos, ansiolíticos e antidepressivos, por cromatografia gasosa, em formulações fitoterápicas para emagrecimento. [trabalho de conclusão de curso]. Belo Horizonte (MG): Centro Universitário Newton Paiva; 2006.
20. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 14, de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, 5 mar 2010. [acesso 2011 ago 20]. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RDC_N_14_anvisa.pdf].
21. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 58, de 5 de setembro de 2007. Dispõe sobre o aperfeiçoamento do controle e fiscalização de substâncias psicotrópicas anorexígenas. Diário Oficial da República Federativa [do] Brasil. Brasília, 6 set 2007. [acesso 2011 ago 29]. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2007/rdc/58_120907rdc.htm].
22. Mercosul/GMC/RES nº 39/99. Regulamento técnico sobre associações de drogas em medicamentos e preparações magistrais que contenham anorexígenos. [acesso 2011 ago 29]. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/mercosul/39_99.htm].
23. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 344, de 12 de maio de 1998. Regulamento técnico sobre substâncias e medicamentos sujeitos a controle especial. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 19 maio 1998. [acesso 2011 ago 29]. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/344_98.htm].
24. Brasil. Resolução nº 1.477, de 11 de julho de 1997, do Conselho Federal de Medicina. Dispõe sobre o uso de substâncias do tipo anfetaminas, isoladamente ou em associação com benzodiazepínicos, diuréticos, hormônios e laxantes, com finalidade exclusiva de tratamento de obesidade ou emagrecimento. [acesso 2011 ago 29]. Disponível em: [http://www.portalmedico.org.br/resolucoes/cfm/1997/1477_1997.htm].
25. Sweetman SC, organizador. Martindale: the complete drug reference. 33. ed. Londres: Pharmaceutical Press; 2002.
26. Goodman LS, Gilman AG. As bases farmacológicas da terapêutica. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill; 2003.
27. United States Pharmacopeial dispensing information: USP DI. 26. ed. Massachusetts: Micromedex; 2006.

Ensaio da membrana cório-alantoide (HET-CAM e CAM-TBS): alternativas para a avaliação toxicológica de produtos com baixo potencial de irritação ocular

Chorioallantoic membrane assays (HET-CAM and CAM-TBS): alternative tests for performing toxicological evaluation of products with low potential for ocular irritation

RIALA6/1447

Amanda Gleyce Lima de OLIVEIRA¹, Ronald Santos SILVA², Eloisa Nunes ALVES², Rosaura de Farias PRESGRAVE², Octavio Augusto França PRESGRAVE², Isabella Fernandes DELGADO^{3*}

*Endereço para correspondência: ³Vice-Diretoria de Pesquisa e Ensino, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – Fundação Oswaldo Cruz. Av. Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, CEP 21040-900. Tel.: (21) 3865-5163, fax: (21) 2290-0915. E-mail: isabella.delgado@incqs.fiocruz.br.

¹Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica – PIBIC/FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

²Departamento de Farmacologia e Toxicologia, INCQS/FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

Recebido: 21.10.2011 - Aceito para publicação: 06.02.2012

RESUMO

O presente estudo analisou o potencial preditivo de dois modelos que utilizam a membrana cório-alantoide de ovo embrionado de galinha (i.e. o HET-CAM e sua versão modificada, o CAM-TBS, que quantifica os danos à membrana por meio da absorção do corante azul trypan), como estratégia para a implementação de alternativas aos testes *in vivo* de avaliação de toxicidade ocular. Vinte colírios foram avaliados *in vivo* por meio do teste de irritação ocular de Draize e por ensaios *in vitro* utilizando-se testes HET-CAM e CAM-TBS. Todos os colírios foram classificados como não irritantes pelo teste *in vivo*. No ensaio HET-CAM, foram observados 4 resultados falso-positivos, e o teste apresentou especificidade e precisão de 80%. O CAM-TBS demonstrou melhor desempenho, pois a especificidade e a precisão foram de 100%. O ponto de corte adotado (*cut-off* = 0,9) no HET-CAM é discutido, uma vez que os resultados falso-positivos observados no presente estudo poderiam ter sido contornados caso a categoria “não irritante” englobasse produtos “não irritantes” e “irritantes leves”, à semelhança do critério preconizado para o CAM-TBS (*cut-off* = 7,0).

Palavras-chave. teste de Draize, irritação ocular, colírios, métodos alternativos, vigilância sanitária, toxicidade *in vitro*.

ABSTRACT

This study aimed at evaluating the predictive potential of the conventional Hen's Egg Chorionallantoic Membrane (HET-CAM) test and its version CAM-TBS, that quantifies the damage to the membrane cause by absorption of dye trypan blue, in order to propose an alternative assay for assessing the ocular toxicity. Twenty collyria were evaluated *in vivo* by means of Draize eye irritation test, and by *in vitro* HET-CAM and CAM-TBS assays. All the analyzed collyria were classified as non-irritant by *in vivo* testing. In HET-CAM assay, 4 false positive results were observed, and the test specificity and accuracy were of 80%. CAM-TBS showed a better performance, having specificity and accuracy of 100%. The cut-off set up for HET-CAM test (0.9) is discussed, as the false-positive results observed in this study could have been bypassed if the category “non-irritant” encompassed “non-irritant” and “mild irritant” products, in compliance with the criteria recommended for CAM-TBS (*cut-off* = 7.0).

Keywords. Draize test, ocular irritation, collyrium, alternative methods, sanitary surveillance, *in vitro* toxicology.

INTRODUÇÃO

O potencial irritante de diversos produtos e substâncias químicas, como agrotóxicos, cosméticos e medicamentos de uso tópico, é avaliado desde a década de 1940 por meio de experimentos com animais de laboratório. Alguns dos ensaios adotados com o objetivo de determinar o grau de irritabilidade, chamados de testes de irritação ocular ou cutânea, foram descritos inicialmente por John H. Draize^{1,2} e ainda hoje são adotados mundialmente por órgãos oficiais^{3,4}.

Com a busca global por substituir os testes *in vivo*, cientistas de diversas áreas passaram a desenvolver e apresentar resultados de métodos alternativos para demonstrar a segurança e a eficácia de seus produtos. Geralmente, ao se falar em métodos alternativos, pensa-se apenas na substituição, porém pode-se definir como método alternativo qualquer procedimento que possa ser utilizado para substituir, reduzir ou refinar o uso de animais em experimentação, a fim de minimizar a dor e o desconforto, conforme o princípio dos 3R's descrito por William Russell e Rex Burch em *The principles of humane experimental technique*^{5,6,7}.

Além de questões éticas, a procura por ensaios *in vitro* visa alcançar vantagens como: maior eficácia, menor custo e maior facilidade de difusão e incorporação de tais metodologias por outros laboratórios, sendo, portanto, uma questão de grande relevância para os laboratórios oficiais de controle da qualidade^{8,9}.

Nas últimas décadas, várias metodologias alternativas foram estudadas, porém poucas foram validadas, sendo necessário o aprofundamento de estudos sobre a aplicabilidade de alguns ensaios *in vitro*¹⁰. Entre as limitações descritas na literatura científica com relação à substituição do teste de irritação ocular de Draize, destaca-se o fato de que as metodologias alternativas, como o modelo HET-CAM, podem tanto subestimar^{11,12} como superestimar resultados obtidos *in vivo*¹³, dependendo de fatores como natureza da substância-teste, seu potencial irritante e a presença de efeitos irreversíveis *in vivo*. Embora alguns métodos alternativos ao teste de irritação ocular de Draize, como o teste de opacidade e permeabilidade de córnea bovina (BCOP, *bovine corneal opacity and permeability*) e o teste do olho enucleado de galinha (ICE, *isolated chicken eye*), tenham sido formalmente validados¹⁴, estes não se aplicam à avaliação de produtos com baixo potencial irritante, pois possuem boa capacidade de predição apenas para produtos corrosivos ou com potencial irritante severo.

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo a avaliação do potencial preditivo do modelo da membrana cório-alantoide de ovo embrionado de galinha (HET-CAM, *hen's egg test chorionallantoic membrane*) e de sua modificação (CAM-TBS, *chorionallantoic membrane - trypan blue staining*), que avalia os danos à membrana cório-alantoide pela quantidade do corante azul de trypan absorvido pela mesma, visando a propor alternativas para avaliação da toxicidade ocular de produtos com baixo potencial irritante.

METODOLOGIA

Amostras

Neste estudo, foram avaliados 20 colírios adquiridos no comércio do município do Rio de Janeiro, conforme Tabela 1. Todos os produtos foram codificados (Co01 a Co20) e testados sem diluição.

Teste de irritação ocular de Draize

Todos os dados utilizados neste estudo foram adquiridos no banco de dados do Setor de Irritação do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fiocruz. O teste *in vivo* foi realizado de acordo com o procedimento operacional padrão do INCQS¹⁵, sendo utilizada a classificação de Kay e Calandra modificada¹⁶.

No teste de Draize, para cada amostra, foram utilizados cinco coelhos da raça Nova Zelândia, tanto machos quanto fêmeas, hígidos e de peso corpóreo acima de 2 kg. Esses coelhos foram obtidos do Centro de Criação de Animais de Laboratório (Cecal/Fiocruz). Instilou-se 0,1 mL da amostra no saco conjuntival inferior e, logo após, massageou-se a área gentilmente num período de 30 segundos. Depois de aplicar a amostra, foram realizadas leituras no decorrer de 24, 48 e 72 horas e sete dias com o objetivo de observar as alterações macroscópicas que poderiam ocorrer nas estruturas do olho do coelho (córnea, íris e conjuntiva) e calcular a média dos escores máximo (MEM) por amostra analisada.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais da Fiocruz, sob o protocolo n. 79/09-1.

Ensaio *in vitro*

Cada colírio foi testado em triplicata, tanto no HET-CAM como no CAM-TBS, e o resultado final foi apresentado como a média de três ensaios independentes.

Para a realização dos testes *in vitro*, foram utilizados ovos fertilizados de galinha da raça Leghorn, livres de patógenos específicos (SPF, *specific pathogen free*), incubados por 10 dias à temperatura de $38,0 \pm 0,5$ °C e umidade relativa de aproximadamente 70%.

Ensaio HET-CAM

Para a realização de cada ensaio, foram utilizados 4 ovos por produto testado. No décimo dia de incubação, foi removida a casca do ovo ao redor da câmara de ar, evidenciando, assim, a membrana da casca. Esta foi removida cuidadosamente, a membrana cório-alantoide foi exposta, e foram aplicados nesta última 300 µL do produto. Depois de 20 segundos de contato, o produto foi removido, lavando-se a membrana cório-alantoide com solução salina isotônica a 37,0 °C. Durante 5 minutos, a membrana cório-alantoide foi examinada e as reações fisiológicas observadas foram graduadas em função de seu tempo de aparecimento, conforme indicado na Tabela 2.

Este ensaio foi realizado conforme a metodologia descrita no *Journal Officiel de la République Française*¹⁷.

A classificação final dos produtos, de acordo com seu potencial de irritabilidade no ensaio HET-CAM, está descrita na Tabela 3.

Ensaio CAM-TBS

O procedimento inicial dessa metodologia é semelhante ao do ensaio do HET-CAM, em que também foram utilizados 4 ovos, os quais, no décimo dia de incubação, tiveram a membrana cório-alantoide exposta. Sobre esta, foi colocado um anel de silicone para delimitar a área tratada. Foram aplicados 200 µL do produto sobre a membrana cório-alantoide, e, após 20 segundos, a área foi lavada com água destilada em temperatura ambiente. Depois da remoção do produto, foram aplicados 500 µL da solução corante azul de trypan a 0,1% (P/V), deixando agir por 1 minuto. Em seguida, o corante foi removido lavando-se a área tratada com uma pisseta contendo água destilada durante 20 segundos. Com auxílio de uma tesoura, a área tratada da membrana foi retirada e colocada em um tubo contendo 5 mL de formamida, o qual foi centrifugado com velocidade de 3.200 rpm por aproximadamente 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para uma cubeta de quartzo, e a leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm.

A quantidade de azul de trypan absorvido pela membrana cório-alantoide foi calculada usando-se a

seguinte equação: corante absorvido = absorbância x 5 nmol/1.000 × 10⁹.

A curva de calibração do corante foi feita com soluções de azul de trypan em formamida nas concentrações 10⁻⁶, 10⁻⁵ e 5 × 10⁻⁵ mol/L, lidas no espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm.

Este ensaio foi realizado conforme a metodologia descrita no protocolo INVITTOX n. 108¹⁸, e os produtos, classificados de acordo com a proposta de Lagarto¹⁹, conforme Tabela 4.

Análise estatística

Para determinação da sensibilidade, da especificidade e da precisão dos modelos HET-CAM e CAM-TBS, compararam-se os resultados *in vitro* com os resultados *in vivo* por meio de tabelas de contingência.

RESULTADOS

Pelos resultados obtidos das médias das triplicadas nos ensaios HET-CAM e CAM-TBS, foi possível classificar cada amostra de acordo com sua metodologia específica. Os resultados dessa classificação, assim como os valores médios obtidos, estão demonstrados na Tabela 5, que ainda traz a classificação obtida no teste de Draize, em que os valores de MEM variaram entre 0 e 0,8.

No ensaio HET-CAM, observamos 4 resultados falso-positivos, o que resultou em especificidade e precisão de 80%. O CAM-TBS demonstrou melhor desempenho, uma vez que os colírios Co03, Co05, Co7 e Co17, classificados como “irritantes leves” no ensaio HET-CAM, receberam a classificação “não irritante” no CAM-TBS, indicando especificidade e precisão superiores deste ensaio em reação ao modelo clássico HET-CAM.

A sensibilidade não pode ser calculada para nenhuma das metodologias *in vitro*, uma vez que todos os produtos foram classificados como não irritantes no coelho, não havendo, portanto, resultados positivos no modelo *in vivo*.

DISCUSSÃO

Quando os ensaios *in vivo* não podem ser substituídos por um único método alternativo, como parece ser a situação do teste de irritação ocular de Draize, deve ser levado em consideração o desenvolvimento de análise que inclua uma variedade de ensaios, em que os

Tabela 1. Formulação dos colírios analisados

Colírio	Composição
Co01	Fenolsulfonato de zinco (1,0 mg), cloridrato de nafazolina (0,5 mg). Veículo: sulfato de berberina, clorobutanol hidratado, cloreto de benzalcônio, citrato de sódio, glicerina, hidroxipropilcelulose e água purificada.
Co02	Cloridrato de metiltionínio (0,015 mg), cloridrato de tetrizolina (0,5 mg). Excipientes: hidroxipropilmetilcelulose, fosfato de sódio monobásico, fosfato dissódico, cloreto de sódio, cloreto de benzalcônio, edetato dissódico, água purificada.
Co03	Cloridrato de nafazolina (0,15 mg), sulfato de zinco (0,3 mg). Veículo: ácido bórico, borato de sódio, cloreto de benzalcônio, edetato dissódico, água para injetáveis.
Co04	Cloridrato de metiltionínio (0,15 mg), cloridrato de tetrizolina (0,5 mg). Veículo: ácido bórico, borato de sódio, cloreto de sódio, edetato dissódico, cloreto de benzalcônio como conservante e água destilada.
Co05	Clorobutanol (2,132 mg), ácido bórico (21,911 mg), cloreto de sódio (4,361 mg). Veículo: água purificada estéril.
Co06	Cloridrato de nafazolina (0,12 mg). Veículo: constituído de dextrano 70, hipromelose, cloreto de potássio, hidróxido de sódio e/ou ácido clorídrico, com edetato dissódico e cloreto de benzalcônio como conservante, e água purificada.
Co07	Álcool polivinílico (14 mg). Excipientes: cloreto de sódio, cloreto de benzalcônio, edetato dissódico, fosfato de sódio dibásico heptahidratado, fosfato de sódio monobásico monohidratado e água purificada.
Co08	Sulfato de condroitina (0,03 mg). Veículo: hialuronato de sódio, aprotinina, sorbato de potássio, cloreto de sódio, edetato dissódico e água purificada.
Co09	Dextrana 70 (0,001 g), hipromelose (0,003 g). Veículo: borato de sódio, cloreto de sódio, cloreto de potássio como conservante e água purificada.
Co10	Cloridrato de nafazolina (0,25 mg), maleato de feniramina (3 mg). Veículo: ácido bórico, borato de sódio, edetato dissódico, cloreto de benzalcônio como conservante e água purificada.
Co11	Pranoprofen (1 mg). Veículo: ácido bórico, borato de sódio, polissorbato 80, edetato dissódico, cloreto de benzalcônio e água purificada.
Co12	Cromoglicato dissódico (20 e 40 mg). Veículo: edetato de sódio, cloreto de benzalcônio como conservante e água purificada.
Co13	Cloridrato de tetrizolina (0,5 mg), sulfato de zinco (1 mL). Veículo: azul de metileno, ácido bórico, citrato de sódio, polisorbato 80, cloreto de benzalcônio e água purificada.
Co14	Dexametasona (1 mg), cloranfenicol (5 mg). Veículo: ácido bórico, borato de sódio, digluconato de clorexidina, edetato dissódico, cremophor RH40, plasdoni, bissulfito de sódio, creatinina e água purificada.
Co15	Hipromelose (5 mg). Veículo: fosfato de sódio dibásico, fosfato de sódio monobásico, cloreto de sódio, cloreto de potássio, citrato de sódio, edetato dissódico, metilparabeno, propilparabeno e água purificada.
Co16	Cloreto de benzalcônio (0,1 mg), ácido bórico (17 mg). Veículo: 0,1 mL de hidrolato de camomila, 0,1 mL de hidrolato de hamamelis, 3 mg de borato de sódio e água purificada.
Co17	Cloridrato de fenilefrina (100 mg). Veículo: citrato de sódio diidratado, metabissulfito de sódio, edetato dissódico, cloreto de benzalcônio e água purificada.
Co18	Cromoglicato dissódico (20 mg). Veículo: edetato dissódico, cloreto de benzalcônio como conservante e água purificada.
Co19	Sal sódico do ácido isopaglúmico (49 mg). Veículo: cloreto de benzalcônio e água purificada.
Co20	Dexametasona (0,05 mg), cloranfenicol (5 mg), cloridrato de tetrizolina (0,25 mg). Veículo: hipromelose, ácido bórico, borato de sódio, edetato dissódico, tiomersal, polivinilpirrolidona e água purificada.

Co = colírio.

Tabela 2. Gradação das alterações observadas na membrana córneo-alantoide do ovo embrionado de galinha

FENÔMENOS	TEMPO		
	≤ 30 segundos	30 segundos < t ≤ 2 minutos	2 minutos < t ≤ 5 minutos
Hiperemia	5	3	1
Hemorragia	7	5	3
Coagulação/Opacidade	9	7	5

Tabela 3. Classificação final do produto quanto ao seu potencial de irritabilidade no HET-CAM

Faixa (gradação das lesões)	Classificação
0,0 a 0,9	Não irritante (NI)
1,0 a 4,9	Irritante leve (IL)
5,0 a 8,9	Irritante moderado (IM)
9,0 a 21	Irritante severo (IS)

Fonte: *Journal Officiel de la Republique Française* (1996)

Tabela 4. Classificação final dos produtos quanto ao seu potencial de irritabilidade no ensaio CAM-TBS

Faixa (quantificação do corante)	Classificação
< 7,0	Não Irritante/Irritante Leve (NI)
7,0 a 14,5	Irritante Moderado (IM)
> 14,5	Irritante Severo (IS)

Fonte: LAGARTO et al., 2006

Tabela 5. Classificação obtida no teste de Draize em comparação com HET-CAM e CAM-TBS

Colírios	Draize		HET-CAM		CAM-TBS	
	MEM	Classificação	Média	Classificação	Média	Classificação
Co01	0	NI	0,88	NI	2,87	NI
Co02	0	NI	0,14	NI	3,57	NI
Co03	0	NI	1,20	IL	2,61	NI
Co04	0	NI	0,25	NI	1,69	NI
Co05	0	NI	1,12	IL	3,10	NI
Co06	0,4	NI	0,30	NI	1,69	NI
Co07	0	NI	2,45	IL	2,49	NI
Co08	0	NI	0,25	NI	1,03	NI
Co09	0	NI	0,65	NI	1,31	NI
Co10	0	NI	0,35	NI	3,17	NI
Co11	0,4	NI	0,25	NI	4,26	NI
Co12	0	NI	0,25	NI	3,36	NI
Co13	0	NI	0,18	NI	2,73	NI
Co14	0	NI	0,30	NI	1,50	NI
Co15	0	NI	0,17	NI	0,92	NI
Co16	0	NI	0,23	NI	3,65	NI
Co17	0,8	NI	2,23	IL	6,18	NI
Co18	0,4	NI	0,38	NI	4,70	NI
Co19	0	NI	0,27	NI	3,29	NI
Co20	0,4	NI	0,32	NI	1,09	NI
Sensibilidade				ND		ND
Especificidade				80%		100%
Precisão				80%		100%
Falso positivo				4		0
Falso negativo				ND		ND

Co = colírio; MEM = média do escore máximo; NI = não irritante; IL = irritante leve; ND: não determinado

animais sejam usados apenas para comprovar a ausência de irritação, reduzindo, assim, ao máximo o risco de expor ao sofrimento os animais em experimentação^{6,20,21}. Essa situação já se aplica no contexto da avaliação do potencial irritante ocular, uma vez que, para ingredientes com forte potencial irritante, os modelos BCOP e ICE estão disponíveis e com a devida aceitação regulatória²². Porém a avaliação de produtos acabados e com baixo potencial irritante é ainda um desafio.

O ensaio HET-CAM baseia-se na determinação de alterações macroscópicas que podem ocorrer na membrana cório-alantoide em decorrência da aplicação

de ingredientes com potencial irritante. Porém este método vem sendo criticado devido ao seu desfecho qualitativo e à subjetividade das leituras obtidas nas observações de hiperemia, hemorragia e coagulação/opacidade em função do tempo. Além disso, a subjetividade do desfecho do HET-CAM dificulta sua reprodutibilidade interlaboratorial, impactando negativamente em seu potencial de difusão/transferência para um grande número de laboratórios^{19,23}.

Foi neste contexto que o ensaio CAM-TBS foi desenvolvido e, hoje, agrega valor ao HET-CAM clássico, por meio da incorporação de uma leitura quantitativa, que

se dá pela medição do corante azul de trypan absorvido pelas células da membrana córneo-alantoide exposta^{24,25}. O azul de trypan é um corante com ampla utilização laboratorial, nos processos em que se faz necessária a distinção entre células viáveis e células mortas. Esta determinação, além da vantagem de oferecer resultado quantitativo, é muito simples e reprodutível²⁴ e ainda demonstra boa correlação entre a quantidade de corante absorvida pela membrana e o MEM obtido *in vivo*, com coeficiente de correlação de 0,91 segundo os autores que a propuseram²⁶.

Em estudo realizado por Lagarto e colaboradores¹⁹, 21 amostras foram avaliadas no CAM-TBS, incluindo substâncias químicas e produtos cosméticos. Os autores encontraram um coeficiente de correlação mais robusto para substâncias químicas isoladas ($r = 0,925$; $p < 0,0001$) do que para produtos acabados ($r = 0,688$; $p < 0,05$), indicando que, para misturas complexas, os resultados dos modelos de membrana córneo-alantoide de ovo embrionado de galinha devem ser avaliados com cautela. É também destes autores a proposta de ponto de corte para classificação do modelo CAM-TBS (*cut-off* = 7,0), conforme Tabela 4. Esta classificação agrega em uma única classe (NI) amostras “não irritantes” e “irritantes leves”, e parece ser a mais apropriada para comparação com o modelo *in vivo*. Tal constatação é reforçada pelos dados obtidos no presente estudo (Tabela 5). O ponto de corte adotado para o CAM-TBS (*cut-off* = 7,0) favoreceu a comparação entre *in vitro* e *in vivo*, conduzindo a uma precisão de 100% nas condições experimentais aqui propostas. Por outro lado, o ponto de corte preconizado pelo *Journal Officiel de la République Française*¹⁷ para o HET-CAM (*cut-off* = 0,9) levou a quatro resultados falso-positivos e a uma especificidade de apenas 80%. É importante apontar que a diferença encontrada em termos de precisão e especificidade entre HET-CAM e CAM-TBS deu-se única e exclusivamente devido à escolha dos pontos de corte, uma vez que, na sua totalidade, os colírios apresentaram valores menores no HET-CAM (faixa dos valores médios: 0,14-2,45) que no CAM-TBS (0,92-6,18). É digno de nota o fato de que, pelo menos no caso dos colírios aqui avaliados, tais resultados falso-positivos, teriam sido contornados caso o ponto de corte do HET-CAM englobasse “não irritantes” e “irritantes leves” (NI + IL = 4,9; Tabela 3), à semelhança da proposta de Lagarto et al.¹⁹. Por fim, vale ressaltar que, além da vantagem do desfecho quantitativo do ensaio CAM-TBS, o critério de classificação adotado no presente estudo parece ser o

mais apropriado, pelo menos para produtos com baixo potencial irritante.

CONCLUSÃO

Todos os colírios foram classificados como não irritantes no ensaio *in vivo*, e por isso não foi possível estabelecer a sensibilidade dos métodos *in vitro*. O CAM-TBS demonstrou melhor desempenho (especificidade e precisão de 100%) em relação ao HET-CAM (80%). A fim de reduzir o número de falso-positivos no HET-CAM, sugere-se a criação da categoria de baixo potencial irritante ocular, englobando as categorias “não irritantes” e “irritantes leves”, adotando o ponto de corte de 4,9. O CAM-TBS apresenta vantagens, como seu desfecho quantitativo e o critério de classificação adotado por Lagarto et al.¹⁹, que pelo menos para produtos com baixo potencial irritante parece ser o mais adequado.

AGRADECIMENTOS

Amanda Gleyce Lima de Oliveira é bolsista PIBIC (CNPq/Fiocruz), e Isabella Fernandes Delgado é bolsista de produtividade do CNPq. Este trabalho recebeu apoio financeiro do CNPq (MCT/CNPq 14/2008).

REFERÊNCIAS

1. Draize JH, Woodard G, Calvery HO. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J Pharmacol Exp Ther*. 1944;82:377-90.
2. Draize JH. Appraisal of the safety chemicals in foods, drugs and cosmetics. In: *Drugs and cosmetics: dermal toxicity*. Austin: Association of Food and Drug Officials of the United States; 1959. p. 46-59.
3. Cruz AS. Teste de citotoxicidade *in vitro* como alternativa ao teste *in vivo* de Draize na avaliação de produtos cosméticos. [tese de doutorado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2003.
4. Mehling A, Kleber M, Hensen H. Comparative studies on the ocular and dermal irritation potential of surfactants. *Food Chem Toxicol*. 2007;45(5):747-58.
5. Worth AP, Ball M. Alternative (non-animal) methods for chemical testing: current status and future prospects. *ATLA*. 2002;30(1):13-9.
6. Abreu CLC, Presgrave OAF, Delgado IF. Metodologias alternativas à experimentação animal: aplicação no controle da qualidade de produtos sujeitos à ação da Vigilância Sanitária. *Rev CFMV*. 2008;45:20-7.
7. Presgrave OAF, Caldeira C, Gimenes I, Freitas JCBR, Nogueira STB, Oliveira NDE, Oliveira AGL, Silva RS, Alves EN, Presgrave RF. Métodos alternativos ao uso de animais: uma visão atual. *Ciênc Vet Trop*. 2010;13(1):106-17.
8. Reinhardt V. *Taking better care of monkeys and apes*. Washington: Animal Welfare Institute; 2008.

9. Eun HC, Suh DH. Comprehensive outlook of *in vitro* tests for assessing skin irritancy as alternatives to Draize tests. *J Dermatol Sci*. 2000;24(2):77-91.
10. Mitjans M, Infante MR, Vinardell MP. Human hemoglobin denaturation as an alternative to the Draize test for predicting eye irritancy of surfactants. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2008;52(2):89-93.
11. Steiling W, Bracher M, Courtellemont P, Silva O. The HET-CAM, a useful *in vitro* assay for assessing the eye irritation properties of cosmetic formulations and ingredients. *Toxicol In Vitro*. 1999;13:375-84.
12. Schell J, Kleber M, Kreutz J, Lehringer E, Mehling A, Reisinger K, et al. Eye irritation potential: usefulness of the HET-CAM under the globally harmonized system of classification and labeling of chemicals (GHS). *Regul Toxicol Pharmacol*. 2011;59(3):471-92.
13. Nobrega AM, Alves EM, Presgrave RF, Costa RN, Delgado IF. Determination of eye irritation potential of low-irritant products: comparison of *in vitro* results with the *in vivo* Draize rabbit test. *Braz Arch Biol Technol*. 2012;55(3):381-8.
14. Organization for Economic Co-operation and Development – OECD. Guideline for the testing of chemicals: bovine corneal opacity and permeability test method for identifying ocular corrosives and severe irritants. Guideline 437. Paris; 2009.
15. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS (BR). Ensaio de irritação ocular. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2011.
16. Kay JH, Calandra JC. Interpretation of eye irritation tests. *J Soc Cosm Chem*. 1962;13:281-9.
17. Journal Officiel de la République Française. Arrête du 27 décembre 1996 relatif aux méthodes d'analyse nécessaires au contrôle de la composition des produits cosmétiques. Annexe IV: méthode officiel d'évaluation du potentiel irritant par application sur la membrane chorioallantoïdienne de l'œuf de poule, p. 19137-8.
18. Itagaki H, Hagino S, Kato S, Shinobu K. Protocolo 108, CAM-TBS Test. INVITTOX. 1996.
19. Lagarto A, Vega R, Guerra I, González R. *In vitro* quantitative determination of ophthalmic irritancy by the chorioallantoic membrane test with trypan blue staining as alternative to eye irritation test. *Toxicol In Vitro*. 2006;20:699-702.
20. Costa RN, Abreu CLC, Presgrave RF, Alves EN, Presgrave OAF, Delgado IF. A reassessment of the *in vitro* total protein content determination (TPC) with SIRC and 3T3 cells for the evaluation of the ocular irritation potential of shampoos: comparison with the *in vivo* Draize rabbit test. *Braz Arch Biol Technol*. 2011;54(6):1135-45.
21. Donahue DA, Kaufman LE, Avalos J, Simion FA, Cerven DR. Survey of ocular irritation predictive capacity using chorioallantoic membrane vascular assay (CAMVA) and bovine corneal opacity and permeability (BCOP) test historical data for 319 personal care products over fourteen years. *Toxicol In Vitro*. 2011;25(02):563-72.
22. ESAC Statement. Scientifically validated methods: the bovine corneal opacity and permeability (BCOP) and the isolated chicken eye (ICE) test method for eye irritation. [acesso 2009 jan 26]. Disponível em: [http://ecvam.jrc.it].
23. Garcia L, Gleiby M, Montes de Oca N, Hildalgo L. Estudio de la irritación ocular y dérmica de *Pochonia chalamydosporia* var. *catenulata*. *Rev Toxicol*. 2004;21:103-7.
24. Hagino S, Itagaki H, Kato S, Kobayashi T, Tanaka M. Quantitative evaluation to predict the eye irritancy of chemicals: modification of chorioallantoic membrane test by using trypan blue. *Toxicol In Vitro*. 1991;5(4):301-4.
25. Alves EN, Pregrave RF, Presgrave OAF, Sabagh FP, Freitas JC, Corrado AP. A Reassessment of the *in vitro* RBC haemolysis assay with defibinated sheep blood for the determination of the ocular irritation potential of cosmetic products: comparison with the *in vivo* Draize rabbit test. *Atla*. 2008;36(3):275-84.
26. Hagino S, Itagaki H, Kato S, Kobayashi T. Further evaluation of the quantitative chorioallantoic membrane test by using trypan blue to predict the eye irritancy of chemicals. *Toxicol In Vitro*. 1993;7:35-9.

Efeito do pinçamento tardio do cordão umbilical nos níveis séricos de ferritina de crianças de 0, 3 e 6 meses de vida

Effect of delayed umbilical cord clamping on ferritin contents in sera from full-term infants aged 0, 3 and 6 months of life

RIALA6/1448

Elizandra Leal STEFFEN^{1*}, José Edson Paz da SILVA¹, Ângela Regina Maciel WEINMANN², Paulo Afonso BELTRAME³

*Endereço para correspondência: ¹Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: elizlsteffen@hotmail.com

²Departamento de Pediatria e Puericultura, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS, Brasil.

³Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS, Brasil.

Recebido: 30.09.2010 - Aceito para publicação: 18.01.2012

RESUMO

Este estudo analisou o efeito do pinçamento tardio do cordão umbilical nos níveis de ferritina sérica de crianças de 0, 3 e 6 meses, que foi realizado no Centro Obstétrico do Hospital Universitário de Santa Maria-RS, Brasil, de maio de 2008 a abril de 2009. Foram analisados 101 recém-nascidos a termo, divididos em dois grupos: pinçamento precoce – de 0 segundo a 1 minuto após o nascimento (n = 41) e pinçamento tardio – de 1 a 3 minutos pós-nascimento (n = 60). Foram coletadas amostras de sangue venoso dos bebês, e a dosagem da ferritina sérica foi realizada no primeiro dia de vida, no terceiro e no sexto meses. Os resultados foram analisados pelo programa Statsoft Statistica v. 7.0.61.0EN. Para análise estatística foram utilizados teste Qui-Quadrado, teste de U Mann Whitney e teste de Correlação de Spearman. Os valores médios da ferritina no terceiro e no sexto meses mostraram-se superiores nas amostras de crianças do grupo de pinçamento tardio (111,82 ng/mL e 33,19 ng/mL, respectivamente) em relação às amostras do grupo de pinçamento precoce (97,79 ng/mL e 24,81 ng/mL, respectivamente). Estes dados fundamentam a alternativa de intervenção sustentável, de baixo custo e segura para integrar programas que visem à redução da deficiência de ferro em crianças, principalmente em países em desenvolvimento.

Palavras-chave. pinçamento, cordão umbilical, ferritina.

ABSTRACT

This study assessed the effect of delayed umbilical cord clamping on ferritin contents in serum samples from full-term infants aged 0, 3 and 6 months. This study was carried out at the Obstetric Center of the University Hospital of Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil, from May 2008 to April 2009. 101 full-term newborns were divided into two groups: early cord clamp – from 0 second to 1 minute after birth (n = 41); and late cord clamp – from 1 to 3 minutes after birth (n = 60). Venous blood samples were collected from infants at the 1st life day, and at 3rd and 6th months. The results were analyzed by Statsoft Statistica v. 7.0 6.1.0 EN. The tests 'Qui-square', 'U Mann Whitney' and Spearman's correlation were used for statistical analyses. The mean values of ferritin in the 3rd and 6th months samples showed to be superior in infants of the late clamping group (111.82 ng/mL and 33.19 ng/mL, respectively) than in samples from children of early clamping group (97.79 ng/mL e 24.81 ng/mL). These findings evidenced an alternative for a sustainable intervention, safe and of low cost to integrate programs which aim at the reduction of iron deficiency anemia in infants, mainly in developing countries.

Keywords. clamping, umbilical cord, ferritin.

INTRODUÇÃO

A anemia por deficiência de ferro é a carência nutricional mais grave e frequente em todo o mundo, sendo que, depois das gestantes, as crianças são as mais atingidas^{1,2}. Em países em desenvolvimento, como o Brasil, por exemplo, estima-se que aproximadamente 5 milhões de crianças menores de 4 anos sejam anêmicas. Em Porto Alegre-RS, um inquérito de base populacional revelou prevalência de 47,8% de crianças menores de 5 anos com anemia³. Entre as consequências desta patologia estão a diminuição da capacidade cognitiva, distúrbios comportamentais, falta de memória, baixa concentração mental, déficit de crescimento, diminuição da força muscular e da atividade física, além de maior suscetibilidade a doenças infecciosas².

Embora vários fatores possam levar a essa condição, admite-se que a ocorrência endêmica da anemia na infância decorra da combinação entre necessidades excepcionalmente elevadas de ferro impostas pelo crescimento e dietas pobres do mineral, sobretudo ferro de alta biodisponibilidade¹. Alternativamente, o tempo de pinçamento do cordão umbilical (precoce ou tardio) afeta o volume de sangue transferido da placenta para o recém-nascido (RN) e, conseqüentemente, o volume total de ferro, sendo uma alternativa simples de prevenir a anemia⁴.

O pinçamento tardio (de 1 a 3 minutos após o nascimento) está associado a maiores concentrações de hemoglobina e estoques mais elevados de ferro nos seis primeiros meses de vida dos lactentes, diminuindo a incidência de anemia e demonstrando que o tempo de pinçamento influencia não só os parâmetros hematológicos encontrados durante a primeira semana de vida do RN como seu efeito pode prolongar-se durante todo o primeiro ano de idade^{5,6,7,8,9}.

Tolosa et al.¹⁰ sugerem que o cordão umbilical seja pinçado alguns minutos depois do nascimento pelo fato de o sangue do cordão ser um “primeiro e natural transplante de células-tronco”, células estas que podem ajudar a evitar, além da anemia, problemas relacionados a baixo desenvolvimento de órgãos – um dos mais comuns em recém-nascidos –, doenças respiratórias crônicas, problemas de visão, septicemia e até hemorragia cerebral.

No entanto, talvez pelo fato de complicações como icterícia e policitemia estarem relacionadas a um maior volume sanguíneo transferido ao RN^{11,12}, o pinçamento imediato do cordão ao nascimento ainda é

o procedimento adotado na maioria das maternidades, mas essa recomendação vem sofrendo críticas em função de seu potencial impacto sobre a saúde do RN^{10,13}.

Neilson⁸, em uma ampla revisão, constatou que o pinçamento tardio aumenta o risco de icterícia. Por outro lado, concluiu que pinçar o cordão pelo menos 2 ou 3 minutos após o nascimento melhora as reservas de ferro dos RN. Quanto a policitemia, Shirvani et al.¹² não observaram nenhum caso de policitemia nos RN submetidos a pinçamento tardio.

Desta forma, o presente estudo é de grande importância para obstetras, pediatras e neonatologistas, pois envolve uma prática obstétrica que pode repercutir posteriormente nos níveis de ferritina, como foi demonstrado claramente nos resultados, diminuindo assim a anemia infantil. Contribui, também, para a difusão dos conhecimentos nesta área, em que os estudos nacionais são restritos e não acompanham as crianças em longo prazo (até 6 meses de vida).

O presente estudo tem como objetivo avaliar os efeitos do pinçamento tardio do cordão umbilical nos níveis de ferritina sérica de crianças de 0, 3 e 6 meses de vida.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado no Hospital Universitário de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil, entre os meses de maio de 2008 a abril de 2009. O Centro Obstétrico do referido hospital realizava em torno de 150 partos/mês, entre normais e cesáreas, adotando como rotina o pinçamento precoce do cordão umbilical, ou seja, imediatamente após o nascimento do bebê.

Realizou-se um estudo de intervenção, no qual 101 recém-nascidos (RN) foram alocados em dois grupos:

- Pinçamento do cordão de 0 segundo a 1 minuto após o nascimento – pinçamento precoce (n = 41);
- Pinçamento do cordão entre 1 a 3 minutos após o nascimento – pinçamento tardio (n = 60).

A intervenção caracterizou-se pelo pinçamento do cordão a partir de 1 minuto após o nascimento (pinçamento tardio) e pela manutenção do RN no mesmo nível da placenta durante esse tempo. Conforme as condições apresentadas pelos bebês ao nascimento, tais como respiração, tônus muscular e cor da pele, estes

eram pinçados breve ou tardiamente e subdivididos nos grupos de pinçamento precoce ou tardio.

Foram incluídas no estudo crianças nascidas a termo (37 semanas de gestação em diante), de parto normal ou cesárea e saudáveis. Foram considerados fatores de exclusão as gestações e partos de risco, tais como a sensibilização Rh, o parto prematuro, o sofrimento fetal com depressão neonatal grave, o parto gemelar e o parto de gestante HIV positivo, pois, nestes casos, o pinçamento tardio do cordão poderia causar complicações, sendo, por isso, evitados.

A captação dos RN para a pesquisa ocorreu entre maio a outubro de 2008. Primeiramente, foi apresentado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido às gestantes que se enquadravam nos critérios de inclusão do estudo, o qual foi assinado pelas mesmas quando estas se dispunham a participar, junto com seus bebês, da intervenção (pinçamento precoce ou tardio do cordão) e das coletas posteriores ao nascimento. Também foi efetuada a aplicação de um questionário às mães dos RN participantes para obtenção de alguns dados pessoais e pré-natais, ao qual posteriormente foram anexados os acontecimentos relacionados ao parto e as condições de nascimento do bebê; cronometragem do tempo de pinçamento do cordão (cronômetro Technos[®]); e coleta de sangue venoso (1 mL de sangue em tubo com gel separador) dos RN para dosagem da ferritina sérica ainda no primeiro dia de vida, aos 3 e aos 6 meses.

As coletas de sangue do terceiro e sexto meses de vida dos RN foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas do próprio hospital, mediante agendamento prévio durante o período de internação das mães na maternidade e reforçado próximo à data do exame por meio de telefonema. Nos retornos de seguimento, as mães foram questionadas quanto à alimentação e à administração de suplementos vitamínicos para a criança.

As dosagens de ferritina foram efetuadas no equipamento Immulite (Euro/DPC Ltda., Reino Unido) pelo método da quimioluminescência, e os resultados foram expressos em nanogramas por mililitro de sangue (ng/mL).

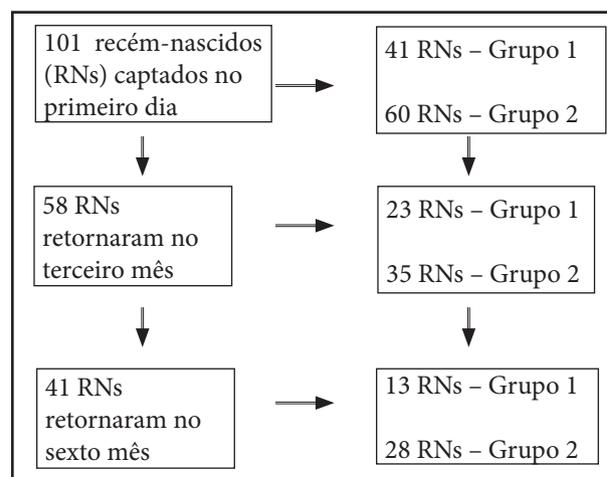
As análises estatísticas foram efetuadas no programa Statsoft Statistica v. 7.0.61.0EN, e os resultados estão expressos em média. Foram utilizados o teste Qui-Quadrado, o teste de U Mann Whitney e o teste de Correlação de Spearman.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa

Maria em seus aspectos éticos e metodológicos, de acordo com as diretrizes estabelecidas na Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde, CAAE: 0051.0.243.000-08.

RESULTADOS

Dos 101 casos captados inicialmente, 41 foram de pinçamento precoce e 60 de pinçamento tardio, conforme ilustra a Figura 1. As perdas ocorreram em função do não comparecimento das mães aos retornos para coleta de sangue venoso dos seus filhos no terceiro e/ou sexto mês de vida, ou ainda coleta de material insuficiente para análise.



Grupo 1: Pinçamento imediato; Grupo 2: Pinçamento tardio.

Figura 1. Fluxograma da amostra

A Tabela 1 descreve algumas características das mães, de acordo com os aspectos socioeconômicos e específicos da gestação, e também algumas características apresentadas pelas crianças ao nascimento e ao longo dos seis primeiros meses de vida, segundo o procedimento adotado no pinçamento do cordão umbilical.

Nos dois grupos, pinçamento precoce e pinçamento tardio, os resultados revelaram mães jovens, em média com 25,5 anos, com escolaridade por volta de oito anos de estudo. Na gestação atual, compareceram em média a seis consultas pré-natais, em sua maioria não fumaram durante a gestação (78,5%), fizeram uso de complexo vitamínico e/ou sulfato ferroso (84%), e a maioria foi submetida a cesariana.

Com relação aos RN, observou-se semelhança na proporção de crianças nascidas do sexo masculino e feminino. A média de peso ao nascer entre os dois grupos

foi de 3.430,93 g (3.378,90 no pinçamento precoce e 3.482,97 no pinçamento tardio), e, para a maior parte das crianças dos dois grupos (87,4%), não foi administrado sulfato ferroso antes dos 6 meses de vida (90,9% das submetidas ao pinçamento precoce e 84% das submetidas ao pinçamento tardio).

Na Tabela 2, são apresentados os resultados encontrados na dosagem da ferritina sérica no primeiro

dia de vida, aos 3 e aos 6 meses, das crianças submetidas ao pinçamento precoce e tardio. Os valores médios da ferritina do terceiro e sexto meses de vida no pinçamento tardio foram superiores em relação ao pinçamento precoce do cordão. E a variação da ferritina do primeiro dia de vida para o terceiro mês apresentou diferença significativa entre os grupos de pinçamento ($p = 0,0133$). No pinçamento tardio, foi melhor preservada.

Tabela 1. Caracterização das mães e crianças quanto aos aspectos pré-natais e natais nos diferentes grupos de pinçamento do cordão umbilical

Características	Pinçamento imediato					Pinçamento tardio					Variação da % da \bar{x} entre os pinçamentos	p-valor
	n	\bar{x}	s	CV	$\frac{s}{\sqrt{n}}$	n	\bar{x}	s	CV	$\frac{s}{\sqrt{n}}$		
Idade da mãe	45	25,02	6,53	0,26	0,97	66	26,02	7,53	0,29	0,93	4,00%	0,5642
Escolaridade da mãe	43	7,81	2,50	0,32	0,38	61	8,59	2,87	0,33	0,37	9,99%	0,1539
Nº de consultas pré-natal	36	6,28	2,19	0,35	0,36	62	7,03	2,84	0,40	0,36	11,94%	0,2311
Mãe fumante	14	31,1%				8	12%					0,0154*
Mãe não fumante	31	68,9%				57	88%					
Complexo vit. durante a gestação – sim	36	81,8%				54	86%					0,5875
Complexo vit. durante a gestação – não	8	18,2%				9	14%					
Tipo de parto – cesárea	26	59,1%				48	73,8%					0,1055
Tipo de parto – vaginal	18	40,9%				17	27%					
Peso do RN	41	3378,90	490,80	0,15	76,65	65	3482,97	463,47	0,13	57,49		3,08%
RN sexo feminino	20	44,4%				31	47%					0,7932
RN sexo masculino	25	56,6%				35	53%					
Sulfato ferroso antes dos 6 meses – sim	4	9,1%				10	16%					0,3060
Sulfato ferroso antes dos 6 meses – não	40	90,9%				53	84%					

% - percentual; \bar{x} - média; s - desvio-padrão; CV - coeficiente de variação; $\frac{s}{\sqrt{n}}$ - erro padrão

*diferença estatisticamente significativa

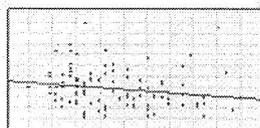
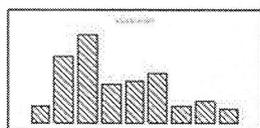
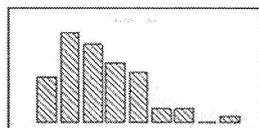
Teste Qui-Quadrado para proporções; Teste Não-Paramétrico U Mann Whitney para diferença entre grupos.

A) Ferritina 1º dia × idade mãe

$r = 0,2702$

Idade Mãe (anos)

Ferritina 1º dia



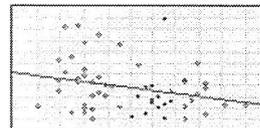
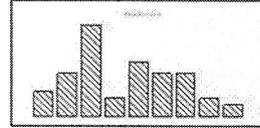
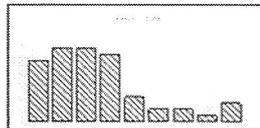
Concentração (ng/mL)

B) Ferritina 3º mês × idade mãe

$r = 0,2977$

Idade Mãe (anos)

Ferritina 3º mês



Concentração (ng/mL)

Figura 2. Ferritina versus idade da mãe do RN

Tabela 2. Valores da ferritina das crianças ao nascimento, aos 3 meses e aos 6 meses de vida, segundo o tipo de pinçamento do cordão umbilical

Características	Pinçamento imediato					Pinçamento tardio					Variação da % da \bar{x} do pinçamento imediato para o tardio	p - valor
	N	\bar{x}	s	CV	$\frac{s}{\sqrt{n}}$	N	\bar{x}	s	CV	$\frac{s}{\sqrt{n}}$		
Ferritina 1º dia vida	41	243,39	139,95	0,58	21,86	60	216,04	115,27	0,53	14,88	-11.24%	0,403
Ferritina 3º mês	23	97,79	83,60	0,85	17,43	35	111,82	71,01	0,64	12,00	14.35%	0,3090
Ferritina 6º mês	13	24,81	24,90	1,00	6,91	28	33,19	31,90	0,96	6,03	33.78%	0,2074
Variação %Fer 1º dia/3º mês	23	-57%	29%	0,52	0,061	32	-13%	77%	5,76	0,135		0,0133*
Variação %Fer 1º dia/ 6ºmês	13	-89%	10%	0,11	0,028	26	-78%	21%	0,27	0,042		0,1287
Variação %Fer 3ºmês/6ºmês	12	-71%	40%	0,56	0,115	20	-70%	30%	0,43	0,067		0,5081

% - percentual; \bar{x} - média; s - desvio padrão; CV - coeficiente de variação; $\frac{s}{\sqrt{n}}$ - erro padrão

*diferença estatisticamente significativa

Teste Não-Paramétrico U Mann Whitney para diferença entre grupos

Já a Figura 2 mostra uma correlação significativa entre a ferritina do primeiro dia de vida (A) e do terceiro mês (B) e a idade da mãe do RN.

DISCUSSÃO

Desde já, é importante considerar que o número de perdas no seguimento, superior ao esperado, poderia comprometer a qualidade dos resultados, porém os cuidados metodológicos adotados neste estudo garantiram a qualidade das informações e a possibilidade de se discutirem os achados frente aos resultados dos poucos estudos que tratam de avaliar os efeitos do pinçamento tardio sobre os níveis de ferritina sérica ao longo dos seis primeiros meses de vida.

Os resultados deste estudo confirmam que o pinçamento tardio do cordão umbilical (1 minuto após o nascimento em diante) tem efeito positivo sobre os níveis de ferritina no terceiro e sexto meses de vida, pois seus valores médios (111,82 ng/mL e 33,19 ng/mL, respectivamente) mostraram-se superiores aos valores médios da ferritina sérica encontrada no terceiro (97,79 ng/mL) e no sexto meses (24,81 ng/mL) no pinçamento precoce. No estudo conduzido por Cernadas et al.⁹, o valor médio da ferritina aos 6 meses de idade também foi mais alto no grupo pinçado aos 3 minutos (33,2 µg/L) que no grupo pinçado imediatamente após o nascimento (20,9 µg/L). E os resultados publicados por Chaparro et al.⁵ mostraram diferenças significativas nos depósitos de

ferro aos 6 meses de vida (27-47 mg de ferro a mais) de crianças com pinçamento do cordão aos 2 minutos em comparação àquelas submetidas ao pinçamento imediato.

Em nossos resultados, houve uma diferença significativa na variação da ferritina sérica do primeiro dia de vida para o terceiro mês. No pinçamento tardio, os níveis de ferritina dos RN no primeiro dia de vida comparados com os dosados no terceiro mês sofreram uma queda menor (-13%) e foram mais bem preservados do que no pinçamento precoce (-57%). Venâncio et al.⁷ efetuaram dosagens de ferritina do cordão umbilical ao nascimento e do sangue venoso no terceiro mês de vida e constataram que a intervenção realizada foi responsável por um incremento de 23,29 ng/mL na média de ferritina aos 3 meses de idade.

Também encontramos uma correlação significativa entre a ferritina sérica do primeiro dia de vida e do terceiro mês e a idade da mãe do RN: quanto maior era a idade da mãe, menor foi o valor da ferritina da criança. No entanto, nenhum relato que mencione esta associação foi publicado; sendo assim, sugere-se que mais estudos sejam efetuados para avaliar tal correlação.

Desta forma, os resultados encontrados neste estudo mostram que o pinçamento tardio do cordão umbilical de recém-nascidos a termo melhorou consideravelmente o aporte de ferro de lactentes de 3 e 6 meses de idade (um incremento de 14,03 ng/mL na média da ferritina no terceiro mês e 8,38 ng/mL no sexto mês) e que essa técnica consiste em uma alternativa

adicional de intervenção sustentável, de baixo custo e estratégia segura para integrar programas que visem à redução de anemia por deficiência de ferro em crianças, principalmente de países em desenvolvimento, onde há alta prevalência de anemia na infância.

REFERÊNCIAS

1. Monteiro CA, Szarfac SC, Mondini L. Tendência secular da anemia na infância na cidade de São Paulo (1984-1996). *Rev Saúde Pública*. 2000;34(6 Supl):62-72.
2. United Nations Children's Fund. United Nations University. World Health Organization. Iron deficiency anemia, assessment, prevention and control: a guide for programme managers. Geneva: World Health Organization; 2001.
3. Silva LSM, Giugliani ERJ, Aerts DRGC. Prevalence and risk factors for anemia among children in Brazil. *Rev Saúde Pública*. 2001;35:66-73.
4. van Rheeën PF, Brabin BJ. A practical approach to timing cord clamping in resource poor settings. *BMJ* 2006;333:954-8.
5. Chaparro CM, Neufeld LM, Tena Alavez G, Eguia-Liz, Cedillo R, Dewey KG. Effect of timing of umbilical cord clamping on iron status in Mexican infants: a randomized controlled Trial. *Lancet*. 2006;367(9527):1997.
6. Hutton EK, Hassan ES. Late vs. early clamping of the umbilical cord in full-term neonates review and meta-analysis of controlled trials. *JAMA*. 2007;97(11):1241-52.
7. Venâncio SI, Levy RB, Saldiva, SRDM, Mondini L, Alves MCGP, Leung SL. Efeitos do tempo de clampeamento tardio do cordão umbilical sobre os níveis de hemoglobina e ferritina em lactentes aos três meses de vida. *Cad Saúde Pública*. 2008;24 (Sup 2):S323-31.
8. Neilson JP. Cochrane Update: Effect of timing of umbilical cord clamping at birth of term infants on mother and baby outcomes. *Obstet Gynecol*. 2008;112(1):177-8.
9. Ceriani Cernadas JM, Carroli G, Pellegrini L, Ferreira M, Ricci C, Casas O, et al. The effect of early and delayed umbilical cord clamping on ferritin levels in term infants at six months of life: a randomized, controlled trial. *Arch Argent Pediatr*. 2010;108(3):201-8.
10. Tolosa JN, Park DH, Eve DJ, Klasko SK, Borlongan CV, Sanberg PR. Mankind's first natural stem cell transplant. *J Cell Mol Med*. 2010;14(3):488-95.
11. Wiswell TE, Cornish JD, Northam RS. Neonatal polycythemia: frequency of clinical manifestations and other associated findings. *Pediatrics*. 1986;78:26-30.
12. Shirvani F, Radfar M, Hashemieh M, Soltanzadeh MH, Khaledi H, Mogadam MA. Effect of timing of umbilical cord clamp on newborns' iron status and its relation to delivery type. *Arch Iran Med*. 2010;13(5):420-5.
13. Mercer JS, Skovgaard R. Neonatal transitional physiology: a new paradigm. *J Perinatol Neonat Nurs*. 2002;15:56-75.

Avaliação da expressão dos antígenos Ki-67 e CD71 em células blásticas CD34 positivas nas leucemias agudas

Determination of Ki-67 and CD71 antigens expression on CD34-positive blastic cells in acute leukaemias

RIALA6/1449

Heliana Trindade MARINHO^{1*}, Elda Pereira NORONHA¹, Érika Bárbara Abreu Fonseca THOMAZ³, Geni Lourdes de Resende Ramos VERAS⁴, Raimundo Antônio Gomes OLIVEIRA^{1,2}

*Endereço para correspondência: ¹Centro de Pesquisa Clínica do Maranhão, Hospital Universitário Presidente Dutra (HUUFMA), Rua Almirante Tamandaré, 01, Centro. CEP 65020-600, São Luís, MA, Brasil. E-mails: helianamarinho@yahoo.com.br.

²Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, Brasil.

³Departamento de Saúde Pública, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, Brasil.

⁴Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello (IMOAB).

Recebido: 21.04.2011 - Aceito para publicação: 15.02.2012

RESUMO

Foram avaliadas a expressão de marcadores Ki-67 e CD71 nas células imaturas CD34+ em pacientes com leucemias agudas (LA) e a associação entre esses marcadores. Foram selecionados 54 pacientes com LA atendidos no Centro Oncológico de Referência do estado do Maranhão, de dezembro/2008 a novembro/2009. A expressão de Ki-67 e CD71 foi determinada por citometria de fluxo, em células positivas para o marcador de células imaturas CD34. Dos 54 pacientes, 34 (63,0%) eram portadores de leucemias linfoides agudas (LLA), destes, 73,5% eram do tipo B (LLAB) e 26,5% do tipo T (LLAT). A maior expressão de Ki-67 em medula óssea (MO) e sangue periférico (SP) foi detectada na LLAB; e, nas amostras de MO, o CD71 apresentou maior expressão na LLAT. Em SP, houve maior expressão do CD71 nas LMA. Houve associação entre o Ki-67 e o CD71 em MO na LMA e, em SP, na LLAB. A expressão do Ki-67 nas leucemias agudas não diferiu nas amostras estudadas; contudo, diferenças na expressão do CD71 foram maiores na LLAT em MO e em SP na LMA. Esses achados serão úteis no diagnóstico e no monitoramento de pacientes leucêmicos quanto à agressividade neoplásica pela detecção dos marcadores de proliferação celular.

Palavras-chaves. leucemia aguda, proliferação celular, Ki-67, CD71.

ABSTRACT

The expression of Ki-67 and CD71 was determined on the immature CD34+ cells from patients with acute leukaemias (AL) and the relationship between the markers was established. 54 patients with AL were selected from December 2008 to November 2009 at Oncology Reference Center, Maranhão, Brazil. Ki-67 and CD71 expression was determined by flow cytometry in cells positive for immaturity marker CD34. Of 54 patients, 34 (63.0%) had acute lymphoid leukaemias (ALL), and 73.5% of them were type B (ALL-B) and 26.5% type T (ALL-T). The highest Ki-67 expression in bone marrow (BM) and peripheral blood (PB) was found in ALL-B than in ALL-T or acute myeloid leukaemia (AML). The highest CD71 expression was detected in BM samples from ALL-T and in PB samples from AML. An association between Ki-67 and CD71 in BM from AML and in PB from ALL-B was observed. The expression of Ki-67 in acute leukaemias did not differ in the analyzed samples; however, great differences in CD71 expression were observed in BM from ALL-T and in PB from AML. These findings will be useful for diagnosis purposes and for monitoring leukemic patients by detecting the neoplastic cell proliferation markers.

Keywords. acute leukemia, cell proliferation, Ki-67, CD71.

INTRODUÇÃO

As leucemias agudas são um grupo heterogêneo de neoplasias primárias da medula óssea caracterizadas pela substituição dos elementos medulares e sanguíneos normais por células imaturas denominadas blastos, bem como pelo acúmulo dessas células em outros tecidos. Uma das bases importantes da patogênese da leucemia é a proliferação celular desordenada^{1,2}.

A proliferação celular é definida como o aumento do número de células, resultante da complementação do ciclo celular. Este ciclo engloba uma cascata de eventos, processados de maneira ordenada, assegurando a duplicação fiel dos componentes celulares em uma sequência lógica e a divisão desses componentes em duas células-filhas³. A citometria de fluxo vem sendo muito utilizada para quantificar a taxa de proliferação celular, além de detectar e diferenciar leucemias⁴.

A expressão da proteína humana Ki-67 é estreitamente associada com a proliferação celular. O fato de estar presente durante todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e mitose) e não estar nas células em repouso (G0) faz do Ki-67 excelente marcador para determinar a fração do crescimento de uma população celular⁵.

O receptor de transferrina (CD71) é uma proteína expressa na membrana que desempenha um papel central no metabolismo do ferro. Seu ligante, a transferrina, se liga ao ferro férrico e o entrega às células⁶. O CD71 desempenha um papel significativo na proliferação celular, sendo expresso na maioria das células em divisão e com expressão regulada positivamente mediante ativação celular⁷.

Considerando-se que a proliferação celular está intimamente ligada à agressividade neoplásica e a maioria dos estudos de proliferação celular em leucemias utiliza a imunocitoquímica, esta pesquisa tem por objetivos quantificar a expressão dos antígenos Ki-67 e CD71 por citometria de fluxo e associar os dois marcadores entre si, nas células imaturas (blastos), positivas para CD34+ em pacientes com leucemias agudas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram diagnosticados com leucemia aguda 60 pacientes, divididos em faixa etária infanto-juvenil (< 19 anos) e faixa etária adulta (\geq 19 anos)⁸, no Centro Oncológico de Referência do estado do Maranhão (no

Nordeste brasileiro) entre dezembro de 2008 e novembro de 2009 (doze meses). Foram excluídos dos estudos de proliferação celular 4 pacientes que perderam a expressão do CD34, o que impossibilitaria a análise da proliferação apenas nas células neoplásicas, e 2 pacientes diagnosticados com leucemia bifenotípica aguda, pois constitui uma população muito pequena para avaliação estatística. Isso possibilitou a análise da proliferação celular em um total de 54 pacientes.

O diagnóstico das leucemias agudas foi baseado no aspecto citomorfológico e imunofenotípico dos blastos em medula óssea ou sangue periférico. A imunofenotipagem foi realizada por citometria de fluxo utilizando-se um painel de anticorpos monoclonais (Becton Dickinson, San José, Califórnia, Estados Unidos) marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) e proteína piridina de clorofila (PerCP), direcionados contra antígenos de células precursoras e antígenos da linhagem B, T ou mieloide. As LMA foram classificadas de acordo com os critérios da classificação franco-americana-britânica (FAB)^{9,10} e do Grupo Europeu para Caracterização Imunológica das Leucemias (EGIL)¹¹. A classificação das LLA foi feita com base nos conceitos do grupo EGIL¹².

Esta pesquisa integra um projeto submetido à apreciação pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) e aprovado (parecer consubstanciado 115/2008) em 11 de março de 2008, conforme as diretrizes descritas na Resolução n. 196/96.

Estudos de Proliferação Celular

A determinação dos antígenos Ki-67 e CD71 foi estudada nos blastos CD34 positivos do sangue periférico e na medula óssea dos pacientes portadores de LLA (B e T) e LMA.

A determinação da expressão do antígeno Ki-67 nas células blásticas CD34 positivas por citometria de fluxo foi realizada usando-se o anticorpo monoclonal anti-Ki-67 conjugado com FITC (Becton Dickinson) e o anticorpo anti-CD34, marcador de células precursoras, conjugado com PE (Becton Dickinson).

Resumidamente, a suspensão celular foi ajustada para uma concentração de 1×10^6 células por tubo. Primeiramente, foi realizada marcação em membrana através do anticorpo monoclonal CD34 PE, seguida de incubação em câmara escura. Foi então adicionada solução de lise (Becton Dickinson, FACS Lysing Solution)

diluída 1:10 em água destilada, com posterior incubação à temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada e o sedimento ressuspensionado em PBS 1%, seguido de nova centrifugação. Para marcação em citoplasma, após descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensionadas em solução de tampão permeabilizante (BD FACS[®] Permeabilizing Solution), incubadas e, posteriormente, centrifugadas, seguido pelo descarte do sobrenadante. Ao sedimento, foi adicionado o anticorpo anti-Ki-67 FITC de acordo com recomendações técnicas do fabricante, e ao tubo controle, foi adicionado o controle isotópico. Os tubos foram incubados em câmara escura à temperatura ambiente. Após incubação, realizou-se a lavagem com

PBS 1% e centrifugação, descartando-se o sobrenadante. Ao sedimento, foi adicionado paraformaldeído 1% (Paraformaldehyde, Sigma-Aldrich), preservando-o à temperatura de 4 °C, ao abrigo da luz.

A determinação do CD71 seguiu o mesmo protocolo técnico utilizado para o Ki67, com exceção de que, para o CD71, usaram-se os anticorpos anti-CD71 FITC e anti-CD34 PE, com marcação apenas em membrana.

Após a marcação dos anticorpos monoclonais, foram realizadas leituras e análises em citômetro de fluxo (FACSCalibur, da Becton Dickinson), utilizando-se o Cell Quest software, versão 3.1 (Cell Quest[™] Software,

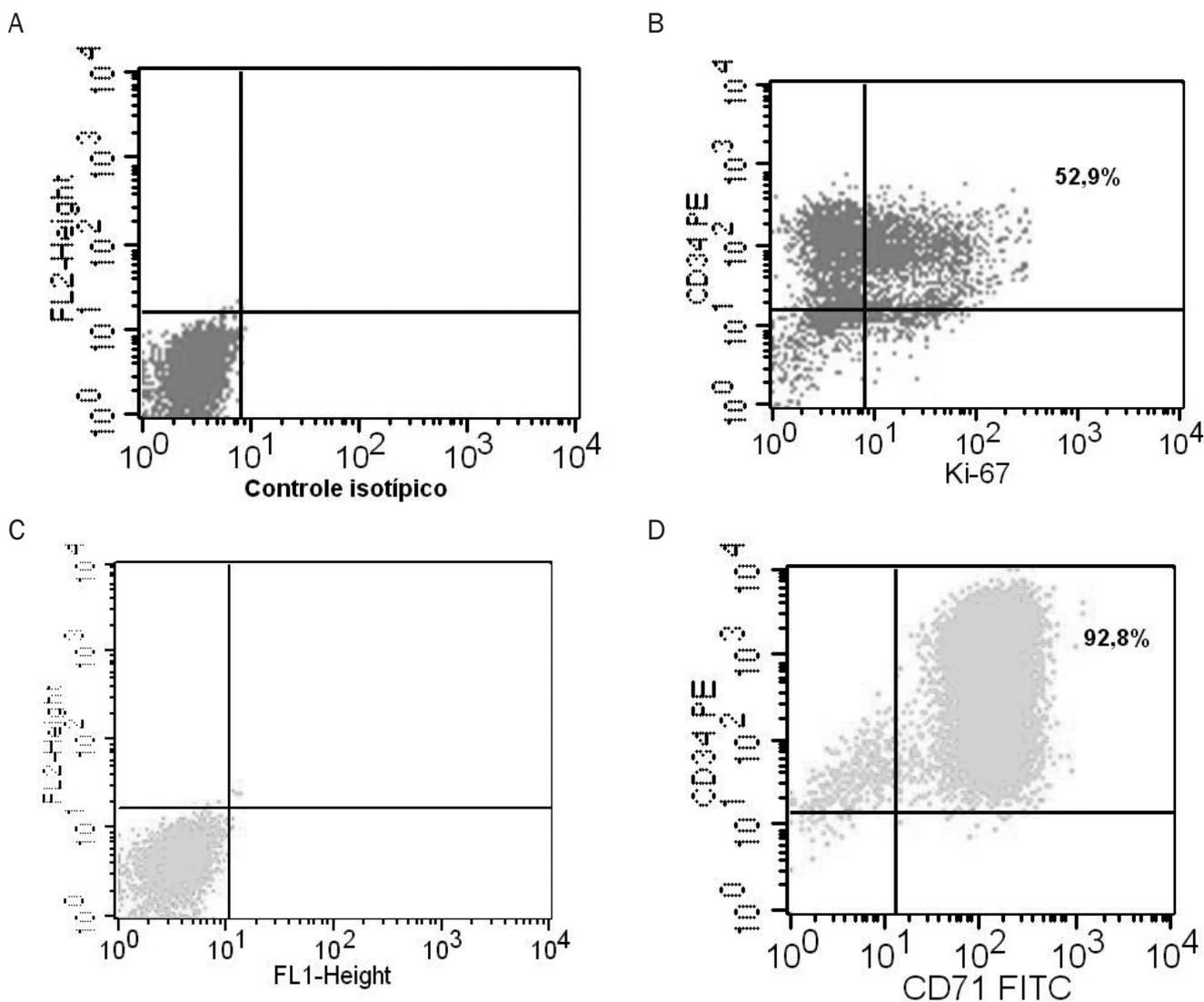


Figura 1. Análise do marcador Ki-67 e CD71 por citometria de fluxo: a) *Dot plot* do controle isotópico do Ki-67. (b) *Dot plot* da dupla marcação do anticorpo anti-Ki-67 versus anticorpo anti-CD34. (c) *Dot plot* do controle do anticorpo anti-CD71. (d) *Dot plot* da dupla marcação do anticorpo anti-CD71 versus anticorpo anti-CD34

Becton Dickinson Immunocytometry Systems), com aquisição de 10.000 eventos no *gate* de células blásticas. A partir da janela de análise estabelecida para os parâmetros de dispersão luminosa para o tamanho (FSC – *forward scatter*) e a complexidade interna celular (SSC – *side scatter*), foram obtidos gráficos do tipo *dot plot* nos canais de fluorescência para FL1 (FITC) e para FL2 (PE). Os resultados foram fornecidos na forma de percentagem de células blásticas positivas para os anticorpos monoclonais estudados.

O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para avaliar normalidade na distribuição dos dados. Para variáveis com distribuição assimétrica, utilizaram-se testes não paramétricos.

Na avaliação de diferenças na expressão dos marcadores de proliferação celular Ki-67 e CD71 em sangue periférico e medula óssea segundo os tipos de leucemias agudas, empregaram-se os testes Mann-Whitney (dois grupos) e Kruskal-Wallis (mais de dois grupos).

A associação entre as variáveis de proliferação celular foi avaliada por regressão linear. Em todas as análises, adotou-se nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Dos 54 pacientes avaliados, 34 (63,0%) eram portadores de LLA e 20 (37,0%) de LMA. Do total de casos com LLA, 73,5% (25/34) foram tipo B e 26,5% (9/34) tipo T.

A Figura 1 representa um *dot plot* dos marcadores de proliferação criado após a análise por citometria de fluxo e mostra as células duplo-positivas para os marcadores de proliferação na medula óssea de um paciente com LLA.

No total de pacientes, não houve diferença significativa ($p = 0,1318$) para a mediana da expressão do Ki-67 em medula óssea entre a LLA B (25,8%) em relação a LLAT (10,8%) e LMA (9,9%), nem em sangue periférico ($p = 0,1513$) entre a LLAB (44,2%), a LLAT (30,9%) e a LMA (4,2%).

Do mesmo modo, não houve diferença significativa ($p = 0,6198$) para a mediana da expressão do CD71 em medula óssea entre as LLAT (38,0%), LLAB (17,5%) e as LMA (32,3%), nem em sangue periférico ($p = 0,4926$) entre as LMA (64,5%), LLA-B (9,7%) e as LLAT (9,6%) das LLA-T.

Houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0129$) quando foram comparados os valores do Ki-67

em sangue periférico e Ki-67 em medula óssea nas LMAs e também quando foram comparados os valores de CD71 em sangue e medula ($p = 0,0289$) (Tabela 1). Quando analisadas as expressões dos marcadores de proliferação por faixa etária (infanto-juvenil e adulta), não houve significância estatística ($p = 0,2981$).

Observou-se associação positiva entre a expressão do antígeno Ki-67 e o CD71 na LMA ($p = 0,012$) em medula óssea, sendo que o Ki-67 aumenta 28 pontos percentuais a mais em relação ao CD71. Na LLAT e LLAB, não foram observadas associações entre as variáveis de proliferação. Em sangue periférico, houve associação entre a expressão do antígeno Ki-67 e o CD71 na LLAB ($p = 0,012$), sendo que o Ki-67 aumenta 202,2 pontos percentuais em relação ao CD71. Na LLAT e LMA, não foi observada associação entre Ki-67 e CD71 em sangue periférico (Tabela 2).

DISCUSSÃO

Dos 54 pacientes submetidos ao estudo de proliferação celular, a maioria foi diagnosticada com LLA (63%), e as LMA constituíram 37% do total de leucemias agudas. Dados epidemiológicos da literatura refletem percentuais de LLA que variam de 67% a 85% dos casos¹⁰. A exclusão em nosso trabalho de 4 casos que perderam a expressão do antígeno CD34 (todos LLA) refletiria um valor real de 65,5% de LLA.

A expressão dos marcadores de proliferação celular utilizados nesta pesquisa foi feita separadamente em medula óssea e em sangue periférico, pois há relatos na literatura que apontam diferenças entre os parâmetros cinéticos nos blastos nessas duas amostras biológicas¹³.

Quando comparamos a expressão do Ki-67 em medula óssea com a expressão do Ki-67 em sangue periférico, houve diferença estatística ($p = 0,0129$) apenas na LMA entre os tipos de amostras biológicas (MO e SP). Nossos resultados são semelhantes aos obtidos por outros autores que também encontraram diferenças na expressão da variável estudada no sangue periférico e na medula óssea¹⁴.

De modo semelhante ao Ki-67, o CD71 também apresentou expressões diversas nos diferentes tipos de amostra. Na medula óssea, houve maior expressão na LLAT, e no sangue periférico, maior expressão na LMA. Na literatura, são encontrados dados em que a porcentagem de células que expressam o CD71 é maior na LLAT em medula óssea, confirmando nossos

Tabela 1. Expressão dos marcadores Ki-67 e CD71 (sangue periférico e medula óssea) por tipo de leucemia aguda em pacientes do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA, no período de novembro de 2008 e novembro de 2009 (12 meses)

Tipo de Leucemia	Ki-67									CD71									
	MO				SP				p*	MO				SP				p*	p**
	N	\bar{X}	Dp	Med	N	\bar{X}	Dp	Med		N	\bar{X}	Dp	Med	N	\bar{X}	Dp	Med		
LLAB	18	26,2	18,3	25,8	6	37,8	26,0	44,2	0,3399	18	26,1	24,4	17,5	6	13,0	11,7	9,7	0,1433	0,2115
LLAT	5	12,9	15,0	10,8	4	27,7	24,4	30,9	0,1416	5	40,6	33,3	38,0	4	25,3	33,2	9,6	0,2207	0,4112
LMA	15	16,5	13,3	9,9	5	26,0	3,6	4,2	0,0129**	15	36,1	30,0	32,3	5	49,6	41,5	64,5	0,6312	0,0289**

\bar{X} = média; dp = desvio-padrão; Med = mediana; MO = medula óssea; SP = sangue periférico; p* = p valor para Mann-Whitney; p** = p valor para Kruskal-Wallis; p** = valor estatisticamente significativo (p < 0,05)

Tabela 2. Associação entre os marcadores Ki-67 e CD71 em medula óssea e sangue periférico por tipo de leucemia aguda em pacientes do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, São Luís-MA, no período de novembro de 2008 e novembro de 2009 (12 meses)

Tipo de leucemia	Ki-67 versus CD71					
	MO			SP		
	Coef.	Dp	p*	Coef.	dp	p*
LLAB	-0,154	0,178	0,399	2,022	0,467	0,012**
LLAT	0,161	0,297	0,641	0,470	0,325	0,244
LMA	0,280	0,095	0,012**	0,010	0,049	0,851

Coef. = coeficiente de regressão linear; dp = desvio-padrão; MO = medula óssea; SP = sangue periférico; p* = p valor para regressão linear; ** = valor estatisticamente significativo (p < 0,05).

resultados. Neste estudo, também foi possível observar maior expressão da LMA em sangue periférico, quando relacionado a LLA B, que apresentou a menor expressão desse marcador, sugerindo que os blastos linfóides B em sangue periférico apresentam menor expressão do antígeno CD71 que outros tipos de leucemias agudas¹⁵.

Sugere-se que CD71 é seletivamente expresso em precursores eritroides em todos os estágios de maturação, principalmente em medula óssea, pois requer grande quantidade de ferro para suportar a produção de hemoglobina^{6,16}, o que pode afetar e explicar resultados diferenciais de quantificação desse marcador em medula óssea e sangue periférico. Entretanto, como em nosso protocolo de análise as células avaliadas foram apenas aquelas CD34 positivas (células mais imaturas), eliminou-se o risco de estarmos avaliando os eritroblastos (precursores eritroides) simultaneamente e falsear os resultados.

Nossos resultados apontam que o aparecimento de maiores taxas de CD71 nos blastos em sangue periférico nas LLAT está associado a uma maior agressividade neoplásica desses subtipos de neoplasias em relação aos índices proliferativos encontrados nas LLAB, o que pode ser valorizado em uma análise individualizada

dos diferentes tipos de leucemias agudas na rotina de diagnóstico.

Não foi observada diferença estatística nas expressões dos marcadores de proliferação por faixa etária (infanto-juvenil e adulta), sugerindo que a idade, nesta pesquisa, não interfere na expressão do Ki-67 e CD71, apesar de alguns estudos indicarem que o CD71 diminui com a idade nas LLA¹⁷.

A avaliação comparativa entre a atividade proliferativa das células nos diferentes tipos de leucemias agudas em nosso estudo demonstrou que, na medula óssea, os resultados apresentaram associação na LMA, com o Ki-67 aumentando à medida que o CD71 também aumenta. No sangue periférico, apenas LLAB apresentou associação, justificando que o Ki-67 aumenta juntamente com o CD71. Esta significativa associação pode estar relacionada a uma maior agressividade da doença, muito embora um maior número de pacientes mereça ser avaliado clinicamente por maior período de tempo, para que assim se estabeleça o valor preditivo desses marcadores de proliferação celular com a evolução e o prognóstico nas leucemias agudas.

CONCLUSÃO

A expressão antigênica do Ki-67 nas leucemias agudas não diferiu nas amostras biológicas estudadas. Por outro lado, foram observadas diferenças na expressão do CD71, sendo maior na LLAT em medula óssea e na LMA em sangue periférico.

As maiores taxas de CD71 nos blastos em sangue periférico nas LLAT sugere maior agressividade neoplásica desses subtipos de neoplasias em relação aos índices proliferativos encontrados nas LLAB.

Não foi observada diferença nas expressões dos marcadores de proliferação por faixa etária (infanto-juvenil e adulta).

Foi observada associação entre o Ki-67 e o CD71 em medula óssea na LMA e em sangue periférico na LLAB. Apesar de ser observada neste estudo associação entre ambos os marcadores de proliferação celular, é necessário um estudo de evolução clínica a médio e longo prazo para avaliação da proliferação celular no prognóstico e na sobrevida de pacientes com leucemias agudas.

Estes resultados poderão ser utilizados associados ao diagnóstico, podendo contribuir para monitorar os pacientes leucêmicos quanto à agressividade neoplásica por meio da detecção dos marcadores de proliferação celular.

AGRADECIMENTOS

Nossos agradecimentos à Fundação de Amparo a Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (Fapema), processo 357/08; à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), que forneceu bolsa de estudo para realização da pesquisa; ao Centro de Pesquisa Clínica do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (Cepec-HUUFMA), que colaborou nos fornecendo a infraestrutura e os equipamentos necessários; e ao Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello (IMOAB), que contribuiu propiciando a coleta de espécimes clínicas e a análise de prontuário. Heliana Trindade Marinho e Elda Pereira Noronha foram beneficiárias de bolsas de estudo do Capes.

REFERÊNCIAS

1. Teixeira RAP, Bruniera P, Cusato MP, Borsato ML. Câncer infantil. In: Baracat FF, Fernandes HJJ, Silva MJ. *Cancerologia atual: um enfoque multidisciplinar*. São Paulo: Rocca; 2000. p. 426-51.

- Zhang L, Liu J, Lin H, Hu Q, Liu A, Hu Y. Expression of Survivin, CDK4, Ki-67 and clinical significance in pediatric acute leukemia. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*. 2006;26(5):552-4.
- Komberg IJ, Villaret D, Popp M, Lui L, McLaren R, Brown H, et al. Gene expression profiling in squamous cell carcinoma of the oral cavity shows abnormalities in several signaling pathways. *Laryngoscope*. 2005;115(4):690-8.
- Weiss DJ. Application of flow cytometric techniques to veterinary clinical hematology. *Vet Clin Pathol*. 2002;31(2):72-82.
- Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 Protein: from the known and the unknown. *Cell Physiol*. 2000;182:311-22.
- Ned R M, Swat W, Andrews NC. Transferrin receptor 1 is differentially required in lymphocyte development. *Blood*. 2003;102:3711-8.
- Barclay AN, Birkeland ML, Brown MH, Beyers BD, Davis SJ, Somoza C, et al. *The leucocyte antigen facts book*. Londres: Academic Press; 1993. p. 258-9.
- Instituto Nacional de Câncer (Brasil). *Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil*. Rio de Janeiro: INCA, 2009. [acesso 2010 jan 10]. Disponível em: [http://www.inca.gov.br].
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. *Br J Haematol*. 1976;33:451-8.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukemia (AML M0). *Br J Haematol*. 1991;78:325-9.
- Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, et al. Proposal for the immunological classification of acute leukaemias: European Group for the Immunological Characterization of Leukemia (EGIL). *Leukemia*. 1995;9:1783-6.
- Coebergh JW, Capocaccia R, Gatta G, Magnani C, Stiller CA. Childhood cancer survival in Europe, 1978-1992: the UROCARE Study. *Eur J Cancer*. 2011;37(6):671-2.
- Ucci G, Riccardi A, Dörmer P, Danova M. Rate and time of DNA synthesis of human leukemic blasts in bone marrow and peripheral blood. *Cell Tissue Kinet*. 1986;19:429-35.
- Drach J, Gatringer C, Glassl H, Schwarting R, Stein H, Huber H. Simultaneous flow cytometric analysis of surface markers and nuclear Ki-67 antigen in leukemia and lymphoma. *Cytometry*. 1989;10:743-9.
- Beitler MB. *Estudo da proliferação celular nas leucemias agudas*. [tese de doutorado]. São Paulo (SP): Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 1997.
- Dong HY, Wilkes S, Yang H. CD71 is selectively and ubiquitously expressed at high levels in erythroid precursors of all maturation stages: a comparative immunochemical study with glycophorin A and hemoglobin A. *Am J Surg Pathol*. 2003;102:35:723-32.
- Thorstensen K, Romslo I. The transferrin receptor: its diagnostic value and its potential as therapeutic target. *Scand J Clin Lab Invest*. 1993;53(Suppl):113-20.

Desempenho da metodologia de revisão rápida de 100% em esfregaços citopatológicos do colo do útero com e sem informações clínicas

Performance of the 100% rapid review methodology on cervix Pap smears with and without clinical information

RIALA6/1450

Edna Joana Cláudio MANRIQUE^{1*}, Nadja Lindany Alves SOUZA², Suelene Brito do Nascimento TAVARES², Luiz Carlos ZEFERINO³, Rita Goreti AMARAL⁴

*Endereço para correspondência: ¹Laboratório de Saúde Pública Dr. Giovanni Cysneiros (LACEN-GO), Goiânia; Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-GO), Av. Contorno, n. 3556, Jardim Bela Vista, CEP 74853-120, Goiânia, GO. Tel.: (62) 3201 9663. E-mail: ednamanrique@gmail.com.

²Centro de Análises Clínicas Rômulo Rocha, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

³Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (FCM-Unicamp), Campinas, SP.

⁴Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, GO.

Recebido: 08.11.2011 - Aceito para publicação: 04.01.2012

RESUMO

Neste estudo foi avaliada a metodologia de revisão rápida de 100% em esfregaços com e sem informações de critérios de risco clínicos utilizando-se o tempo médio de um e dois minutos. Um total de 5.395 esfregaços foi analisado, dos quais 274 foram classificados como alterados e 5.121 como negativos após análise de rotina. Das amostras negativas, 958 continham informações de critérios de risco clínicos, as quais foram submetidas a revisão rápida, que identificou 10 (1,04%) como alteradas quando foi utilizado o tempo de um minuto e 9 (0,93 %) com o tempo de dois minutos. Dos 4.163 esfregaços negativos sem informações de critérios de risco clínicos, após revisão rápida utilizando tempo de um e dois minutos, 35 (0,84%) foram identificados como alterados em ambos os tempos. Em esfregaços com informações de critérios de risco clínicos, a metodologia de revisão rápida apresentou sensibilidade de 83% e 75%, respectivamente para o tempo de um minuto e dois minutos. Não houve diferença significativa na detecção de resultados falso-negativos em esfregaços com e sem informação de critérios de risco clínicos. Observou-se também que não houve diferença no desempenho da revisão rápida na detecção de resultados falso-negativos, utilizando-se os tempos de um e dois minutos.

Palavras-chave. controle de qualidade, exame colpocitológico, garantia da qualidade dos cuidados de saúde.

ABSTRACT

This study evaluated the performance of the methodology of 100% rapid review on the cervix Pap smears with and without information on clinical risk criteria by using the average time of one and two minutes assays. A total of 5,395 smears were analyzed, and of these 274 were classified as altered and 5,121 as negative after routine examinations. Of negative smears, 958 had clinical risk criteria information, and they were analyzed by rapid review, which identified ten (1.04 %) as altered by the one minute-revision, and nine (0.93) by using a time of two minutes. Analyzing 4,163 negative smears without clinical risk criteria information by rapid review using the times of one and two minutes, 35 (0.84%) were identified as altered in both procedures. The technique of rapid review showed sensitivity of 83% and 75% for the review time of one minute and two minutes, respectively, in smears with available clinical risk criteria information. No difference was found in detecting false-negative smears with and without available clinical risk criteria information. Also, no difference was found in the rapid review performance for detecting false-negative results by employing one to two-minutes techniques.

Keywords. quality control, vaginal smears, quality assurance health care.

INTRODUÇÃO

A história natural do câncer do colo do útero apresenta um longo período de desenvolvimento desde o início da lesão até a invasão, porém ainda representa um grande problema de saúde pública¹. Um aspecto bastante relevante do ponto de vista da prevenção e controle é que o processo de evolução do câncer do colo do útero pode ser interrompido. A prevenção primária evita o aparecimento da doença por meio de intervenções no meio ambiente e em seus fatores de risco, como o estímulo ao sexo seguro, a correção das deficiências nutricionais e a diminuição da exposição ao tabaco. Assim, a mulher sob risco deverá ser identificada durante a consulta ginecológica e ser acompanhada com mais frequência²⁻⁴.

As informações obtidas durante a anamnese dirigida, sugeridas no roteiro de critérios de risco clínicos, referem-se a tratamentos hormonais ou radioterápicos, a presença de sangramento vaginal fora do período menstrual, a sangramento vaginal após relação sexual, a evidência de doença sexualmente transmissível (DST) ao exame ginecológico (inclusive portadoras de vírus da imunodeficiência adquirida – HIV), a alterações macroscópicas significativas ao exame especular ou a colposcopia e a critérios citopatológicos que compreendem qualquer resultado de exame prévio alterado. Essas informações permitem a identificação de um perfil de risco e, de acordo com recomendações do Ministério da Saúde (MS), os esfregaços citopatológicos do colo do útero contendo tais informações devem ser revisados após o escrutínio de rotina como um dos critérios de controle interno da qualidade nos laboratórios^{5,6}.

No sentido de normatizar, o MS, por meio da Secretaria de Políticas de Saúde e da Secretaria de Assistência à Saúde, instituiu a Portaria conjunta nº 92, de 16 de outubro de 2001, que determina a execução do monitoramento interno e externo da qualidade dos resultados de exames citopatológicos para os laboratórios que realizam esses exames para o Sistema Único de Saúde (SUS)⁷. Em 2005, o MS, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), instituiu a Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 302, que dispõe sobre o Regulamento Técnico para Funcionamento de Laboratórios Clínicos Públicos e Privados e também sobre a execução do controle interno e externo da qualidade⁸.

A maioria dos casos de câncer ocorre em consequência da não inclusão da mulher em um programa organizado, especialmente as de alto risco, ou seja, a não

realização do exame até a falta de seguimento em intervalos apropriados, ou ainda um seguimento inadequado em função de um resultado falso-negativo ou falso-positivo compromete a eficiência do programa^{3,9,11}. Nesse contexto, várias medidas têm sido implementadas para diminuir os resultados falso-negativos e falso-positivos do exame citopatológico do colo do útero, que incluem recomendações da técnica correta de coleta, representando o canal endocervical e a zona de transformação no esfregaço, com o uso da escova e da espátula de Ayre. Os laboratórios também têm estabelecido procedimentos para otimizar o controle interno da qualidade^{12,10}.

Métodos alternativos têm sido apontados, como controle interno da qualidade¹³, e a revisão rápida tem se destacado, com melhor desempenho quando comparada com a revisão de 10% e a revisão baseada em critérios de risco clínico¹⁴⁻¹⁶, além de apresentar melhor relação custo-benefício¹⁷. Alguns estudos têm relatado que, para a implantação da revisão rápida dentro de um laboratório, os melhores resultados têm sido obtidos com equipes previamente treinadas^{14,18}.

Contudo, é inquestionável a importância do exame citopatológico nos programas de prevenção do câncer do colo do útero, identificando lesões pré-neoplásicas ou mesmo neoplásicas; os benefícios de sua aplicação na detecção dessas lesões em grandes populações, especialmente as de alto risco, são evidentes. Embora o exame citopatológico apresente uma alta especificidade, em torno de 98%, há evidências de que o método tem importantes limitações a serem consideradas e que superá-las significará maximizar o valor da análise citológica¹.

Assim, o objetivo deste estudo foi uma avaliação mais detalhada do método de revisão rápida de 100%, utilizando os tempos de um e dois minutos em esfregaços citopatológicos do colo do útero com e sem informações de critérios de risco clínicos, para definir qual tempo apresenta melhor eficiência na identificação de resultados falso-negativos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado estudo do tipo epidemiológico transversal, na Seção de Citologia do Centro de Análises Clínicas Rômulo Rocha da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, no período de maio de 2007 a junho de 2008, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa dessa instituição, protocolo nº 057/2007.

Foram analisadas 5.395 esfregaços citopatológicos da rotina do laboratório.

O estudo teve como base os resultados de exames citopatológicos do colo do útero de mulheres usuárias do Sistema Único de Saúde (SUS) de Goiânia-GO que procuraram, espontaneamente, os serviços de Estratégia Saúde da Família, Unidades Básicas de Saúde, e concordaram em participar do estudo assinando o termo de consentimento livre esclarecido. A coleta dos esfregaços foi realizada por médicos e enfermeiros pela técnica convencional para rastreamento de câncer do colo do útero.

Os citologistas participantes deste estudo tinham de dois a dez anos de experiência no exercício da citopatologia, e três anos na metodologia de revisão rápida de 100%. Esta metodologia consiste em revisar rapidamente (30 segundos a dois minutos) todos os esfregaços classificados previamente como negativos ou insatisfatórios após o escrutínio de rotina^{19,20}.

Neste estudo, utilizaram-se os tempos de um e dois minutos e a técnica de Turret, que é realizada alternando-se o sentido vertical com o horizontal, lembrando uma “barra grega” ou a imagem de uma torre²¹. Todas as etapas das revisões foram às cegas. O escrutínio de rotina e as revisões foram executados com microscópios ópticos de luz comum do mesmo padrão de qualidade, aumento de 10X e 40X, e, quando necessário, foi realizado consenso para definir o resultado final, utilizando o microscópio multicabeças.

As informações de critérios de risco clínicos foram obtidas pela ficha de requisição e resultado do exame citopatológico no colo do útero, preenchida pelo profissional responsável pela coleta. Foram consideradas as informações recomendadas pelo MS⁶: hemorragia genital pós-menopausa, sangramento ectocervical de contato, evidências de DST ao exame ginecológico (inclusive HIV), alterações macroscópicas significativas a exame especular ou a colposcopia, rádio ou quimioterapia prévia e critérios citopatológicos, isto é, todo exame citopatológico anterior com alterações atípicas de significado indeterminado, lesões pré-neoplásicas ou neoplásicas escamosas e/ou glandulares.

Diariamente, após o escrutínio de rotina, os esfregaços classificados como negativos foram submetidos à revisão rápida de 100%, utilizando a objetiva de 10X, no tempo médio de um e dois minutos. Nessa revisão, os esfregaços foram classificados como negativos ou suspeitos. Os esfregaços identificados como negativos foram considerados como resultado final e liberados, enquanto os suspeitos foram submetidos à revisão detalhada, analisados por dois citologistas que não participaram do escrutínio de rotina, cujos resultados concordantes foram considerados como resultado final. Os casos discordantes, após a revisão detalhada, foram analisados por um terceiro citologista,

que, em reunião de consenso, definiu o resultado final.

Os resultados dos exames citopatológicos foram classificados de acordo com o sistema de Bethesda²² e armazenados no programa Epi-Info 3.3.2. Para a análise dos dados, usou-se o programa SAS versão 8.2²³ e estimaram-se a sensibilidade, a especificidade, com seus respectivos intervalos de confiança (IC) de 95%, bem como o valor preditivo positivo (VPP) e o valor preditivo negativo (VPN) do método de revisão rápida utilizando os tempos de um e dois minutos para exames citopatológicos com informações clínicas. Utilizou-se o programa SigmaStat versão 2.0 para aplicar o teste do qui-quadrado (χ^2), e as diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Dos 5.395 esfregaços citopatológicos cervicais analisados, 274 (5,1%) foram classificados como alterados e 5.121 (94,9%) como negativos. Dos esfregaços negativos, 958 (18,7%) continham informações de critérios de risco clínicos e 4.163 (81,3%) não traziam informações.

O escrutínio de rotina identificou 6,7% de esfregaços alterados com informações clínicas e 4,5% esfregaços sem informações clínicas. A revisão rápida identificou 1,04% e 0,93% esfregaços falso-negativos com informações de critérios de risco clínicos, utilizando o tempo de um e dois minutos respectivamente. Para os esfregaços sem informações de critérios de risco clínicos, foram detectados 0,84% esfregaços falso-negativos para ambos os tempos. Não houve diferença na detecção de resultados falso-negativos em esfregaços com e sem informações de critérios de risco clínicos, utilizando os tempos de um e dois minutos (Tabela 1).

Dos 958 (18,7%) esfregaços negativos com informações de critérios de risco clínicos, observou-se que o Grupo 1, que compreende a evidência de DST ao exame ginecológico (inclusive HIV) e colo alterado, foi o mais frequente e com maior número de resultados falso-negativos (Tabela 2).

A sensibilidade da revisão rápida para exames citopatológicos, com informações de critérios de risco clínicos, foi de 83,3% e 75%, para os tempos de um e dois minutos respectivamente (Tabela 3).

DISCUSSÃO

Observou-se que os resultados falso-negativos com informações de critérios de risco clínicos foram mais frequentes quando comparados àqueles que não continham

Tabela 1. Resultados alterados identificados no escrutínio de rotina e pela revisão rápida em esfregaços com e sem informações de critérios de risco clínicos, de acordo com resultado final

Resultados alterados	Escrutínio de rotina (274/5.395)				Revisão rápida um minuto (45/5.121)				Revisão rápida dois minutos (44/5.121)			
	Com inf. clínica (69/1.027)		Sem inf. clínica (205/4.368)		Com inf. clínica (10/958)		Sem inf. clínica (35/4.163)		Com inf. clínica (9/958)		Sem inf. clínica (35/4.163)	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
ASC-US	16	1,56	62	1,42	4	0,42	19	0,46	3	0,31	21	0,51
ASC-H	9	0,88	25	0,57	0	0	05	0,12	0	0	03	0,07
LSIL	20	1,93	57	1,31	6	0,62	11	0,26	6	0,62	10	0,24
HSIL	24	2,34	55	1,26	0	0	0	0	0	0	01	0,02
AGC	0	0	6	0,14	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	69	6,71	205	4,69	10	1,04	35	0,84	9	0,93	35	0,84
	p=0,39				p=0,18				p=0,19			

Inf. – informação; ASC-US – Células escamosas atípicas de significado indeterminado; ASC-H – Células escamosas atípicas; não é possível excluir uma lesão intraepitelial escamosa de alto grau; LSIL – Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau; HSIL – Lesão intraepitelial escamosa de alto grau; AGC – Atípicas em células glandulares.

Tabela 2. Relação das informações de critérios de risco clínicos dos esfregaços classificados como negativos pelo escrutínio de rotina e falso-negativos identificados pelo método de revisão rápida de 100%

Informações clínicas	Negativos		Falso-negativos	
	Grupo 1		Grupo 2	
	n	%	n	%
- Evidência de DST ao exame ginecológico (inclusive HIV)	443	46,2	7	0,1
- Colo alterado	408	42,6	6	0,1
Grupo 2				
- Hemorragia genital pós-menopausa	38	3,9	0	0
- Alterações macroscópicas significativas ao exame especular ou colposcopia	6	0,6	2	0,2
- Sangramento ectocervical de contato	17	1,8	0	0
- Sangramento após relação sexual	257	26,8	1	0,0
Grupo 3				
- Rádio ou quimioterapia prévia	20	2,1	1	0,1
- Critérios citopatológico – exame citopatológico anterior alterado	29	3,0	0	0
Total	1.218	126,8	17	1,8

Um esfregaço pode ter mais de uma informação clínica

Tabela 3. Desempenho do método de revisão rápida em esfregaços com informações de critérios de risco clínicos, utilizando o tempo de um e dois minutos, de acordo com o resultado final

Resultado final revisão rápida	Um minuto (n = 958)	Dois minutos (n = 958)
Verdadeiro positivo	10	9
Verdadeiro negativo	932	935
SE (IC 95%)	83,3 (62,2 - 100)	75 (50,5 - 99,5)
ES (IC 95%)	99,3 (98,7 - 99,8)	99,6 (99,2 - 100)
VPP (%)	58,8	69,2
VPN (%)	99,8	99,7

Para calcular a sensibilidade e o valor preditivo positivo, considerou-se positivo a soma dos resultados de ASC-US e LSIL de acordo com o resultado final. SE: sensibilidade; IC: intervalo de confiança; ES: especificidade; VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo.

informações de critérios de risco clínicos, porém não foi estatisticamente significativo. Verificou-se também que, utilizando o tempo de um e dois minutos, não houve diferença na detecção de resultados falso-negativos em esfregaços sem informações de critérios de risco clínicos pelo método de revisão rápida. Estes achados sugerem que

erros do escrutínio de rotina podem ocorrer em esfregaços com e sem informações de critérios de risco clínicos.

Verificou-se que a revisão rápida de 100% apresentou bom desempenho como método de controle interno da qualidade na detecção de resultados falso-negativos em esfregaços com informações de critérios de

risco clínicos utilizando os tempos de um e dois minutos. Esses dados foram consistentes com os de Michelow et al.¹⁵, que avaliaram o desempenho da revisão rápida de 100% em esfregaços negativos e insatisfatórios, em uma população de alto risco, utilizando o tempo de um minuto, e concluíram que o método é eficiente como controle interno da qualidade.

Reafirmando estes achados, estudos que comparam o método de controle interno da qualidade com base em critérios clínicos com os métodos de revisão rápida de 100% observaram que o reescrutínio ou o pré-escrutínio rápido apresentaram melhor desempenho do que a revisão baseada em critérios de risco clínicos²⁴⁻²⁶.

Diante desses resultados, seria importante uma reavaliação minuciosa no que se refere à recomendação como controle interno de qualidade para laboratórios de citopatologia, tendo em vista que o recomendado pelo MS é a revisão de todos os casos negativos com informações de critérios de risco clínicos e no mínimo 5% dos negativos selecionados aleatoriamente⁶.

Apesar de não ser o objetivo deste estudo, observou-se que as informações de critérios de risco clínicos relatadas pelo profissional responsável pela coleta nem sempre eram fidedignas aos achados citomorfológicos dos esfregaços (por exemplo, colo alterado ou presença de DST, sendo que no esfregaço não foi encontrado nenhuma alteração compatível com tal informação), gerando assim uma falta de confiabilidade em relação às informações por parte dos escrutinadores. Ademais, às vezes as fichas de requisição estavam preenchidas de forma incompleta, apenas com a idade da mulher. Os resultados deste estudo e os relatos na literatura acerca das informações de critérios de risco clínicos reforçam sua importância no momento da realização do exame. Entretanto, é necessário que sejam fidedignas e a ficha de requisição do exame citopatológico deve ser corretamente preenchida^{2,27,28}.

Cabe ainda ressaltar que as informações de critérios de risco clínicos mais frequentes neste estudo foram colo alterado e DST. Estudo de prevalência mostra que as lesões precursoras do câncer do colo do útero são cinco vezes mais frequentes em mulheres portadoras de DST²⁹, e outro estudo afirma que é de 50 a 70 vezes maior o risco de uma mulher infectada pelo HPV desenvolver câncer de colo uterino quando comparada com outra mulher não infectada. Há, dessa forma, grande necessidade de mulheres que apresentam fatores de risco para o câncer do colo do útero serem alvo de abordagens educativas em

saúde, melhorando a percepção quanto à vulnerabilidade a que estão submetidas³⁰.

Todos os esfregaços com informações de critérios de risco clínicos, suspeitos pela revisão rápida, utilizando o tempo de um e dois minutos, após a revisão detalhada, foram classificados como ASC-US e LSIL. Vale ressaltar que, de acordo com a história natural do câncer do colo do útero, esses erros têm impacto negativo menor, devido ao alto percentual – 70% a 90% – de regressão espontânea das lesões associadas em pacientes mantidos sob observação e tratamento das infecções pré-existent^{3,31,32}. A colposcopia é, portanto, um método desfavorável como primeira escolha na condução das pacientes que apresentam alterações ASC-US e LSIL, e assim a conduta preconizada pelo MS é a repetição da citologia em seis meses, exceto para mulheres com idade inferior a 30 anos³².

Concluiu-se então que não houve diferença na detecção de resultados falso-negativos em esfregaços com e sem informações de critérios de risco clínicos/citopatológicos pelo método de revisão rápida utilizando o tempo de um e dois minutos. Para os esfregaços com informações de critérios de risco clínicos, observou-se também que não houve diferença no desempenho da revisão rápida na detecção de resultados falso-negativos utilizando os tempos de um e dois minutos.

Dentre as possibilidades de redução dos erros que ocorrem na rotina dos laboratórios – erros de escrutínio e interpretação –, deve ser objetivo de todo laboratório de citopatologia monitorá-los e estabelecer linhas gerais ou um requerimento mínimo de controle de qualidade, sendo aí incluída a educação continuada para todos os profissionais responsáveis pela análise do exame. Assim, a revisão rápida de 100% utilizando o tempo de um minuto é uma alternativa viável como método de controle interno da qualidade. Este método, pelo fato de revisar 100% dos esfregaços negativos, possibilita avaliar o desempenho individual dos profissionais responsáveis pelo escrutínio de rotina e adotar medidas corretivas frente aos resultados falso-negativos.

AGRADECIMENTOS

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), pela Chamada Pública n. 002/2007 – Programa de Fortalecimento da Ciência.

Trabalho extraído da tese de doutorado da primeira autora, defendida em 2009, no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Goiás.

REFERÊNCIAS

1. Cantor SB, Atkinson EN, Cardenas-Turanzas M, Benedet JL, Follen M, MacAulay C. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a meta-analysis. *Acta Cytol*. 2005;49(4):405-15.
2. Danaei G, Vander Hoorn S, Lopez AD, Murray CJ, Ezzati M. Comparative risk assessment collaborating group (cancers). Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet*. 2005;366(9499):1784-93.
3. Derchain SFM, Longatto Filho A, Syrjanen KJ. Neoplasia intraepitelial cervical: Diagnóstico e Tratamento. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2005;27(7):425-33.
4. Anjos SJSB, Vasconcelos CTM, Franco ES, Almeida PC, Pinheiro AKB. Fatores de risco para câncer de colo do útero segundo resultados de IVA, citologia e cervicografia. *Rev Esc Enferm USP*. 2010;44(4):912-20.
5. Duarte SJH, Matos KF, Oliveira PJM, Matsumoto AH, Morita LHM. Fatores de risco para câncer cervical em mulheres assistidas por uma equipe de Saúde da Família em Cuiabá, MT, Brasil. *Cienc Enferm*. 2011;XVII(1):71-80.
6. Brasil. Ministério da Saúde. Prevenção do Câncer do Colo do Útero. Manual Técnico para Laboratórios. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2002.
7. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde e Secretaria de Assistência à Saúde. Portaria Conjunta n. 92, de 16 de outubro de 2001. Dispõe sobre o controle da qualidade do exame citopatológico. [acesso 2011 set 20]. Disponível em: [http://sna.saude.gov.br/legisla/legisla/tab_sia/SPS_SAS_PC92_01tab_sia.doc].
8. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC n. 302. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para Funcionamento de Laboratórios Clínicos, 2005. [acesso 2011 set 20]. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/res0302_13_10_2005.html].
9. Wiener HG, Klinkhamer P, Schenck U, Arbyn M, Bulten J, Bergeron C, Herbert A. European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening: recommendations for cytology laboratories. *Cytopathol*. 2007;18(2):67-78.
10. Zeferino LC. O desafio de reduzir a mortalidade por câncer do colo do útero. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2008;30(5):213-5.
11. Andrew A, Renshaw MD. Strategies for Improving Gynecologic Cytology Screening. *Cancer Cytopathol*. 2009;25(6):151-3.
12. Tavares SBN, Amaral RG, Manrique EJC, Souza NLA, Albuquerque ZBP, Zeferino LC. Controle da qualidade em citopatologia cervical: revisão da literatura. *Rev Bras Cancerol*. 2007;53(4):355-65.
13. Amaral RG, Zeferino LC, Hardy E, Westin MCA, Martinez EZ, Montenor EBL. Quality assurance in cervical smears: 100% rapid rescreening versus 10% random rescreening. *Acta Cytol*. 2005;49:244-8.
14. Michelow P, Mckee G, Hlongwane F. Rapid rescreening of cervical smears as a quality control method in a high-risk population. *Cytopathol*. 2006;17(6):110-5.
15. Lee BCK, Lam SY, Todd W. Comparison of false negative rates between 100% rapid review and 10% random full rescreening as internal quality control methods in cervical cytology screening. *Acta Cytol*. 2009;53(5):271-6.
16. Hutchinson ML. Assessing the costs and benefits of alternative rescreening strategies. *Acta Cytol*. 1996;40(1):4-8.
17. Sood N, Singh V. Evaluation of 100% rapid rescreening of cervical smears. *Indian J Pathol Microbiol*. 2009;52(4):495-7.
18. Dudding N, Hewer EM, Lancucki L, Rice S. Rapid Screening: a comparative study. *Cytopathol*. 2001;12(4):235-48.
19. Ferraz MGMC, Dall'Agnol M, Di Loreto C, Pirani WM, Utagawa ML, Pereira SM, et al. 100% rapid rescreening for quality assurance in a quality control program in a public health cytologic laboratory. *Acta Cytol*. 2005;49(6):639-43.
20. Montemor EBL, Roteli-Martins CM, Zeferino LC, Amaral RG, Fonseca-Carvasan GA, Shirata NK, et al. Whole, Turret and step methods of rapid rescreening: Is there any difference in performance?. *Diag Cytopathol*. 2007;35(1):57-60.
21. Solomon D, Nayar R. Sistema Bethesda para citopatologia cervicovaginal. 2ª ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2005.
22. SAS Institute Inc. SAS/STAT software changes and enhancements through release 8.2. Cary: SAS Institute; 1999-2001.
23. Manrique EJC, Amaral RG, Souza NLA, Tavares SBN, Albuquerque ZBP, Zeferino LC. A revisão rápida de 100% é eficiente na detecção de resultados falso-negativos dos exames citopatológicos cervicais e varia com a adequabilidade da amostra: uma experiência no Brasil. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2007;29(8):402-7.
24. Diehl ARS e Prolla JC. Rapid rescreening of cervical smears for internal quality control. *Acta Cytol*. 1998;42(4):949-53.
25. Tavares SBN, Souza NLA, Manrique EJC, Albuquerque ZBP, Zeferino LC, Amaral RG. Comparison of the rapid prescreening, 10% random review, and clinical risk criteria as methods of internal quality control in cervical cytopathology. *Cancer (Cancer Cytopathol)*. 2008;114(3):165-70.
26. Rama CH, Roteli-Martins CM, Derchain SFM, Longatto-Filho A, Gontijo RC, Sarian LOZ, et al. Prevalência do HPV em mulheres rastreadas para o câncer cervical. *Rev Saúde Pública*. 2008;42(1):123-30.
27. Mendes JC, Silveira LMS, Paredes AO. Lesão intraepitelial cervical: existe correlação entre o tempo de realização do exame de Papanicolaou e o aspecto do colo uterino para o aparecimento da lesão?. *RBAC*. 2004;36(4):191-6.
28. Moscicki AB, Shiboski S, Hills NK, Powell KJ, Jay N, Hanson EN, et al. Regression of low-grade squamous intra-epithelial lesions in young women. *Lancet*. 2004;364(9446):1678-83.
29. Barcelos ACM, Michelin MA, Adad SJ, Murta EFC. Significado clínico do achado citológico de células escamosas atípicas de significado indeterminado. *Femina*. 2007;35(2):83-7.
30. Brasil. Ministério da Saúde. Rastreamento de câncer cérvico-uterino em mulheres que têm ou tiveram DST. [acesso 2011 set 20]. Disponível em: [<http://www.aids.gov.br/assistencia/manualdst/item10.htm>].
31. Diógenes MAR, Jorge RJB, Sampaio LRL, Mendonça FAC, Júnior RJ. Perfil de auxiliares e técnicas de enfermagem quanto aos fatores de risco para câncer cervical e adesão ao exame Papanicolaou. *Rev APS*. 2009;12(3):285-92.
32. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Diretrizes Brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero. Rio de Janeiro: INCA; 2011. [acesso 2011 set 20]. Disponível em [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/controle_cancer/].

Micro-organismos patogênicos e deteriorantes em chocolate artesanal ao leite

Pathogenic and deteriorative microorganisms in homemade milk chocolate

RIALA6/1451

Talita Schneid TEJADA, Priscila Alves DIAS, Rita de Cássia dos Santos da CONCEIÇÃO, Cláudio Dias TIMM*

*Endereço para correspondência: Inspeção de Produtos de Origem Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, campus Capão do Leão, prédio 34, CEP 96010-900, Pelotas, RS. E-mail: timm@ufpel.tche.br.

Recebido: 24.11.2011 - Aceito para publicação: 20.01.2012

RESUMO

O trabalho teve como objetivo verificar a qualidade microbiológica do chocolate artesanal ao leite produzido e comercializado na região sul do estado do Rio Grande do Sul. Foram pesquisadas a presença de *Salmonella* e as contagens de mesófilos aeróbicos, coliformes totais, coliformes termotolerantes, bolores e leveduras, *Staphylococcus* coagulase positiva e clostrídios sulfito-redutores em 40 amostras de chocolate artesanal ao leite obtidas em estabelecimentos comerciais da região de estudo. Treze (32,5%) amostras mostraram ser impróprias para o consumo humano. Dessas, 11 (27,5%) apresentaram contagens de bolores e leveduras acima dos limites estabelecidos, das quais 7 (17,5%) demonstraram apenas esse parâmetro fora dos padrões. O segundo parâmetro microbiológico mais frequente foi a contagem de coliformes totais, e em 5 amostras (12,5%) foram detectados valores acima dos aceitáveis. Apenas 1 amostra apresentou contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva acima dos limites permitidos. *Salmonella* e clostrídios sulfito redutores não foram isolados das amostras analisadas. Esses resultados são indicativos de problemas de ordem higiênica, provavelmente relacionados a práticas inadequadas de fabricação ou ao não cumprimento de boas práticas de fabricação.

Palavras-chaves. chocolate artesanal, microbiologia de alimentos, saúde pública.

ABSTRACT

The present study aimed at analyzing the microbiologic quality of homemade milk chocolate produced and marketed in the southern region of the State of Rio Grande do Sul. 40 samples were collected from the markets of this region. *Salmonella* isolation, and aerobic mesophiles, total coliforms, thermotolerant coliforms, mould and yeast, positive- coagulase *Staphylococcus* and sulfite-reducing clostridia counts were performed. 13 (32.5%) samples were unsuitable for human consumption. Of these, in 11 (27.5%) samples the yeast and mold counts were above the established limits; and 6 (17.5%) showed noncompliant results only in this parameter only. The second microbiological parameter mostly found was the total coliforms, and the counting values above those acceptable were detected in 5 (12.5%) samples. Only 1 sample showed *Staphylococcus* coagulase positive count above the established limit. Neither *Salmonella* nor sulfite-reducing clostridia were isolated from the analyzed samples. These data indicate that some hygienic problems have occurred, probably related to inadequate fabrication practices or the non-adoption of good practices of fabrication.

Keywords. homemade chocolate, food microbiology, public health.

INTRODUÇÃO

O chocolate é um alimento obtido a partir do processamento de cacau (*Theobroma cacao*) e açúcar, podendo conter outras substâncias alimentícias. No caso do chocolate ao leite, além de cacau e açúcar, também está presente o leite em pó. Segundo a legislação brasileira, as matérias-primas devem, obrigatoriamente, ser isentas de matéria terrosa, parasitas, detritos animais, cascas de semente de cacau e outros detritos vegetais. O chocolate pode apresentar recheio, cobertura, formato e consistência variados e deve ser obtido, processado, embalado, armazenado, transportado e conservado em condições que não produzam, desenvolvam ou agreguem substâncias físicas, químicas ou biológicas que coloquem em risco a saúde do consumidor, obedecendo à legislação vigente de boas práticas de fabricação¹.

Bolores e leveduras, bactérias mesófilas aeróbicas e coliformes são utilizados como indicadores da qualidade higiênica do alimento. Neste último grupo, os coliformes termotolerantes têm sido utilizados como indicadores higiênico-sanitários, uma vez que o habitat primário de parte de seus constituintes é o trato intestinal e sua presença em alimentos representa contaminação de origem fecal direta ou indireta. Bactérias do gênero *Salmonella* estão entre os micro-organismos mais frequentemente envolvidos em casos e surtos de enfermidades de origem alimentar em humanos, envolvendo diversos tipos de alimentos². Em casos de intoxicações alimentares, causadas pela ingestão de alimentos contendo toxinas microbianas pré-formadas durante a proliferação dos micro-organismos patogênicos no alimento, o envolvimento de bactérias dos gêneros *Staphylococcus* e *Clostridium* tem sido comumente reportado³. *S. aureus* tem habilidade de produzir diferentes toxinas frequentemente envolvidas em intoxicações alimentares em todo o mundo. Os principais reservatórios deste micro-organismo são as fossas nasais, pele e pelos de animais de sangue quente, podendo chegar aos produtos alimentícios durante sua preparação e processamento. Quanto às bactérias do gênero *Clostridium*, os sulfito-redutores são os mais importantes, sendo *C. botulinum*, *C. septicum*, *C. bifermentans* e *C. perfringens* os mais frequentemente implicados em toxinfecções de origem alimentar. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece que *Salmonella*, *Staphylococcus* coagulase positiva e coliformes termotolerantes devem estar

ausentes no chocolate ao leite, permitindo o máximo de 20 UFC/g para clostrídios sulfito-redutores.¹

Considerando-se a possibilidade da ocorrência de toxinfecções alimentares causadas pelo consumo de chocolate, é de extrema importância a verificação das condições microbiológicas desse alimento oferecido ao consumo humano. A elaboração artesanal de chocolate ao leite implica maior manipulação e exposição do produto a potenciais fontes de contaminação. Neste caso, a observação de boas práticas de fabricação tem destacada importância na obtenção de um produto seguro para o consumo humano.

O trabalho teve como objetivo verificar a qualidade microbiológica do chocolate artesanal ao leite produzido e comercializado na região sul do estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 40 amostras de chocolate artesanal ao leite obtidas na região sul do estado do Rio Grande do Sul, em estabelecimentos comerciais das cidades de Pelotas e São Lourenço do Sul, durante o período de janeiro a dezembro de 2009. As amostras, mantidas nas embalagens em que estavam colocadas à venda, foram acondicionadas em caixas isotérmicas e encaminhadas ao laboratório para análise. Foram realizadas pesquisa da presença de *Salmonella* e contagens de mesófilos aeróbicos, coliformes totais (35 °C), coliformes termotolerantes (45 °C), bolores e leveduras, *Staphylococcus* coagulase positiva e clostrídios sulfito-redutores. Todas as análises foram realizadas de acordo com os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água.⁴

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisadas 40 amostras de chocolate artesanal ao leite quanto a aspectos microbiológicos indicadores de qualidade higiênico-sanitária. Para efeito de avaliação e discussão dos resultados, estes foram comparados com os padrões de identidade e qualidade do chocolate conforme a Resolução n. 12 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA), da ANVISA¹, a qual estabelece o valor máximo de $5,0 \times 10^4$ UFC/g, máximo de 10^2 NMP/g, ausência em 1 g, máximo de $2,0 \times 10$ UFC/g, ausência em 0,1 g, ausência

Tabela 1. Contagens de mesófilos aeróbicos, coliformes totais, coliformes termotolerantes e bolores e leveduras em 40 amostras de chocolate artesanal ao leite

Amostra	Mesófilos aeróbicos (UFC/g)	Coliformes totais (NMP/g)	Coliformes termotolerantes (NMP/g)	Bolores e leveduras (UFC/g)
1	$6,1 \times 10^3$	0,4	< 0,3	$3,0 \times 10^{3*}$
2	$1,1 \times 10^5$	2,3	< 0,3	$8,4 \times 10^4$
3	$2,7 \times 10^2$	110,0	< 0,3	$1,1 \times 10^3$
4	$3,7 \times 10^3$	9,3	< 0,3	$4,0 \times 10^3$
5	$2,6 \times 10^2$	24,0	< 0,3	$2,0 \times 10^2$
6	$3,5 \times 10^2$	1,5	< 0,3	$7,0 \times 10^3$
7	$3,1 \times 10^2$	< 0,3	< 0,3	$2,0 \times 10^2$
8	$1,9 \times 10^3$	46,0	0,9	$5,0 \times 10^3$
9	$1,9 \times 10^2$	< 0,3	< 0,3	$1,0 \times 10^2$
10	$3,2 \times 10^3$	< 0,3	< 0,3	< $1,0 \times 10^2$
11	$3,1 \times 10^3$	< 0,3	< 0,3	< $1,0 \times 10^2$
12	$2,9 \times 10^4$	0,9	0,9	$1,0 \times 10^2$
13	$3,0 \times 10^3$	1,4	0,9	$2,5 \times 10^3$
14	$2,2 \times 10^3$	> 110,0	0,4	$1,5 \times 10^2$
15	< $1,0 \times 10^1$	2,1	< 0,3	$7,5 \times 10^2$
16	$4,3 \times 10^3$	> 110,0	0,4	$2,9 \times 10^3$
17	$2,5 \times 10^3$	> 110,0	< 0,3	$4,7 \times 10^3$
18	$2,0 \times 10^3$	> 110,0	0,9	$8,0 \times 10^2$
19	$7,0 \times 10^2$	4,3	< 0,3	< $1,0 \times 10^2$
20	$4,0 \times 10^1$	< 0,3	< 0,3	< $1,0 \times 10^2$
21	$4,0 \times 10^2$	< 0,3	< 0,3	< $1,0 \times 10^2$
22	$1,5 \times 10^2$	2,3	< 0,3	$2,0 \times 10^2$
23	$8,0 \times 10^2$	0,9	< 0,3	< $1,0 \times 10^2$
24	$3,1 \times 10^2$	< 0,3	< 0,3	< $1,0 \times 10^2$
25	$1,0 \times 10^2$	0,4	< 0,3	$5,5 \times 10^2$
26	$6,0 \times 10^2$	2,3	< 0,3	$1,5 \times 10^2$
27	$5,5 \times 10^2$	0,4	< 0,3	< $1,0 \times 10^2$
28	$4,0 \times 10^3$	< 0,3	< 0,3	$1,0 \times 10^3$
29	$3,7 \times 10^3$	0,7	0,9	$9,0 \times 10^3$
30	$2,6 \times 10^2$	< 0,3	< 0,3	$5,2 \times 10^2$
31	< $1,0 \times 10^1$	< 0,3	< 0,3	$1,0 \times 10^2$
32	$6,8 \times 10^2$	12,0	0,7	$2,0 \times 10^2$
33	$7,3 \times 10^2$	4,3	< 0,3	< $1,0 \times 10^2$
34	$9,0 \times 10^2$	4,3	< 0,3	< $1,0 \times 10^2$
35	$2,1 \times 10^3$	4,3	< 0,3	$5,0 \times 10^2$
36	$9,7 \times 10^2$	< 0,3	< 0,3	< $1,0 \times 10^2$
37	$5,5 \times 10^2$	< 0,3	< 0,3	$2,0 \times 10^2$
38	$2,9 \times 10^2$	< 0,3	< 0,3	$5,5 \times 10^2$
39	$2,8 \times 10^2$	< 0,3	< 0,3	$1,5 \times 10^2$
40	$1,1 \times 10^2$	< 0,3	< 0,3	$3,0 \times 10^2$

*Valores marcados em negrito estão acima dos limites estabelecidos pela legislação brasileira²

em 25 g e máximo de 10^3 UFC/g, para mesófilos aeróbicos, coliformes totais, coliformes termotolerantes, clostrídios sulfito-redutores, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. e bolores e leveduras, respectivamente.

Os resultados obtidos nas contagens de mesófilos aeróbicos, coliformes totais, coliformes termotolerantes e

bolores e leveduras estão apresentados na Tabela 1. Em uma amostra (2,5%), identificada pelo número 16, a contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva foi $1,4 \times 10^2$ UFC/g. Todas as demais apresentaram resultado < $1,0 \times 10^1$ UFC/mL. Não foram isolados *Salmonella* ou clostrídios sulfito-redutores de nenhuma das amostras estudadas.

As populações de bactérias mesófilas aeróbicas, coliformes totais e bolores e leveduras em alimentos são utilizadas como indicadores da higiene durante a obtenção, o transporte, o processamento e a estocagem dos produtos. A presença de *Salmonella*, *Staphylococcus* coagulase positiva e clostrídios sulfito-redutores está relacionada à sanidade do produto. Embora o consumo de chocolate tenha sido implicado em um surto de infecção alimentar causado por *Salmonella* do sorotipo Typhimurium ocorrido na Noruega e na Finlândia em 1987⁵, no presente trabalho, não foram detectados micro-organismos desse gênero em nenhuma das amostras estudadas. Elevadas contagens de coliformes termotolerantes, além de indicarem condições inadequadas de higiene, são também indicadores sanitários, uma vez que a presença desses micro-organismos significa que patógenos de origem fecal podem ter contaminado o produto. Baylis et al.⁶ demonstraram que *Escherichia coli* O157:H7, um dos mais importantes coliformes enteropatogênicos, frequentemente associado a doenças transmitidas por alimentos, e outras *E. coli* produtoras de shiga toxina são capazes de se manter viáveis em chocolate experimentalmente contaminado, estocado a 10 °C, por até 12 meses. Todas as amostras analisadas no presente estudo apresentaram contagens inferiores a 1 NMP/g de chocolate.

Treze (32,5%) amostras estavam impróprias para o consumo humano, segundo a legislação brasileira¹, pois os resultados das análises microbiológicas mostraram parâmetros fora dos padrões. Dessas, 11 (27,5%) apresentaram contagens de bolores e leveduras acima dos limites estabelecidos, sendo que 7 (17,5%) estavam apenas com esse parâmetro fora dos padrões. A contagem de coliformes totais foi o segundo parâmetro com maior número de resultados (5 amostras, 12,5%) acima dos valores aceitáveis. Os resultados são indicativos de problemas de ordem higiênica, provavelmente relacionados a boas práticas de fabricação (BPF) inapropriadas ou não adotadas. Apenas 1 amostra apresentou contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva acima dos limites legais, com uma concentração de $1,4 \times 10^2$ UFC/mL. Essa contagem, em se tratando de *Staphylococcus aureus*, é considerada insuficiente para a produção de enterotoxina em quantidade capaz de causar intoxicação em humanos. Embora varie com as condições e características dos alimentos, uma dose efetiva de enterotoxina pode ser produzida quando

a população desse micro-organismo ultrapassar 10^5 células/g de alimento⁷.

O simples fato de um alimento ser produzido artesanalmente não significa que não possua a qualidade higiênica necessária para constituir-se em alimento próprio para o consumo humano. Entretanto, quando os produtos não sofrem inspeção por órgãos oficiais, não há garantia da padronização nos procedimentos de higiene, nem fiscalização do uso de BPF, o que aumenta os riscos de contaminação e perda da qualidade.

Os resultados obtidos no presente estudo evidenciam a necessidade de maior rigor no controle higiênico da produção do chocolate caseiro ao leite comercializado no extremo sul do Brasil, como forma de garantir as condições microbiológicas adequadas dos produtos oferecidos ao consumo humano. Os resultados obtidos são um alerta no sentido da adoção de medidas higiênicas adequadas durante a produção, o manuseio e o acondicionamento do chocolate ao leite artesanal e da atenção por parte dos órgãos oficiais de inspeção de alimentos quanto ao produto elaborado artesanalmente.

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Normas técnicas especiais. Resolução n. 12, de 30 de março de 1978. Diário Oficial [da] União, Brasília, DF, 24 jul 1978, Seção I, p. 45-53.
2. Centers of Disease Control and Prevention – CDC. *Salmonella*. 2010. [acesso 2011 nov 21]. Disponível em: [http://www.cdc.gov/salmonella/index.html].
3. Centers of Disease Control and Prevention – CDC. Estimates of foodborne illness in the United States. 2011. [acesso 2011 nov 21]. Disponível em: [http://www.cdc.gov/foodborneburden/2011-foodborne-estimates.html].
4. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Instrução Normativa n. 62, de 26 de agosto de 2003. Diário Oficial [da] União, Brasília, DF, 18 set 2003, Seção I, p. 14-51.
5. Kapperud G, Gustavsen S, Hellesnes I, Hansen AH, Lassen J, Hirt J, et al. Outbreak of *Salmonella typhimurium* infection traced to contaminated chocolate and caused by a strain lacking the 60-megadalton virulence plasmid. *J Clin Microbiol*. 1990;28(12):2597-601.
6. Baylis CL, Macphee S, Robinson AJ, Griffiths R, Lilley K, Betts RP. Survival of *Escherichia coli* O157:H7, O111:H- and O26:H11 in artificially contaminated chocolate and confectionary products. *Int J Food Microbiol*. 2004;96(1):35-48.
7. Food and Drug Administration – FDA. *Staphylococcus aureus*. Bad Bug Book: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook, 1992. Disponível em: [http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap3.html].

Survival of pathogenic microorganisms in kefir

Sobrevivência de micro-organismos patogênicos em kefir

RIALA6/1452

Priscila Alves DIAS, Daiani Teixeira da SILVA, Talita Schneid TEJADA, Maria Cristina Garcia Moraes LEAL, Rita de Cássia dos Santos da CONCEIÇÃO, Cláudio Dias TIMM*

*Address for correspondence: Inspeção de Produtos de Origem Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, campus Capão do Leão, prédio 34, CEP 96010-900, Pelotas, RS. E-mail: timm@ufpel.tche.br. Telefone: 53 32757216
Recebido: 10.12.2010 - Aceito para publicação: 13.03.2012

ABSTRACT

Kefir is a homemade fermented milk produced by adding kefir grains. The domestic handling and the use of raw materials from different standards and sources, and the lack of inspection by qualified professionals, all this classify kefir as a food which might represent potential risks to human health. This study aimed at evaluating the pathogens survival during the kefir fermentation process. Kefir grains were added into portions of UHT skimmed milk which were experimentally contaminated with *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium and Enteritidis, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. Analyses of the microorganism isolation in these milk samples were carried out at 0, 6, 12, 48 and 72 hours of fermentation process. *Salmonella* Typhimurium and Enteritidis survived for a 24-hour period in fermenting kefir. *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* were recovered in less than 72 hours after the fermentation process was initiated. Under the conditions and the microorganisms concentrations established in the present study, the analyzed pathogenic bacteria survived for a period longer than those used for homemade kefir fermentation, and this one might be a potential hazard for human consumption.

Keywords. kefir, fermented milk, inhibition, pathogens.

RESUMO

Kefir é leite fermentado produzido de forma artesanal pela adição de grãos de kefir ao leite. A manipulação doméstica e o uso de matéria-prima de diferentes padrões e origens, aliados à falta de inspeção por profissional competente, fazem do kefir um alimento capaz de apresentar perigos potenciais para a saúde humana. No presente trabalho, foi avaliada a capacidade de sobrevivência de micro-organismos patogênicos durante a fermentação do kefir. Os grãos de kefir foram adicionados a porções de leite UHT desnatado, as quais foram experimentalmente contaminadas com *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium e Enteritidis, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. As amostras preparadas foram analisadas quanto à presença dos micro-organismos após 0, 6, 12, 24, 48 e 72 horas de fermentação. *Salmonella* Typhimurium e Enteritidis sobreviveram por 24 horas no kefir em fermentação. *E. coli* O157:H7, *S. aureus* e *L. monocytogenes* foram recuperados até 72 horas após o início da fermentação. As bactérias patogênicas estudadas, nas concentrações e condições do presente trabalho, sobreviveram por tempo superior àquele normalmente utilizado para a fermentação do kefir preparado artesanalmente, o qual representa perigo potencial para o consumo humano.

Palavras-chaves. kefir, leite fermentado, inibição, agentes patogênicos.

INTRODUCTION

Kefir is a kind of fermented milk, usually homemade, originated in the Caucasus, produced by the addition of kefir grains to milk. These grains consist of jellylike lumps that contain both bacteria and yeasts immersed in a protein-and-polysaccharide-matrix. The most commonly isolated microorganisms in kefir grains are the genera *Lactobacillus* (*L. brevis*, *L. casei*, *L. kefir*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens*, *L. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum*, *L. parakefir*), *Lactococcus* (*L. lactis* subsp. *lactis*), *Leuconostoc* (*L. mesenteroides*), *Acetobacter*, *Kluyveromyces* (*K. marxianus*) and *Saccharomyces*^{1,2,3,4}.

The production of kefir at industrial scale is limited due to the difficulty in obtaining starter cultures with the required stable composition for maintaining standard quality. Notwithstanding, the consumption of this kind of homemade fermented milk is widespread, mainly due to its alleged nutraceutical properties⁵. Domestic handling and the use of raw materials of different standards and sources, and also the lack of inspection by qualified professionals, classify kefir as a food which may represent potential hazards to human health. Milk is an excellent culture medium for different microorganisms, and plays a major role in food-transmitted disease epidemiology. Among disease-causing microorganisms eventually carried by dairy products are *Salmonella* genus, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*⁶. In order to guarantee consumer safety, it is essential to be aware of the risks brought up by pathogenic microorganisms eventually found in kefir.

This study aims at evaluating *E. coli* O157:H7, *Salmonella enterica* subsp. *enterica typhimurium* and *enteritidis* serotypes, *S. aureus* and *L. monocytogenes* survival during kefir fermentation process.

MATERIAL AND METHODS

Bacterial strains

We used *E. coli* O157:H7, by courtesy of Dr. T. Yano (Unicamp, Campinas, Brazil), *Salmonella* Typhimurium LIPOA 2023, previously isolated from pork sausage⁷, *Salmonella* Enteritidis LIPOA 2025, previously isolated from ground chicken meat⁸, *S. aureus* ATCC 14458 and *L. monocytogenes* ATCC 7644. The *E. coli* O157:H7 strain was successively cultivated on agar for standard plate count (PCA, Acumedia) containing

increasing concentrations of a medium of nalidixic acid, up to 100 µg/mL.

Kefir

Kefir grains were obtained from those used for homemade preparation of fermented milk. The grains were added to skim UHT milk at a 1:10 ratio and kept at 20 °C. The kefir was strained daily on a sterile strainer, and the grains were once more mixed with the milk, returning to incubation. This process was repeated for a week.

Experimentally contaminated kefir

The bacterial strains were incubated in brain heart infusion (BHI, Acumedia) at 37 °C until stationary phase. Inocula with approximately 10⁵ CFU.mL⁻¹ bacterial concentration were prepared from serial dilutions for each culture. 500 mL UHT skim milk was inoculated with 5 mL so as to obtain a final concentration of about 10³ CFU.mL⁻¹. Following, 50 g of kefir grains were added. This proceeding was made separately for each microorganism. Similarly prepared kefir without inoculation of the studied microorganisms was used as negative control. For positive control, we used 500 mL skim UHT milk inoculated with each microorganism at the same experimental kefir concentration, but without grain addition. Both the experimentally contaminated kefir and the controls were kept at 20 °C.

Microorganism survival

Research on the studied microorganisms from a sample of each material after 0, 6 and 12 hours of natural fermentation at 20 °C without shaking was done. Two samples were analyzed at 24 and 48 hours of fermentation, and three at 72 hours. During each analysis, pH was determined by the use of a DMPH-2 Digimed pH meter. The *Salmonella* and *L. monocytogenes* research was performed according to US Food and Drug Administration (FDA)⁹ recommendations (Andrews and Hammack¹⁰, Hitchins¹¹). For *E. coli* O157:H7 research, 25 mL of experimentally contaminated kefir was added to 225 mL buffered peptone water (BPW, Acumedia) and incubated at 37 °C for a 24-hour period. From this culture, spreads on MacConkey agar (Oxoid) added with nalidixic acid at 100 µg.mL⁻¹ medium concentration and incubation at 37 °C for a 24-hour period were done. For *S. aureus* research, 25 mL of experimentally contaminated kefir was incubated at 37 °C for a 24-hour period in 225 mL tryptic soy broth (TSB, Acumedia) added with 1% (w/v)

of sodium pyruvate and 10% (w/v) of sodium chloride. Following, spread on Baird Parker agar (Acumedia) and incubation at 37 °C for 24 hours were done. Suspicious colonies were biochemically confirmed according to FDA⁹ recommendations (Bennett and Lancette¹²). When growth on selective agar was not observed within the established incubation period, this period was extended for another 24 or 48 hours.

RESULTS AND DISCUSSION

The ability of pathogenic bacteria that are eventually carried by milk to survive in homemade produced kefir, similarly to that usually found under normal consumption conditions, was researched. It showed that milk fermentation caused by these microorganisms generates unfavorable conditions for the survival of the tested bacteria.

All bacteria were recovered from experimentally contaminated milk used as positive control after up to 72 hours of storage. No bacterium was recovered from the negative controls.

Among the pathogens studied, *E. coli* had the greatest resistance (Table 1). This microorganism is the most frequently found thermotolerant coliform in unprocessed milk and dairy products that have not been submitted to thermal treatment, indicating that this bacterium can adapt to environments rich in milk components. Gulmez and Guven¹³ studied the *E. coli* O157:H7 behavior in kefir after a 24- and 48-hour fermentation period and observed a population growth which was kept viable for 21 days in cooled food. In their study, experimental kefir was prepared by inoculating milk with other previously prepared kefir, differently from this study, in which kefir was produced from the direct inoculation of kefir grains. The procedure adopted by Gulmez & Guven¹¹ resulted in a much milder fermentation, which did not significantly affect the growth of *E. coli* O157:H7. Moreover, the ensuing cool storage maintenance inhibited the fermentation process and consequently the production of inhibitory factors, allowing the pathogen survival for a longer period. Kasimoglu and Akgun¹⁴, though not working with kefir, analyzed the behavior of *E. coli* O157:H7 in traditional and acidophilus yogurt. By experimentally inoculating milk before fermentation at a 10⁴ CFU.mL⁻¹ concentration, these authors did not succeed in recovering the microorganism after a 48-hour period.

However, at an initial 10⁶ CFU.mL⁻¹ concentration, *E. coli* O157:H7 was recovered after a period of up to 72 hours in traditional yogurt.

Table 1. Recovery of pathogenic microorganisms from experimentally contaminated kefir in different fermentation times at 20 °C

Microorganisms	Kefir (repetition)	Fermentation time (h)					
		0	6	12	24 ¹	48 ¹	72 ¹
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	1	+	+	+	++	+++	+--
	2	+	+	+	++	+++	+++
	3	+	+	+	++	+++	+++
<i>Salmonella</i> Typhimurium	1	+	+	+	++	---	---
	2	+	-	-	--	---	---
	3	+	-	-	--	---	---
<i>Salmonella</i> Enteritidis	1	+	+	+	+-	---	---
	2	+	+	+	++	---	---
	3	+	+	+	--	---	---
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	+	+	+	++	---	---
	2	+	+	+	++	---	---
	3	+	+	+	++	+++	+++
<i>Listeria monocytogenes</i>	1	+	+	-	--	---	---
	2	+	+	+	++	+++	---
	3	+	+	+	++	+++	---

¹ Two analyses were performed at 24-hour fermentation and three at 48 and 72 hours; +: presence in 25 g; -: absence in 25 g

Even though *Salmonella* Typhimurium and Enteritidis proved to be the least resistant bacteria among the studied pathogens, they managed to survive for up to 24 hours of kefir fermentation. It is possible that the strain used in this study was more adapted to the meat products, where they were found, than to the fermented milk. Czamansky¹⁵, on researching kefir antimicrobial action on Gram-negative microorganisms, observed *Salmonella* inactivation after a 60-minute exposition period. This fast inhibitory action was not observed in the present study, probably because of the inoculum concentration – 10³ CFU.mL⁻¹ – far higher than that used in Czamansky¹⁵, which was of 10 CFU.mL⁻¹.

S. aureus was viable under fermentation in kefir for up to 72 hours. Although it varies according to food conditions and characteristics, an effective dose of this enterotoxin can be produced when the *S. aureus* population exceeds 10⁵ cells.g⁻¹ food⁹. The initial concentration used in the experimental contamination of milk added with kefir grains was approximately of 10³ CFU.mL⁻¹ in the present study, lower than that needed to represent a hazard to human health. The scope of this study was to evaluate the survival ability of this pathogen in kefir, and we did not perform bacterial counts which could allow

Table 2. Means of pH values of the experimentally contaminated kefirs and the positive controls in different fermentation times at 20°C.

Treatments	pH (means + standard deviation)					
	0h	6h	12h	24h	48h	72h
LIPOA CDT	6.2±0.1 ^a	5.2 ± 0.1 ^a	4.9 ± 0.4 ^a	4.3 ± 0.4 ^a	4.0 ± 0.2 ^a	3.9 ± 0.1 ^a
LIPOA ABB	6.3 ± 0.1 ^a	5.0 ± 0.4 ^a	4.7 ± 0.4 ^a	4.3 ± 0.1 ^a	4.0 ± 0.2 ^a	4.0 ± 0.1 ^a
LIPOA MH	6.3 ± 0.1 ^a	5.1 ± 0.5 ^a	5.0 ± 0.2 ^a	4.6 ± 0.3 ^a	4.2 ± 0.1 ^a	4.0 ± 0.0 ^a
Positive controls(milk with pathogens)	6.5 ± 0.0 ^b	6.3 ± 0.1 ^b	6.2 ± 0.1 ^b	5.9 ± 0.2 ^b	5.6 ± 0.4 ^b	4.9 ± 0.1 ^b

Means with distinct letters in the columns differ statistically (P<0,001)

a follow-up of the *S. aureus* population behavior during the fermentation process. The likelihood of a quantitative increase of this microorganism during the first hours of fermentation, producing toxin in concentration able to cause human intoxication, however, cannot be discarded based on results obtained. Therefore, the *S. aureus* ability of surviving up to 72 hours in the fermenting product represents a potential hazard to consumers.

L. monocytogenes was viable under the conditions generated by the kefir production process for up to 48 hours of fermentation. These results are in agreement with Gulmez and Guven's¹³ observations, who, though working with a milder fermentation than that used in the present study, recovered *L. monocytogenes* from kefir after 24 and 48 hours of fermentation.

The fermentation that is caused by microorganisms in the kefir grains triggers a more intense acidification process in kefir than that in milk without the addition of these grains. Thus, the pH values obtained during the fermentation of experimentally contaminated kefir, as well as the negative control values, were lower than those found in positive controls (milk without kefir grains) (Table 2). This fact suggests that the alterations as a result of pH decrease are related to pathogen inhibition, once all inoculated microorganisms in positive controls were recovered after up to 72 hours of contamination. Garrote et al.², when studying the kefir supernatant inhibitory action on Gram-positive and Gram-negative microorganisms, observed that the antimicrobial effect is mainly due to the organic acids produced during the fermentation process. However, the possibility that microorganisms on kefir grains produce metabolites with antimicrobial activity cannot be ruled out.

As under normal domestic preparation conditions kefir is generally consumed within 24 hours of fermentation, and rarely after 48 hours, because it loses palatability due to acidification, the risk represented by the likely presence of pathogenic microorganisms is

high. The results emphasize the importance of sanitary quality of the milk used as raw material and of hygienic procedures in utensil cleaning and handling during homemade kefir preparation.

The studied pathogenic bacteria, in the concentrations and under the conditions of the present study, survived for a longer period than that normally used for homemade kefir preparation, representing a potential hazard to human consumption. *Salmonella* showed lower survival ability in the environment generated by fermenting kefir as compared to other bacteria in this study. Milk fermentation with kefir grains promoted the conditions that exerted an inhibitory effect on the tested microorganisms. The pH decrease caused by the kefir process seems to be related to the inhibition of pathogenic bacteria.

REFERENCES

- Chen HC, Wang SY, Chen MJ. Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture-independent methods. *Food Microbiol.* 2008;25:492-501.
- Garrote GL, Abraham AG, Antoni GL. Inhibitory power of kefir: the role of organic acids. *J Food Prot.* 2000;63:364-9.
- Takizawa S, Kojima S, Tamura S, Fujinaga S, Benno Y, Nakase T. The composition of the *Lactobacillus* flora in kefir grains. *Syst Appl Microbiol.* 1998;21:121-7.
- Witthuhn RC, Schoema T, Britz TJ. Characterization of the microbial population at different stages of kefir production and kefir grain mass cultivation. *Int Dairy J.* 2005;15:383-9.
- Farnworth ER. Kefir: a complex probiotic. *Food Sci Technol Bull. Function Foods.* 2005;2(1):1-17.
- Doyle GL, Abraham AG, Antoni GL. *Food microbiology: fundamentals and frontiers.* 2. ed. Washington: ASM; 2001.
- Dias PA, Conceição RCS, Coelho FJO, Tejada TS, Segatto M, Timm CD. Qualidade higiênico-sanitária de carne bovina moída e de embutidos frescos comercializados no sul do Rio Grande do Sul, Brasil. *Arq Inst Biol.* 2008;75:359-63.
- Conceição RCS, Hentges A, Moreira AN, Vasconcellos FA, Ângelo IMR, Carvalho JB, et al. Isolamento de *Salmonella* de produtos de frango e perfil de suscetibilidade dos isolados a antimicrobianos. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2007;66:31-4.

9. U. S. Food and Drug Administration – FDA. Center for Food Safety and Applied Nutrition. *Staphylococcus aureus*. In: Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook. [Accessed 2010 May 31]. Available in: [<http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap3.html>].
10. Andrews WH, Hammack T. *Salmonella*. U.S. Food and Drug Administration, Bacteriological analytical manual online, chapter 5, 2007. [Accessed 2010 May 31]. Available in: [<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-5.html>].
11. Hitchins AD. Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. U.S. Food and Drug Administration, Bacteriological analytical manual online, Chapter 10, 2003. [Accessed 2010 May 28]. Available in: [<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-10.html>].
12. Bennett RW, Lancette GA. *Staphylococcus aureus*. U.S. Food and Drug Administration, Bacteriological analytical manual online, chapter 12, 2001. [Accessed 2010 May 31]. Available in: [<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-12.html>].
13. Gulmez M, Guven A. Behaviour of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* 4b and *Yersinia enterocolitica* O3 in pasteurized and non-pasteurised kefir fermented for one or two days. *Int J Food Sci Tech*. 2003;9:365-9.
14. Kasimoglu A, Akgun S. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in the processing and post-processing stages of acidophilus yogurt. *Int J Food Sci Tech*. 2004;39:563-8.
15. Czamansky RT. Avaliação da atividade antimicrobiana de filtrados de quefir artesanal. [dissertação de mestrado em medicina veterinária preventiva]. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2003.

Perfil sanitário da carne bovina *in natura* comercializada em supermercados

Sanitary profile of fresh beef commercialized in supermarkets

RIALA6/1453

Vanessa de Souza Rodrigues MATOS*¹, Ana Paula Portela GOMES², Vilmara Almeida dos SANTOS¹,
Fernanda FREITAS¹, Isabella de Matos Mendes da SILVA¹

*Endereço para correspondência: ¹Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Av. Carlos Amaral, 1015, CEP 44570-000, Cajueiro, Santo Antônio de Jesus, BA. Tel.: (75) 9166-2054. E-mail: vanessa.matos86@gmail.com.

Recebido: 22.08.2011 - Aceito para publicação: 21.03.2012

RESUMO

Foi avaliada a qualidade da carne bovina *in natura* comercializada em supermercados. Vinte estabelecimentos cadastrados na Vigilância Sanitária Municipal foram avaliados aplicando-se *check list* baseado na legislação brasileira. Foram realizadas as contagens de micro-organismos indicadores nas amostras de carne e naquelas coletadas das mãos de manipuladores e da bancada pela técnica de contagem rápida por placas Petrifilm® (3M Company) em oito estabelecimentos. Todos os estabelecimentos analisados estavam em desacordo com a legislação; em 55%, as carnes estavam estocadas em temperatura acima do limite (7 °C) recomendado. Foram detectadas bactérias entre $1,0 \times 10^2$ e $3,1 \times 10^4$ UFC/g e $2,0 \times 10$ UFC/g, respectivamente, para coliformes totais e *Escherichia coli* nas carnes, e entre $2,0 \times 10$ e $3,7 \times 10^4$ UFC/cm² para coliformes totais e < 10 a $7,0 \times 10$ UFC/cm² para *Escherichia coli* nas amostras de bancada. Nos materiais das mãos, as bactérias variaram entre $6,0 \times 10^2$ e $2,9 \times 10^4$ UFC/mão e de < 10 a $2,8 \times 10^3$ UFC/mão, respectivamente, para *Staphylococcus aureus* e coliformes totais. Em todos os estabelecimentos, houve falhas nas Boas Práticas de Fabricação, que induziram a exposição do produto a contaminação microbiológica e comprometimento da qualidade do alimento.

Palavras- chave. qualidade microbiológica, carne bovina *in natura*, condições higiênico-sanitárias.

ABSTRACT

This study assessed the quality of fresh beef sold in supermarkets. Twenty establishments registered in the Municipal Sanitary Surveillance were selected, and a check list based on Brazilian legislation was applied. In eight supermarkets, microorganisms were counted, through rapid technique, in fresh meat samples and in those from manipulators' hands and bench. All the analyzed supermarkets were in disagreement with the legislation; and in 55% the meat was stored at temperature above the limit (7° C) recommended by legislation. Bacteria were detected in meat samples from 3.1×10^4 to 1×10^2 UFC/g and from 2.0×10 to $< 10^2$ UFC/g for total coliforms and *Escherichia coli*, respectively, and from 2.0×10 to 3.7×10^4 UFC/cm² for total coliforms and from < 10 to 7.0×10 UFC/cm² for *Escherichia coli* in bench samples. The bacteria ranged from 6.0×10^2 to 2.9×10^4 UFC/hand and from < 10 to 2.8×10^3 UFC/hand for total coliforms counts and *Staphylococcus aureus*, respectively, in manipulators' hands samples. Failures in Good Manufacturing Practices were observed in all supermarkets, exposing the products to microbial contamination, which affected on the food quality.

Keywords. microbiological analysis, fresh meat, sanitary conditions.

INTRODUÇÃO

Os alimentos de origem animal são facilmente contaminados, devido a sua elevada atividade de água e riqueza em proteínas¹. Dessa forma, a carne bovina *in natura*, por sua composição rica em nutrientes, alta atividade de água e pH favorável, torna-se um excelente meio de cultura para o crescimento microbiano, podendo causar doenças de origem alimentar ao ser humano².

A contaminação da carne bovina pode acontecer via endógena ou exógena, sendo que a principal via de contaminação ocorre no meio externo, por exposição às diferentes fontes de contaminação³. Entre as diversas origens de contaminação, destacam-se: ausência no controle higiênico-sanitário durante o abate animal, transporte, estocagem nos estabelecimentos de comercialização, controle do tempo/temperatura, higienização dos equipamentos e utensílios e excesso de manipulação⁴.

Em torno de 70% da carne bovina comercializada no Brasil é distribuída pelos supermercados, ficando 20% para os restaurantes e apenas 10% para os açougues⁵. Desse modo, a rede supermercadista é o maior comercializador de carne bovina *in natura* do país. Segundo dados da Vigilância Sanitária (Visa) municipal de Santo Antônio de Jesus-BA, dos 54 supermercados cadastrados, 47 possuem açougue que comercializam carne bovina *in natura*, evidenciando que a maioria dos supermercados da região é corresponsável pelo provimento desse tipo de carne para a população local⁶. A inexistência de condições higiênico-sanitárias adequadas é comum em muitos estabelecimentos que comercializam produtos alimentícios, devendo ser implantadas e implementadas as Boas Práticas de Fabricação (BPF).

Diante do exposto, considerando que as condições higiênico-sanitárias inadequadas e que a inexistência de Boas Práticas de Fabricação/Manipulação de alimentos podem interferir na qualidade sanitária da carne bovina *in natura* comercializada, tornando-se um risco para a saúde dos consumidores, objetivou-se avaliar o perfil sanitário da carne bovina *in natura* comercializada em supermercados do município de Santo Antônio de Jesus-BA.

MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no município de Santo Antônio de Jesus, localizado no Recôncavo Sul da Bahia, durante o período de agosto de 2010 a fevereiro de 2011.

O recurso prático de análise foi a coleta de informações visitando estabelecimentos e verificando as condições higiênico-sanitárias, por meio de *check list*, além da coleta de amostras de carne bovina *in natura*, das mãos de manipuladores e de bancadas de corte.

Seleção das amostras

Foram selecionados de forma aleatória 20 supermercados comercializadores de carne bovina *in natura* que possuem cadastro na Visa do município de Santo Antônio de Jesus-BA.

Verificação das condições físico-estruturais e higiênico-sanitárias dos estabelecimentos

Para a avaliação das condições físico-estruturais e higiênico-sanitárias dos estabelecimentos, utilizou-se uma lista de verificação (*check list*) baseada na RDC nº 275/2002⁷ e na RDC nº 216/2004⁸ da ANVISA.

Os estabelecimentos foram divididos em três grupos de acordo com a porcentagem de atendimento aos itens do *check list*. Os grupos 1, 2 e 3 referem-se aos estabelecimentos que atenderam de 76% a 100% dos itens, 75% a 51% dos itens e 50% a 0% dos itens, respectivamente. O *check list* foi dividido em 5 blocos (Bloco 1 – edificação e instalações; Bloco 2 – equipamentos, móveis e utensílios; Bloco 3 – manipuladores; Bloco 4 – matéria-prima; e Bloco 5 – documentação). O bloco 5 refere-se a existência de manual de boas práticas de fabricação (MBPF) e de procedimentos operacionais padronizados (POPs). Os dados obtidos na lista de verificação foram tabulados no programa estatístico SPSS versão 17, sendo realizada análise descritiva dos dados.

Avaliação das condições higiênico-sanitárias e identificação das fontes de contaminação do produto

Partindo dos 20 estabelecimentos, foram selecionadas aleatoriamente 8 supermercados para diagnóstico da qualidade higiênico-sanitária da carne bovina *in natura* e para identificação das possíveis fontes de contaminação do produto, a partir da avaliação microbiológica.

Análise microbiológica para a avaliação das condições higiênico-sanitárias do produto

O total de 8 amostras de carne bovina *in natura* foram coletadas de forma asséptica, colocadas em sacos plásticos próprios, codificadas para assegurar o sigilo da pesquisa, acondicionadas em caixa isotérmica adicionada

de gelo químico, segundo Silva et al.⁹, e transportadas ao Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, no Centro de Ciências da Saúde (CCS), onde foram imediatamente executadas as análises microbiológicas para a enumeração de micro-organismos indicadores, coliformes totais e *Escherichia coli*, por meio de método rápido de contagem por placas Petrifilm[®] (3M Company). O procedimento analítico e o tempo/temperatura de incubação seguiram as instruções de uso do fabricante. Foram consideradas como coliformes totais as colônias que apresentaram coloração vermelha com bolhas de gás e como *E. coli* aquelas que apresentaram coloração azul ou vermelha azulada e presença de bolhas de gás. As populações obtidas foram expressas em unidades formadoras de colônias (UFC) por grama do alimento. Mensurou-se a temperatura do produto nos balcões frigoríficos utilizando-se como instrumento medidor um termômetro com haste de inserção, com sonda em aço inox e *display* digital com escala em graus Celsius (Incoterm[®]).

Análise microbiológica para identificação das fontes de contaminação da carne bovina *in natura*

Nos oito estabelecimentos selecionados, foram coletadas de forma asséptica, conforme o método de *swab-test*, 8 amostras das mãos dos manipuladores para a contagem de coliformes totais e *Staphylococcus aureus* e 8 amostras das superfícies de bancadas (100 cm²). As amostras foram imediatamente encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia do CCS da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, onde se procederam as contagens de coliformes totais, *E. coli* e *Staphylococcus aureus*. Empregaram-se placas Petrifilm[®] CC (para quantificação de coliformes totais) e Petrifilm[®] STX (para quantificação de *S. aureus*) (3M Company)⁹ nas amostras de *swab* de manipuladores e Petrifilm[®] EC para quantificação de coliformes totais e *E. coli* nas superfícies das bancadas. O procedimento analítico e o tempo/temperatura de incubação seguiram as instruções de uso do fabricante. No Petrifilm[®] CC e no Petrifilm[®] EC, foram considerados os coliformes totais e *E. coli* conforme descrito anteriormente, e no Petrifilm[®] STX foram consideradas como *S. aureus* as colônias vermelho-violetas. As populações obtidas foram expressas em unidades formadoras de colônias (UFC) por mão (manipuladores) ou por cm² (superfície de bancadas).

Procedimentos éticos

O estudo foi apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade Maria Milza (Protocolo

607/2010), conforme determina a Resolução n. 196/96¹⁰ do Conselho Nacional de Saúde.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação das condições físico-estruturais e higiênico-sanitárias dos estabelecimentos

Os valores em relação ao cumprimento dos itens discriminados variam entre 100% e 76%, 75% e 51% e 50% e 0%, permitindo a classificação dos locais de comercialização de carne bovina *in natura* em grupo 1, grupo 2 e grupo 3 respectivamente, conforme estabelece a RDC n.º 275/2002⁷, da ANVISA, que determina que todos os itens da lista de verificação devem ser atendidos pelos estabelecimentos.

Na classificação geral, não houve nenhum estabelecimento alocado no grupo 1, e 40% foram classificados no grupo 2 e 60%, no grupo 3. Identificou-se a partir da aplicação da lista de verificação que 100% dos locais de comercialização de carne bovina *in natura* apresentam não conformidades com o que estabelece a RDC n. 216⁸. Os piores resultados encontrados foram nos blocos referentes a equipamentos, móveis e utensílios, manipuladores e documentação (Figura 1), sendo a maioria dos supermercados classificados no grupo 3. Por meio da análise de frequência, foi possível observar que os estabelecimentos de maior porte apresentaram maior percentual de adequação.

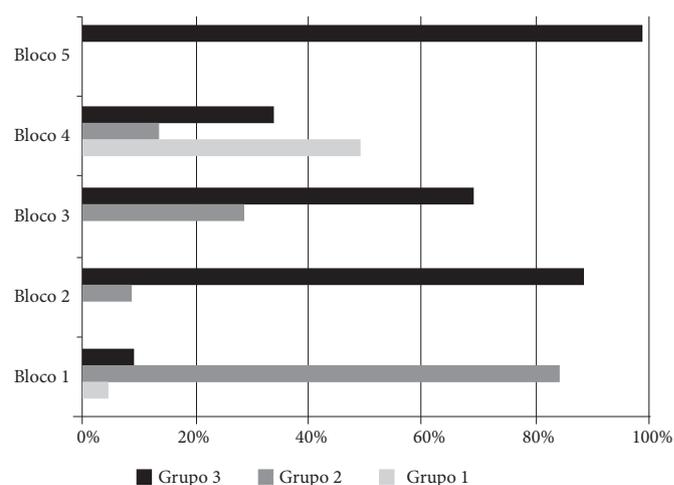


Figura 1. Classificação dos estabelecimentos por grupo de acordo com os blocos da lista de verificação: Bloco 1 – edificação e instalações; Bloco 2 – equipamentos, móveis e utensílios; Bloco 3 – manipuladores; Bloco 4 – matéria-prima; e Bloco 5 – documentação.

Neste estudo, verificou-se que 85% dos estabelecimentos não têm vestiário ou apresentam vestiários

com área incompatível para o número de funcionários, e também não possuíam armários individuais para todos os manipuladores.

Apenas 10% dos estabelecimentos possuíam instalações sanitárias dotadas de produtos destinados a higiene pessoal, e 100% não apresentavam avisos descritivos com procedimento para lavagem das mãos. Verificou-se que 90% dos locais não possuíam lavatórios para a higiene das mãos, porém os estabelecimentos que possuíam lavatórios não eram exclusivos para o procedimento de lavagem das mãos e não continham todos os materiais de higiene necessários para o procedimento. Lundgren et al.⁴ encontraram circunstância parecida, em que 16,4% dos 67 pontos de venda de carne bovina avaliados apresentavam lavatório para a higiene das mãos.

A legislação estabelece que os lavatórios devam ser exclusivos para a higiene das mãos na área de manipulação, em posições estratégicas em relação ao fluxo de produção dos alimentos e em número satisfatório de modo a atender toda a área de preparação, devendo conter sabonete líquido antisséptico ou sabonete líquido inodoro e produto antisséptico, toalhas de papel não reciclado ou outro sistema higiênico de secagem das mãos.

A ausência de lavatórios exclusivos para as mãos e de produtos para a correta higienização das mãos possibilita a execução de procedimentos incorretos de lavagem das mãos pelos manipuladores de alimentos, comprometendo a inocuidade do produto final.

Nenhum estabelecimento realizava perfeitamente as técnicas de higienização de instalações, equipamentos, utensílios e móveis, devido a incorreta diluição, tempo de contato e modo de aplicação dos produtos sanificantes. Soto et al.¹², em estudo em supermercados, identificaram não conformidades na limpeza/desinfecção das instalações.

Verificou-se que 95% dos açougues dos estabelecimentos não dispunham de local exclusivo e apropriado para o armazenamento dos utensílios, possibilitando a ocorrência de contaminação do mesmo e, conseqüentemente, a da carne. Foi identificado que 100% dos estabelecimentos não possuíam funcionário responsável pela higienização de equipamentos, móveis e utensílios, comprovadamente capacitados segundo determina legislação sanitária vigente⁸.

A avaliação da higiene pessoal dos magarefes possibilitou constatar que em 60% dos estabelecimentos os manipuladores apresentavam irregularidades em relação a asseio pessoal, proteção para os cabelos, ausência de adornos, mãos limpas, unhas limpas e curtas, ausência

de esmaltes e sem barba. Foi observado que em 50% dos locais os funcionários não estavam paramentados de acordo com sua função, não utilizando uniformes de cor clara e sapatos completamente fechados. Estudo em supermercados de João Pessoa-PB demonstrou que em 57% dos supermercados os manipuladores utilizavam adornos¹¹.

Em 65% dos estabelecimentos, os funcionários não faziam a lavagem cuidadosa das mãos antes da manipulação dos alimentos, especialmente após qualquer interrupção e logo após o uso de sanitários. Os resultados encontrados relacionados aos hábitos higiênicos e às práticas de manipulação dos alimentos podem estar associados à inexistência de programas de capacitação verificados em 85% dos estabelecimentos. A formação de manipuladores em higiene pessoal e práticas adequadas de manipulação de alimentos permitem que os funcionários construam conhecimentos, fundamentais para a execução de suas tarefas, eliminando possíveis erros no processo de fabricação/produção.

Em relação ao uso da luva de malha de aço pelos magarefes como equipamento de proteção individual (EPI), apenas 1 estabelecimento atendia a essa exigência. O não cumprimento dos regulamentos técnicos referentes a uniformização, práticas adequadas de manipulação e uso de EPIs permite a contaminação do produto e possíveis acidentes, interferindo de forma negativa na saúde dos manipuladores e dos clientes.

A carne bovina *in natura* comercializada pelos 20 estabelecimentos pesquisados é originária de frigorífico do Recôncavo da Bahia, com adequado sistema de abate e correta inspeção sanitária. Para que esta qualidade permaneça, a temperatura do produto deve ser mantida de acordo com as características dos alimentos, impossibilitando o crescimento microbiano e a deterioração dos alimentos. Em 65% dos supermercados pesquisados, as operações envolvendo a recepção de carne bovina *in natura* acontecem em local protegido e isolado da área de processamento, conforme a RDC nº 216⁸, da ANVISA, sendo que em 55% não há critérios de seleção e recebimento dos produtos pautados na segurança do alimento. Observou-se em 55% dos estabelecimentos que a temperatura da carne no balcão frigorífico de exposição estava acima de 7 °C, semelhante ao observado por Oliveira et al.¹¹, em que 57% dos estabelecimentos armazenavam carnes acima da temperatura permitida em legislação. Os resultados encontrados podem estar ligados à ausência de controle dos equipamentos de refrigeração.

Não existem MBPF e POPs em nenhum dos locais visitados. Esses documentos são extremamente relevantes para a execução das BPF, para a garantia da higiene e a produção de alimentos seguros.

Avaliação das condições higiênico-sanitárias da carne bovina *in natura*

A população de coliformes a 35 °C variou entre $1,0 \times 10^2$ a $3,1 \times 10^4$ UFC/g, sendo que todas as amostras analisadas apresentaram coliformes totais. Segundo a RDC nº 12/2001³, o Brasil não dispõe de padrões microbiológicos para coliformes totais e coliformes termotolerantes na carne bovina *in natura*. Oliveira et al.¹¹, empregando o método do número mais provável (NMP) de coliformes totais, obtiveram populações de $2,3 \times 10$ a $2,4 \times 10^3$ NMP/g (média de $1,4 \times 10^3$ NMP/g) em amostras de carne *in natura*. Lundgren et al.⁴, em estudo similar, encontraram populações médias de coliformes totais de $1,8 \times 10^3$ NMP/g. Os resultados obtidos em relação à presença de coliformes totais nas amostras analisadas indicam condições higiênico-sanitárias insatisfatórias durante o processamento da carne e inexistência de boas práticas de manipulação.

Quanto à determinação de *E. coli* nas carnes analisadas, apenas 1 (12,5%) de 8 amostras analisadas apresentou contagem de $2,0 \times 10$ UFC/g, considerando o limite de detecção do método estabelecido. O parâmetro microbiológico para carne bovina estabelecido pela Secretaria Municipal de Saúde de São Paulo para coliformes termotolerantes é uma população de no máximo $2,0 \times 10^2$ UFC/g. Em pesquisa realizada em supermercados de João Pessoa, foi encontrada *E. coli* em 70% das amostras de carne analisadas, sendo que em 50% das amostras analisadas o número de coliformes termotolerantes foi superior a 10^3 NMP/g¹¹.

Assim, a presença de *E. coli* nas amostras de carne bovina *in natura* analisadas sugere a contaminação de origem fecal e práticas inadequadas de manipulação do produto, apesar da baixa contaminação encontrada neste estudo.

Identificação das fontes de contaminação da carne bovina *in natura*

Os resultados encontrados (Tabela 1) revelam que 100% das amostras das mãos dos manipuladores apresentaram valores acima do padrão microbiológico estabelecido como satisfatório (10^2 UFC/mãos) de *Staphylococcus aureus*⁹. Os valores encontrados de *S. aureus* variaram entre 6×10^2 a $2,9 \times 10^4$ UFC/mão. Oliveira et al.¹⁴

obtiveram valores entre $2,6 \times 10^3$ e $1,4 \times 10^5$ UFC/mão de estafilococos coagulase positiva. A presença de *S. aureus* nas mãos dos magarefes em quantidades insatisfatórias indica falha ou ausência do procedimento de lavagem das mãos.

Tabela 1. Quantificação de coliformes totais e *Escherichia coli* em superfícies de bancadas de corte (2) e quantificação de coliformes totais e *Staphylococcus aureus* em superfícies de mãos (1) de manipuladores (magarefes) em oito supermercados do município de Santo Antônio de Jesus-BA

Amostra	Coliformes totais (UFC/g)	<i>Escherichia coli</i> (UFC/g)	<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/g)
A1	$3,5 \times 10$	–	$1,2 \times 10^4$
A2	$2,7 \times 10^4$	2×10	–
B1	$7,5 \times 10$	–	$1,6 \times 10^4$
B2	$1,4 \times 10^4$	7×10	–
C1	$3,7 \times 10^2$	–	$2,9 \times 10^4$
C2	$2,2 \times 10^4$	$4,6 \times 10$	–
D1	$2,8 \times 10^3$	–	$2,8 \times 10^4$
D2	$1,1 \times 10^3$	2×10	–
E1	2×10^2	–	7×10^2
E2	6×10^2	7×10	–
F1	2×10	–	6×10^3
F2	$3,1 \times 10^3$	< 10	–
G1	< 10	–	$1,6 \times 10^4$
G2	$3,7 \times 10^4$	< 10	–
H1	$6,1 \times 10^2$	–	6×10^2
H2	2×10	< 10	–

Foram encontrados valores de coliformes totais entre < 10 e $2,8 \times 10^3$ UFC/mão. Para a contagem de coliformes totais nas mãos de manipuladores de alimentos, não existem parâmetros pré-estabelecidos na legislação brasileira. Oliveira et al.¹⁴ obtiveram populações com intervalo inferior, entre $0,43 \times 10$ e $4,6 \times 10$ UFC /mão. A presença de coliformes totais nas mãos dos manipuladores confirma incorreta técnica de lavagem das mãos ou ausência deste procedimento.

Nas análises microbiológicas realizadas para determinação de coliformes totais em 100 cm² da bancada de corte de carne dos estabelecimentos, foram encontrados valores acima do padrão microbiológico estabelecido pela APHA (1984) *apud* Silva Jr.⁹, o qual recomenda ausência de coliformes em 100 cm² da amostra para equipamentos e utensílios, sendo encontradas populações entre $2,0 \times 10$ e $3,7 \times 10^4$ UFC/cm² (Tabela 1). Nos açougues em Pelotas-RS, foram encontrados valores de coliformes a 35 °C que variaram de $2,0 \times 10^2$ a $9,0 \times 10^3$ NMP em 1.050 cm² nas bancadas e serras de corte³.

A presença de coliformes totais em equipamentos, móveis e utensílios indica contaminação microbiana devido

à realização de procedimentos inadequados de higienização, podendo levar a contaminação da carne por micro-organismos patogênicos infecciosos e/ou deteriorantes.

A concentração de coliformes a 45 °C em 100 cm² da bancada de corte da carne variou de < 10 a 7,0 × 10 UFC/cm² (Tabela 1). Os valores encontrados estão acima do padrão microbiológico estabelecido, o qual determina como satisfatório a ausência de coliformes termotolerantes em 100 cm² da amostra, segundo a metodologia de Harrigan e Maccance¹⁵.

A presença de *E. coli* indica contaminação microbiana de origem fecal e, portanto, condições higiênico-sanitárias insatisfatórias, demonstrando dessa forma inadequada higienização das bancadas de corte, podendo ocorrer contaminação da matéria-prima, colocando em risco a saúde dos consumidores. De acordo com os resultados das análises microbiológicas, pode-se inferir que as mãos dos manipuladores e as bancadas foram fontes de contaminação do produto, considerando que a carne bovina coletada era proveniente de frigorífico com inspeção estadual, sendo, assim, uma fonte segura.

CONCLUSÃO

Com este estudo, pôde-se observar que os supermercados avaliados estão em desacordo com a legislação sanitária vigente em relação tanto aos aspectos físico-estruturais quanto aos higiênico-sanitários. Em todos os estabelecimentos, foram encontradas falhas nas BPF, as quais expõem o produto a contaminação microbiológica em níveis que podem não somente comprometer a qualidade do alimento como também causar danos à saúde dos consumidores.

Os resultados microbiológicos demonstraram a execução de procedimentos inadequados de manipulação de alimentos e higienização de equipamentos, móveis e utensílios, determinando dessa forma condições higiênico-sanitárias inadequadas, favorecendo a contaminação do produto final. Desta forma, sugere-se a definição de padrões ou recomendações mais adequadas às condições brasileiras para o controle microbiológico dos alimentos, em especial a carne bovina *in natura*. Conclui-se que os supermercados de Santo Antônio de Jesus-BA necessitam não somente de intervenções por parte dos órgãos fiscalizadores, mas também de educação sanitária dos proprietários e empregados desses estabelecimentos e da população que consome os produtos, visando à produção e ao consumo do alimento seguro.

Este estudo contribui para o melhor conhecimento das necessidades dos estabelecimentos locais. É um tipo de

pesquisa fundamental para todo o campo de estudo, e basta a incorporação de novos dados para serem possíveis seu ajustamento às novas realidades e a busca por melhorias contínuas.

REFERÊNCIAS

1. Cardoso L, Araújo WMC. Parâmetros de qualidade em carnes comercializadas no Distrito Federal no período de 1997-2001. *Rev Hig Aliment*. 2003;17:12-8.
2. Roça RO, Serrano AM. Abate de bovinos: alterações microbianas da carcaça. *Rev Hig Aliment*. 1995;35(9):8-11.
3. Mendonça CR, Granada GG. Coliformes em açougues de Pelotas-RS. *Rev Bras Agrociênc*. 1999;5(1):75-6.
4. Lundgren PU, Silva JA, Maciel JF, Fernandes TM. Perfil da qualidade higiênico-sanitária da carne bovina comercializada em feiras livres e mercados públicos em João Pessoa/PB-Brasil. *Alim Nutr*. 2009;20(1):113-9.
5. Abcz. Expogenética: supermercados apostam na carne bovina certificada para aumentar vendas. [acesso 2011 jun 2]. Disponível em: [<http://www.abcz.org.br/noticias/3314>, 2009].
6. Santo Antônio de Jesus. Prefeitura Municipal de Santo Antônio de Jesus. Departamento de Vigilância à Saúde. Vigilância Sanitária. 2010.
7. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC n. 275, de 21 de outubro de 2002. Dispõe sobre o regulamento técnico de procedimentos operacionais padronizados aplicados aos estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos e a lista de verificação das boas práticas de fabricação em estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos. *Diário Oficial [da] União*. Brasília, 06 nov 2002.
8. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC n. 216, de 15 de setembro de 2004. Dispõe sobre o regulamento técnico de boas práticas para serviços de alimentação. *Diário Oficial [da] União*. Brasília. [acesso 2010 set 13]. Disponível em: [<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=100>].
9. Silva Jr. EA. Manual de controle higiênico sanitário em alimentos. São Paulo: Livraria Varela; 2007.
10. Brasil. Resolução n. 196, de 10 de outubro de 1996. Diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos. *Diário Oficial [da] União Brasília*, 16 out 1996, n. 201.
11. Oliveira S, Silva JA, Maciel JF, Aquino JS. Avaliação das condições higiênico-sanitárias de carne bovina comercializada em supermercados de João Pessoa. *Alim Nutr*. 2008;19(1):61-6.
12. Soto FRM, Risseto MR, Cazolla CPB, Alves LCR, Balian SC, Maldonado AG, et al. Proposta e análise crítica de um protocolo de inspeção e de condições sanitárias em supermercados do município de Ibiúna- SP. *Rev Bras Epidemiol*. 2006;9(2):235-41.
13. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC n. 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, 10 jan 2001, Seção 1, n. 7-E, p. 45-53.
14. Oliveira MM, Brugnera DF, Mendonça AT, Piccoli RH. Condições higiênico-sanitárias de máquinas de moer carne, mãos de manipuladores e qualidade microbiológica da carne moída. *Ciênc Agrotec*. 2008;32(6):1893-8.
15. Harrigan WF, McCance ME. Laboratory methods in food and dairy microbiology. Londres: Academic Press; 1976.

Avaliação da qualidade físico-química de leites pasteurizados

Evaluation of physicochemical quality of pasteurized milk

RIALA6/1454

Emanuel Neto Alves de OLIVEIRA*, Dyego da Costa SANTOS

*Endereço para correspondência: Unidade Acadêmica de Engenharia Agrícola, Centro de Tecnologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de Campina Grande. Av. Aprígio Veloso, 882, Bodocongó, CEP 58109-970, Campina Grande, PB, Brasil. Tel.: (83) 3310-1055. E-mail: emanuelnetoliveira@ig.com.br.

Recebido: 05.06.2011 - Aceito para publicação: 11.02.2012

RESUMO

Neste estudo, foram avaliadas a qualidade físico-química, a atividade enzimática e a possível ocorrência de fraudes em 30 amostras de leites pasteurizados provenientes de municípios da região do Vale do Jaguaribe, Ceará. Os parâmetros analisados foram densidade relativa a 15 °C, teor de gordura, extrato seco total e desengordurado, aguagem, acidez titulável, amido, peroxidase, fosfatase alcalina, alcalinos e cloretos. O parâmetro alcalinos foi o mais alterado: 24 (80%) amostras demonstraram valores desconformes com os estabelecidos pela legislação brasileira. Pelas análises de acidez, extrato seco desengordurado e aguagem, 12 (40%) amostras foram reprovadas. 11 (36,67%) amostras evidenciaram a presença da enzima fosfatase alcalina. A análise de extrato seco total reprovou 5 (16,67%) amostras. Em 5 (16,67%) amostras, foi revelada a presença de cloretos, e 2 (6,67%) mostraram teor de gordura abaixo do permitido pela legislação em vigor. Quanto à densidade, 1 (3,33%) amostra estava fora do padrão em vigor. Todas as amostras foram aprovadas nos ensaios de peroxidase (positivo) e amido (ausência). A maioria do leite comercializado nas cidades cearenses pesquisadas está em desacordo com os padrões estabelecidos pela legislação brasileira, por apresentar irregularidades em sua composição.

Palavras-chave. fraudes, pasteurização, qualidade do leite.

ABSTRACT

In this study, we evaluated the physicochemical quality, the enzyme activity and the possible occurrence of fraud in 30 samples of pasteurized milk collected from municipalities in the region of Vale do Jaguaribe, Ceará. The following parameters were analyzed: relative density at 15 °C, fat contents, total and defatted dry extract, added water, titratable acidity, starch, peroxidase, alkaline phosphatase, alkaline and chlorides. Alkaline was the parameter mostly noncompliant with those specified by Brazilian legislation, which was found in 24 (80%) samples. Noncompliant acidity, defatted dry extract and added water characteristics were found in 12 (40%) samples. Alkaline phosphatase was detected in 11 (36.67%) samples. The total dry extract parameter was disapproved in 5 (16.67%) samples. 5 (16.67%) samples evidenced chloride contents, and in 2 (6.67%) the fat parameter was below than that established by the legislation in force; and 1 (3.33%) sample was out of standard in density parameter. Compliant results on peroxidase (positive) and starch (absence) parameters were found in all analyzed samples. The majority of milk samples marketed in the surveyed cities of Ceará showed irregularities in composition, being noncompliant with the standards established by Brazilian legislation.

Keywords. fraud, pasteurization, quality of milk.

INTRODUÇÃO

O leite é uma mistura complexa, composto por várias substâncias, como água, proteínas, gorduras, carboidratos, minerais e vitaminas, constituindo-se um alimento humano bastante próximo à perfeição. Segundo Bortoli et al.¹, é uma fonte alternativa de proteínas acessíveis à população de baixa renda, que geralmente é carente em proteína de origem animal, comprovando a importância socioeconômica deste alimento.

O leite pasteurizado tem uma vida de prateleira curta, e entre os fatores que envolvem a deterioração desse produto durante a estocagem estão fatores intrínsecos, como nível de ácidos graxos livres e conteúdo natural de metais do leite ou fatores externos e de processamento, incluindo manuseio, agitação, estocagem, temperatura, exposição a luz e contaminação por metais ou micro-organismos².

Deste modo, a qualidade do leite interfere negativamente na produção e no rendimento de derivados. Para Polegato e Rudge³, as maiores preocupações quanto à qualidade físico-química do leite estão associadas ao estado de conservação, à eficiência do seu tratamento térmico e à integridade físico-química, principalmente aquela relacionada à adição ou remoção de substâncias químicas próprias ou estranhas a sua composição.

Várias pesquisas foram desenvolvidas para avaliar a qualidade de leites pasteurizados provenientes de diversos estados brasileiros: Paraná⁴, Piauí⁵, Alagoas⁶, Minas Gerais⁷, Paraíba⁸, Rio Grande do Sul⁹, entre outros.

Levando em consideração a necessidade de pesquisas sobre o tema na região Nordeste e a importância de informações dessa natureza para o aprimoramento da cadeia produtiva do leite, objetivou-se com este trabalho avaliar a qualidade físico-química, enzimática e a possível ocorrência de fraudes em leites pasteurizados provenientes de municípios da região do Vale do Jaguaribe, Ceará, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas no Laboratório de Bromatologia da Faculdade de Tecnologia CENTEC, Limoeiro do Norte-CE, 30 amostras de leites pasteurizados comercializados no mercado varejista de municípios localizados na região do Vale do Jaguaribe, Ceará, Brasil. Na coleta das amostras, foram observados o estado de conservação, a embalagem, a data de fabricação e a validade (3 dias).

Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em caixa térmica e conduzidas ao laboratório para determinação das características físico-químicas e comparação dos resultados com os valores estabelecidos pela legislação¹⁰.

Os procedimentos analíticos foram realizados conforme segue: densidade relativa a 15 °C, teor de gordura, extrato seco desengordurado (ESD) e aguagem com utilização do aparelho EKOMILK⁶, conforme recomendação do fabricante; acidez titulável, extrato seco total (EST), amido, peroxidase e fosfatase alcalina segundo metodologias do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento¹¹, alcalinos (NaOH) e cloretos de acordo com os métodos descritos em Merck¹².

O delineamento experimental foi o de blocos inteiramente casualizados com trinta tratamentos e três repetições utilizando-se o *software* Assistat. Os dados foram submetidos a análise de variância (Anova), e a comparação de médias foi feita pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os resultados dos parâmetros físico-químicos encontrados nas análises das trinta amostras de leite pasteurizados comercializados em municípios da região do Vale do Jaguaribe, Ceará, Brasil.

Verifica-se que 1 (3,33%) amostra apresentou densidade relativa a 15 °C abaixo do permitido pela legislação vigente, que é de no mínimo 1,028 e no máximo 1,034^{3,10}. A baixa densidade do leite está relacionada com a alimentação do animal e com o teor de gordura do leite. A densidade é o peso específico do leite, cujo resultado depende da concentração de elementos em solução e da porcentagem de gordura. Silva et al.⁶, caracterizando o leite pasteurizado destinado ao programa do leite no estado de Alagoas, encontraram um índice de reprovação de 5 (1,4%) amostras analisadas para o parâmetro densidade.

Para o parâmetro acidez titulável, 12 (40%) amostras apresentaram valores em desacordo com a legislação, com valores fora da faixa de 14 a 18 °D. O valor médio encontrado para acidez foi de 17,08 ± 3,28 °D. Os valores acima do permitido indicam que provavelmente não houve refrigeração imediata logo após a pasteurização, ou ainda ocorreu falta de higiene durante a produção. Os micro-organismos mesófilos são os principais responsáveis pela acidez do leite, sendo o parâmetro mais importante para a avaliação da qualidade

Tabela 1. Resultados dos parâmetros físico-químicos dos leites pasteurizados comercializados na região do Vale do Jaguaribe, Ceará, Brasil

Amostra	Parâmetro					
	DR a 15 °C (g/cm ³)	Acidez titulável (°D)	Teor de gordura (%)	EST (%)	ESD (%)	Aguagem (%)
LT ₁	1,0306 ^{abcdef}	16,28 ^{gh}	3,90 ^a	12,68 ^{abc}	8,70 ^{bcde}	0,00 ⁱ
LT ₂	1,0310 ^{abcdef}	15,30 ^{hi}	3,80 ^{ab}	12,90 ^b	9,10 ^{ab}	0,00 ⁱ
LT ₃	1,0314 ^{abcdef}	18,78 ^{def}	3,56 ^{abcd}	12,40 ^{cde}	8,84 ^{bcd}	0,00 ⁱ
LT ₄	1,0286 ^{defg}	20,81 ^{bc}	3,00 ^{efg}	10,91 ^p	7,90 ^{hij}	6,30 ^e
LT ₅	1,0296 ^{bcdef}	14,50 ^{ij}	3,40 ^{abcdef}	11,70 ^{il}	8,40 ^{defg}	1,10 ^h
LT ₆	1,0314 ^{abcdef}	19,28 ^{cde}	3,20 ^{cdef}	12,09 ^{efgh}	8,80 ^{bcd}	0,00 ⁱ
LT ₇	1,0284 ^{defg}	21,20 ^b	3,21 ^{cdef}	11,18 ^o	7,97 ^{ghij}	5,23 ^d
LT ₈	1,0340 ^a	14,80 ^{hij}	3,60 ^{abc}	12,90 ^b	9,50 ^a	0,00 ⁱ
LT ₉	1,0316 ^{abcde}	17,40 ^{fg}	3,40 ^{abcdef}	12,36 ^{cde}	8,90 ^{bc}	0,00 ⁱ
LT ₁₀	1,0314 ^{abcdef}	19,38 ^{cd}	3,05 ^{defg}	11,77 ^{ghil}	8,72 ^{bcde}	0,00 ⁱ
LT ₁₁	1,0294 ^{cdefg}	17,57 ^{fg}	3,23 ^{cdef}	11,66 ^{il}	8,43 ^{cdefg}	0,00 ⁱ
LT ₁₂	1,0322 ^{abc}	14,47 ^{ij}	3,60 ^{abc}	12,55 ^{bcd}	8,90 ^{bc}	0,00 ⁱ
LT ₁₃	1,0290 ^{cdefg}	15,30 ^{hi}	2,90 ^{fg}	10,60 ^p	7,70 ^j	8,50 ^a
LT ₁₄	1,0260 ^g	14,47 ^{ij}	3,40 ^{abcdef}	11,61 ^{il}	8,20 ^{fghi}	2,50 ^f
LT ₁₅	1,0290 ^{cdefg}	14,70 ^{ij}	3,80 ^{ab}	12,40 ^{cde}	8,70 ^{bcde}	0,00 ⁱ
LT ₁₆	1,0300 ^{bcdef}	28,76 ^a	2,60 ^g	11,11 ^o	8,40 ^{defg}	1,25 ^h
LT ₁₇	1,0296 ^{bcdef}	13,86 ^{ij}	3,60 ^{abc}	11,85 ^{ghij}	8,20 ^{fghi}	1,86 ^g
LT ₁₈	1,0310 ^{abcdef}	18,00 ^{def}	3,50 ^{abcde}	11,80 ^{ghil}	8,30 ^{efgh}	1,20 ^h
LT ₁₉	1,0286 ^{defg}	13,60 ^j	3,60 ^{abc}	11,70 ^{il}	8,10 ^{ghij}	0,00 ⁱ
LT ₂₀	1,0318 ^{abcd}	17,80 ^{efg}	3,20 ^{cdef}	17,21 ^a	8,90 ^{bc}	0,00 ⁱ
LT ₂₁	1,0300 ^{bcdef}	14,40 ^{ij}	3,20 ^{cdef}	11,60 ^l	8,30 ^{efgh}	1,30 ^h
LT ₂₂	1,0312 ^{abcdef}	14,47 ^{ij}	3,70 ^{abc}	12,31 ^{def}	8,60 ^{cdef}	0,00 ⁱ
LT ₂₃	1,0310 ^{abcdef}	18,40 ^{def}	3,20 ^{cdef}	11,96 ^{fghi}	8,70 ^{bcde}	0,00 ⁱ
LT ₂₄	1,0298 ^{bcdef}	17,70 ^{fg}	3,20 ^{cdef}	11,50 ^m	8,20 ^{fghi}	0,00 ⁱ
LT ₂₅	1,0280 ^{fg}	18,00 ^{def}	3,00 ^{efg}	10,74 ^p	7,74 ^{ij}	8,10 ^b
LT ₂₆	1,0310 ^{abcdef}	18,40 ^{def}	3,40 ^{abcdef}	12,12 ^{efg}	8,69 ^{bcde}	0,00 ⁱ
LT ₂₇	1,0296 ^{bcdef}	22,10 ^b	3,20 ^{cdef}	11,45 ⁿ	8,10 ^{ghij}	2,90 ^e
LT ₂₈	1,0306 ^{abcdef}	14,33 ^{ij}	3,35 ^{bcdef}	11,76 ^{hil}	8,42 ^{cdefg}	1,05 ^h
LT ₂₉	1,0330 ^{ab}	14,70 ^{ij}	3,55 ^{abcd}	12,80 ^b	9,41 ^a	0,00 ⁱ
LT ₃₀	1,0282 ^{efg}	13,70 ^j	3,65 ^{abc}	11,71 ^{il}	8,16 ^{fghij}	0,00 ⁱ
MG	1,0302	17,08	3,37	12,04	8,50	1,38
DP	0,0016	3,28	0,30	1,15	0,45	2,44
DMS	0,0036	1,56	0,51	0,36	0,49	0,30
CV(%)	0,0838	2,22	3,68	0,72	1,40	5,32
F cal.	7,2772**	148,96**	11,43**	354,05**	28,27**	2228,40**

DR: Densidade relativa; EST: Extrato seco total; ESD: Extrato seco desengordurado; ^lMédias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey; ** - significativo a 1% de probabilidade pelo teste F; MG: Média geral; DP: Desvio-padrão; DMS: Diferença média significativa; CV: Coeficiente de variação

do leite quanto ao aspecto tecnológico, pois indica o grau de metabolização da lactose em ácido láctico, em função da má qualidade microbiológica e da conservação inadequada. Mendes et al.¹³, analisando a qualidade do leite informal comercializado no município de Mossoró-RN, verificaram que 2 (6,2%) amostras apresentaram resultados de acidez fora do especificado pela legislação brasileira¹⁰.

Quanto ao teor de gordura, 2 (6,67%) amostras foram reprovadas, apresentando valores inferiores ao mínimo permitido, que é de 3%¹⁰. O teor médio de gordura foi de $3,37 \pm 0,30\%$, apresentando variação de 2,60% e 3,90%. Caldeira et al.⁷, caracterizando o leite comercializado em Janaúba-MG, verificaram teor médio de gordura de $3,2 \pm 0,55\%$ nas 30 amostras analisadas.

Observa-se que 5 (16,66%) amostras apresentaram valores de extrato seco total inferiores ao mínimo permitido, que é de 11,40%¹⁰. O valor médio encontrado para EST foi de $12,04 \pm 1,15\%$, com valor mínimo de 10,60% e máximo de 17,21%. Mattos et al.¹⁴, estudando 53 amostras de leites crus provenientes da região do agreste de Pernambuco, encontraram variação de EST de 10,5% a 14,43%, com reprovação de 7 amostras.

Verifica-se que 12 (40%) amostras revelaram valores de extrato seco desengordurado inferiores ao permitido pela legislação em vigor, que é de no mínimo 8,40%¹⁰. Os teores de ESD variaram de 7,70% a 9,50%, com valor médio de $8,50\% \pm 0,45\%$. Os sólidos não gordurosos, que compreendem todos os elementos do leite menos a água e a gordura, representam em média 8,9% do total no leite³. Silva et al.⁶, caracterizando o leite pasteurizado destinado ao programa do leite no estado de Alagoas, verificaram que 30 (8,6%) amostras estavam em desacordo quanto à análise de extrato seco desengordurado. Mendes et al.¹³, analisando a qualidade do leite informal comercializado no município de Mossoró-RN, verificaram que 3 (40,6%) amostras estavam com valores de extrato seco desengordurado abaixo do permitido pela legislação vigente¹⁰.

Foi observado que 12 (40%) amostras apresentaram valores superiores a 0,00 (zero) para o parâmetro de aguagem. Os valores de aguagem variaram de 0,00 (zero) a 8,50%, com valor médio de $1,38 \pm 2,44\%$. De acordo com Behmer¹⁵, as principais falsificações do leite são a aguagem e a adição de conservadores. A adição de água no leite pode ser pesquisada pelo teste de densidade, o que detecta imediatamente a fraude, ou pela análise crioscópica, que mede o ponto de congelamento

ou depressão do ponto de congelamento do leite em relação ao da água.

Para verificar se o tempo e a temperatura utilizados na pasteurização foram eficientes, são pesquisadas duas enzimas: fosfatase alcalina e peroxidase. A fosfatase alcalina é sensível a pasteurização (temperatura de inativação entre 72 e 75 °C), e sua presença no produto final indica que o processo de pasteurização não foi eficiente. A peroxidase não é inativada pela pasteurização, mas é destruída em temperaturas superiores a 80 °C, sendo, portanto, utilizada para verificar se ocorreu o superaquecimento durante o tratamento térmico⁵.

Observa-se na Figura 1 que o teste de fosfatase alcalina foi positivo em 11 (36,67%) amostras, indicando que o tempo e a temperatura utilizados na pasteurização foram ineficientes. Todas as amostras (100%) apresentaram a presença da enzima peroxidase.

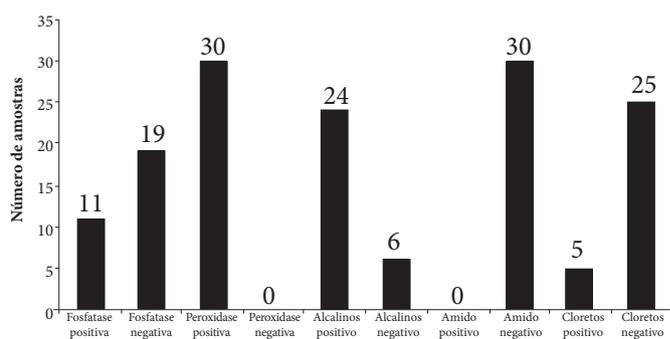


Figura 1. Resultado das análises enzimáticas, alcalinos, cloretos e amido nos leites pasteurizados comercializados na região do Vale do Jaguaribe, Ceará, Brasil

Evidenciou-se a presença de substâncias alcalinas em 24 (80%) amostras (Figura 1). A presença de substâncias alcalinas no leite pode ser oriunda de fraude intencional, quando se utiliza de substâncias alcalinas para conservar o leite, mas também pode ocorrer devido a falhas no momento da higienização e da sanitização na obtenção do leite e/ou dentro dos laticínios que utilizam soluções alcalinas na limpeza de equipamentos, utensílios ou mesmo da própria estrutura física para remoção de gordura do leite que possa ficar aderida. A adição de soluções alcalinas, para prolongar a conservação ou diminuir a acidez do leite, é considerada fraude. Contudo, bicarbonatos, formol, ácido bórico, peróxido de hidrogênio, bicromato de potássio, hipocloritos e ácido salicílico têm sido empregados como conservadores¹⁵. Mendes et al.¹³ não verificaram presença de alcalinos nas 32 amostras analisadas.

Na Figura 1, pode-se verificar que todas (100%) as amostras apresentaram resultado negativo para os ensaios de amido e 5 (16,67%) amostras apresentaram resultado positivo para a análise de cloretos. Segundo Behmer¹⁵, o amido, o açúcar e a urina são utilizados criminosamente para encobrir aguagem do leite, aumentando a densidade. Mendes et al.¹³ não verificaram presença de cloretos e amido nas 32 amostras analisadas.

Os resultados evidenciam que os maiores problemas se referem à presença de substâncias alcalinas, à acidez fora de especificação e à fraude pela adição de água e, conseqüentemente, uma diminuição no extrato seco desengordurado.

CONCLUSÃO

Constata-se que 60% das amostras de leite pasteurizado comercializadas nas cidades da região do Vale do Jaguaribe, Ceará, apresentaram irregularidades em sua composição, estando em desacordo com os padrões estabelecidos pela legislação brasileira. Os parâmetros mais alterados foram alcalinos, acidez, aguagem e extrato seco desengordurado. O processo de pasteurização não foi eficiente em 11 amostras, indicando que o tempo e a temperatura utilizados foram insuficientes na pasteurização.

Verifica-se a necessidade por parte dos laticínios de aplicação efetiva das boas praticas na cadeia produtiva de leites pasteurizados.

REFERÊNCIAS

1. Bortoli A, Gabbi AM, Viegas J, Rossarolla G, Engelmann AL, Sckonieski FR. Caracterização dos produtores de leite conveniados à Escola Federal de São Vicente do Sul-RS. 42^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, julho de 2005, Goiânia. Sociedade Brasileira de Zootecnia-Viçosa. p. 115-7. [Anais].
2. Vassila E, Badeka A, Kondyli E, Savvaidis I, Kontominas MG. Chemical and microbiological changes in fluid milk as affected by packaging conditions. *Int Dairy J*. 2002;12(9):715-22.
3. Polegato EPS, Rudge AC. Estudo das características físico-químicas e microbiológicas dos leites produzidos por miniusinas da região de Marília – São Paulo/Brasil. *Hig Aliment*. 2003;17(110):56-63.
4. Becker TA, Negrelo IF, Racoulte F, Drunkler DA. Avaliação da qualidade sanitária de leite integral informal, pasteurizado, UHT e em pó comercializados na cidade de Medianeira e Serranópolis do Iguau – Paraná. *Semina Ciênc Agrar*. 2010;31(3):707-16.
5. Oliveira MMA, Nunes IF. Análise microbiológica e físico-química do leite pasteurizado tipo “C” comercializado em Teresina, Piauí. *Hig Aliment*. 2003;17(111):92-4.
6. Silva MCD, Silva JVL, Ramos ACS, Melo RO, Oliveira JOO. Caracterização microbiológica e físico-química de leite pasteurizado destinado ao programa do leite no estado de Alagoas. *Cienc Tecnol Aliment*. 2008;28(1):226-30.
7. Caldeira LA, Rocha Júnior VR, Fonseca CM, Melo LM, Cruz AG, Oliveira LLS. Caracterização do leite comercializado em Janaúba-MG. *Alim Nutr*. 2010;21(2):191-5.
8. Moura JFP, Gomes HBF, Lopes Junior, WD, Oliveira CJB. Qualidade do leite pasteurizado padronizado e UAT comercializados na região de Campina Grande, PB. *Agropec Técn*. 2010;31(2):63-71.
9. Silva VAM, Rivas PM, Zanela MB, Pinto AT, Ribeiro MER, Silva FFP, et al. Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica do leite cru, do leite pasteurizado tipo A e de pontos de contaminação de uma granja leiteira no RS. *Acta Sci Vet*. 2010;38(1):51-7.
10. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa n. 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova e oficializa o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Tipo A, Tipo B, Tipo C, Cru refrigerado e Leite Pasteurizado. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, 20 set 2002, Seção 1, n. 183, p. 13-22.
11. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 68, de 12 dezembro de 2006. Oficializa os métodos analíticos oficiais físico-químicos, para controle de leite e produtos lácteos. *Diário Oficial da União*, 14 dez 2006, Seção I, p. 8.
12. Merck. Reativos, diagnóstica, productos químicos 1992/93. Darmstadt; 1993.
13. Mendes CG, Sakamoto SM, Silva JBA, Jacome CGM, Leite AI. Análises físico-químicas e pesquisa de fraude no leite informal comercializado no município de Mossoró, RN. *Ci Anim Bras*. 2010;11(2):349-56.
14. Mattos MR, Beloti V, Tamanini R, Magnani DF, Nero LA, Barros MAF, et al. Qualidade do leite cru produzido na região do agreste de Pernambuco, Brasil. *Semina Ciênc Agrar*. 2010;31(1):173-82.
15. Behmer MLA. Tecnologia do leite: leite, queijo, manteiga, caseína, iogurte, sorvetes e instalações: produção, industrialização, análise. 13. ed. São Paulo: Nobel; 1984.

Uso de soro de leite bovino para elaboração de meios de cultura para *Staphylococcus aureus*

Culture media made by bovine whey for *Staphylococcus aureus* growth

RIALA6/1455

Renata Albuquerque COSTA¹, Márcia Viviane de BRITO², Verônica Sousa de BRITO², Joséires Lira de Sousa FONTENELLE², Jackson Rafael Oliveira PEIXOTO³, Gustavo Hitzschky Fernandes VIEIRA², Regine Helena Silva dos Fernandes VIEIRA⁴

* Endereço para correspondência: ¹Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado, Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará (UFC), Avenida Abolição, 3207, CEP 60165-081, Fortaleza, CE. Tel.: (85) 3366-7027. E-mail: renata.albuq@gmail.com.

² Departamento de Biologia, Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA).

³ Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado, UFC.

⁴ Instituto de Ciências do Mar (Labomar), UFC.

Recebido: 20.07.2011 - Aceito para publicação: 11.01.2012

RESUMO

Foi investigada a eficiência do cultivo de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 em meios experimentais elaborados com soro de leite bovino. Foram preparados meios líquido (caldo soro – CS) e sólido (ágar soro – AS) suplementados com cloreto de sódio (CS+NaCl e AS+NaCl) e extrato de levedura (CS+Lev e AS+Lev). No meio AS, foi testado o enriquecimento com extrato de levedura (0,1%) e diluição em água (40%) (AS+H₂O+Lev). Os meios comerciais de caldo infusão cérebro coração (BHI) e ágar Baird-Parker (BP) foram utilizados como controle. A eficiência dos meios experimentais foi avaliada por determinação da biomassa e contagem de colônias, utilizando-se a cepa *S. aureus* ATCC 25923. Em todos os testes, o crescimento bacteriano foi compatível à quantificação observada nos meios utilizados como controle e houve desenvolvimento de colônias com características morfológicas típicas de *S. aureus*, principalmente no meio AS+H₂O+Lev. Concluiu-se que o soro de leite bovino pode ser utilizado como componente alternativo na elaboração de meio de cultura para *S. aureus*.

Palavras-chave. *Staphylococcus aureus*, lactossoro, meio de cultura experimental.

ABSTRACT

We investigated the cultivation of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 in experimental media containing bovine whey. Liquid (whey broth – WB) and solid (whey agar – WA) media supplemented with sodium chloride (WB+NaCl and WA+NaCl) and yeast extract (WB+yeast and WA+yeast) were prepared. In WA media, the enrichment with yeast extract (0.1%) and water dilution (40%) (WA+H₂O+yeast) was tested. Commercial brain heart infusion broth (BHI) and Baird-Parker agar (BP) media were used as controls. The efficiency of experimental culture media was assessed by means of biomass determination and colony counts by using *S. aureus* ATCC 25923 strain. The bacterial growths in all experimental media were identical to those found in control media. In addition, grown bacteria colonies showed morphological characteristics compatible with ATCC *S. aureus*, especially in the WA+H₂O+yeast medium. Therefore, the bovine whey proved to be efficient as an alternative culture medium for *S. aureus* isolation and growth.

Keywords. *Staphylococcus aureus*, bovine whey, experimental media.

INTRODUÇÃO

O soro de leite é um produto da indústria laticinista obtido por coagulação do leite e redução do pH, apresentando em sua composição química 4,5% de lactose, 0,8% de proteína, 1,0% de sais e 0,1 a 0,8% de ácido láctico¹.

De acordo com Wong e Lee², a eliminação de grandes quantidades de resíduos de soro do leite, que constitui o principal subproduto da fabricação de queijo, provoca impactos ambientais consideráveis devido a sua alta demanda biológica de oxigênio. A fim de oferecer alternativas para mitigação desse tipo de poluição, novas tecnologias e produtos vêm sendo desenvolvidos como opções para a utilização do resíduo de soro.

Citam-se diferentes formas de uso do lactossoro, dentre as quais destaca-se a elaboração de meios de cultivo para micro-organismos. Ibrahim e Bezkorovainy³ afirmam que α -lactoalbumina e β -lactoglobulina, derivadas do soro de leite bovino, podem ser adicionadas a meios de cultura como promotoras de crescimento bacteriano, principalmente de bifidobactérias.

Por outro lado, são escassos estudos sobre composição de meio, a partir de soro de leite, para bactérias de interesse clínico. Nesse contexto, é justificada a pesquisa de meios experimentais para o cultivo desses isolados, uma vez que nessa área, normalmente, os estudos priorizam micro-organismos com potencial biotecnológico.

Dentre os micro-organismos patogênicos para o homem, *Staphylococcus aureus* é reconhecido como agente etiológico de várias doenças⁴.

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo elaborar e avaliar a eficiência de meios para o cultivo de *Staphylococcus aureus*, tendo como base o soro de leite bovino.

METODOLOGIA

O soro de leite foi obtido na fazenda Experimental da Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA) e transportado em recipientes previamente esterilizados. Todas as amostras foram mantidas sob refrigeração até o seu uso.

A elaboração dos meios experimentais foi feita após tratamento do soro, seguindo-se as etapas: 5 litros do soro de leite foram deixados em repouso por 12 horas

sob refrigeração. O precipitado obtido (40% do soro total) foi dividido em duas alíquotas, e o pH foi ajustado para pH 2,0 e pH 4,5 com HCl 1 M, a fim de se obter um meio mais límpido. Após fervura por 30 minutos, o concentrado (20% de redução) foi filtrado em papel-filtro e neutralizado até pH 7,0 com NaCl 1 M. Os caldos foram denominados Caldo Soro A (CSa) e Caldo Soro B (CSb), de acordo com o ajuste inicial para pH 2,0 e pH 4,5, respectivamente. Alíquotas de 50 mL foram suplementadas com 0,25% de NaCl (Synth) – CSa+NaCl e CSb+NaCl – e 0,05% de extrato de levedura (Oxoid) – CSa+Lev e CSb+Lev. Para formulação do ágar soro, alíquotas de 50 mL foram adicionadas de 2% de ágar bacteriológico (Difco) – ASa e ASb –, suplementados com 1,0% de NaCl – ASa+NaCl e ASb+NaCl – e 0,1% de extrato de levedura – ASa+Lev e ASb+Lev. Todos os meios foram esterilizados a 121 °C por 15 minutos. Os meios sólidos foram enriquecidos com emulsão de gema de ovo e telurito de potássio a 1% antes da distribuição em placas de Petri. Foram utilizados como controle o caldo infusão cérebro coração (BHI, Difco) e o ágar Baird Parker (BP, Difco).

A eficiência dos meios líquidos foi verificada a partir da biomassa produzida, que foi obtida pela determinação do peso seco. Esse procedimento foi realizado em triplicata. Para obtenção do crescimento bacteriano, foram inoculados 2 mL do inóculo em 50 mL dos caldos experimentais e BHI. Para obtenção do inóculo, a cepa padrão foi diluída em solução salina a 0,85% até o padrão de turbidez 0,5 da escala de McFarland. A comparação foi feita a partir da leitura da densidade ótica em espectrofotômetro (Micronal B542) em comprimento de onda de 625 nm. Os meios de cultura foram incubados em estufa a 35 °C por 24 horas. Após o período de incubação, os cultivos foram filtrados em papel-filtro faixa branca JP 40, previamente seco e pesado. Em seguida, o papel-filtro foi colocado em estufa a 65 °C por duas horas. A determinação da biomassa foi feita por diferença de peso e expressa em mg.100 mL⁻¹ de meio.

A contagem de colônias de *S. aureus* foi feita nos meios de ágar soro e no BP, por plaqueamento em superfície de 0,05 mL do inóculo ajustado, em duplicata. Após a inoculação, as placas foram incubadas em estufa a 35 °C por 24 horas. O resultado da contagem de colônias foi expresso em unidades formadoras de colônias (UFC.mL⁻¹). A fim de se obter resultados representativos, para cada tipo de AS, foram realizadas oito repetições

do experimento. As colônias crescidas nos meios de AS foram isoladas em ágar BHI e submetidas à coloração de Gram e às provas de catalase e coagulase.

RESULTADOS

Os meios experimentais, com pH ajustado previamente para 4,5 (CSb, CSb+NaCl e CSb+Lev), apresentaram valores de biomassa ($\text{mg } 100.\text{mL}^{-1}$) superiores ao meio controle (BHI). A maior produção de biomassa foi observada no CSb ($45,0 \text{ mg } 100.\text{mL}^{-1}$), seguido de CSb+Lev ($34,6 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$), CSb+NaCl ($25,0 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$) e BHI ($15,0 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$).

Com o pH ajustado previamente para 2,0, o CSa+Lev ($46,6 \text{ mg } 100.\text{mL}^{-1}$) foi o único meio experimental em que foi observada uma produção de biomassa superior à do meio controle BHI ($26,6 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$). Nos meios de CSa e CSa+NaCl, foi observada uma produção de biomassa de $16,8 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ e $21,3 \text{ mg } 100.\text{mL}^{-1}$, respectivamente. O ajuste prévio para pH 2,0 foi feito para melhorar a qualidade do soro, uma vez que possibilita sua maior precipitação. Essa assertiva foi comprovada, pois, quando comparados os valores de biomassa dos meios com pH ajustado previamente para pH 4,5 com os submetidos a ajuste prévio para pH 2,0, o maior índice foi verificado no CSa+Lev ($46,6 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$).

A massa celular obtida em quatro (CSb, CSb+NaCl, CSb+Lev e CSa+Lev) dos seis tipos CS testados foi maior do que aquela determinada nos controles (BHI). Isso pode ser decorrente da variedade de nutrientes disponíveis no lactossoro. De acordo com Frank⁵, o leite possui fontes disponíveis de carbono (lactose, proteínas e gordura), compostos nitrogenados não proteicos (ureia, peptídeos e aminoácidos), minerais e micronutrientes, além de estimulantes de crescimento microbiano, como ácido orótico (precursor metabólico de pirimidinas). Soma-se a isso a presença das proteínas do soro, β -lactoglobulina, α -lactoalbumina, albumina e imunoglobulinas, que são suscetíveis a proteólise microbiana.

Todos os cultivos nos meios experimentais (meios líquidos e sólidos) apresentaram características morfotintoriais típicas de *S. aureus*, cocos Gram-positivos em um arranjo de cachos irregulares.

Considerando que o BHI é um meio nutritivo e que a produção de biomassa nos caldos experimentais foi superior à do BHI, pode-se afirmar que os meios experimentais foram mais eficientes do que o controle.

Ainda nesse sentido, os resultados obtidos sugerem que o caldo soro com suplementações, principalmente o CSa+Lev e CSb+Lev, representa uma fonte alternativa para o cultivo de *S. aureus*.

Nos meios experimentais sólidos, com pH previamente ajustado para 2,0 (ASa, ASa+NaCl, ASa+Lev e ASa+H₂O+Lev) e pH 4,5 (ASb, ASb+NaCl, ASb+Lev e ASb+H₂O+Lev), foram observadas colônias com características morfológicas compatíveis com *S. aureus* no meio BP. Em todas as placas de meios experimentais, os inóculos desenvolveram-se e formaram colônias negras com zona opaca ao redor da colônia e halo transparente mais externo. Além de semelhança morfológica, as colônias apresentaram características bioquímicas típicas de *S. aureus*, sendo caracterizadas como coagulase e catalase positivas.

Quando comparadas as médias de \log_{10} UFC. mL^{-1} , o ágar soro sem suplementações mostrou-se satisfatório (ASa = $7,80 \pm 0,25 \log_{10}$ UFC. mL^{-1} ; ASb = $7,81 \pm 0,22 \log_{10}$ UFC. mL^{-1} e BP = $7,82 \pm 0,16 \log_{10}$ UFC. mL^{-1}).

Ao AS foram adicionados nutrientes considerados importantes para o cultivo de *S. aureus*. Nesse sentido, Figueiredo e Passos⁶ observaram que o soro de leite quando suplementado com peptona possibilitou maior crescimento de *Lactobacillus acidophilus* do que o meio contendo somente soro.

A média do número de colônias nos ASa+NaCl e ASb+NaCl foi de $7,93 \pm 0,38$ e $7,90 \pm 0,21 \log_{10}$ UFC mL^{-1} , respectivamente. No BP, verificou-se \log_{10} UFC mL^{-1} de $7,83 \pm 0,17$. Apesar de proporcionar um índice de crescimento semelhante ao do controle, as colônias crescidas nos ASa+NaCl e ASb+NaCl não apresentaram halos bem desenvolvidos como observados no BP. A tolerância de espécie *S. aureus* ao NaCl foi pesquisada por Parfentjev e Catelli⁷. Os autores observaram que os estafilococos são capazes de crescer satisfatoriamente em meio enriquecido com até 10% de NaCl sem haver indução de alterações relacionadas à produção de pigmentos, sensibilidade a antibióticos e atividade de coagulase e hemolisina. No presente estudo, apesar de ter sido utilizado apenas 1% de NaCl, o meio experimental sólido foi eficiente na promoção do crescimento de estafilococos coagulase positiva.

Nos ASa+Lev e ASb+Lev, a média das contagens foi de $7,73 \pm 0,24$ e $7,72 \pm 0,11 \log_{10}$ UFC. mL^{-1} , respectivamente, e no controle (BP), de $7,70 \pm 0,29 \log_{10}$ UFC. mL^{-1} . Apesar de não haver diferença entre as médias das contagens no AS+Lev e no BP, as colônias

crecidas no meio enriquecido com extrato de levedura foram mais desenvolvidas do que as cultivadas no meio sem suplementação. Suarez et al.⁸ pesquisaram o efeito do extrato de levedura no crescimento de *Escherichia coli* e verificaram que a capacidade fermentativa dos cultivos foi potencializada no meio enriquecido com levedura.

Foi observado que os meios experimentais sólidos, apesar de suplementados, apresentavam colônias morfológicamente distintas no que tange a forma, elevação e tipo de borda (irregular, plana e borda ondulada) quando comparadas àquelas crescidas no BP (circular, convexa e borda inteira). Portanto, optou-se por adicionar 40% de água: 20 mL de água + 50 mL de caldo soro + 0,1% de extrato de levedura (AS+H₂O+Lev). A média das contagens de colônias nesse meio (ASb+H₂O+Lev) foi de $7,13 \pm 0,52 \log_{10}$ UFC.mL⁻¹, enquanto no BP foi de $7,62 \pm 0,38 \log_{10}$ UFC.mL⁻¹. Apesar de ter sido o único meio experimental em que o número de colônias foi menor do que no meio de BP, a adição de água foi responsável pelo desenvolvimento de colônias com forma circular, elevação convexa e borda inteira, semelhantes àquelas cultivadas em BP.

Os resultados das médias em \log_{10} UFC.mL⁻¹ de *S. aureus* nos meios de AS+H₂O+Lev (pH 2,0 e 4,5) sugerem que o ajuste de pH do soro na preparação inicial dos meios não influenciou o crescimento bacteriano no AS+H₂O+Lev, uma vez que a média no meio preparado com pH ajustado previamente para 2,0 (ASa+H₂O+Lev) foi de $7,09 \pm 0,11$ e no meio com pH ajustado previamente para pH 4,5 (ASb+H₂O+Lev) foi de $7,13 \pm 0,52 \log_{10}$ UFC.mL⁻¹.

Apesar de perdas parciais de nutrientes nas fases de preparação dos meios de cultivo experimentais, que incluem fervura, ajustamento de pH, filtração e autoclavação, os mesmos tiveram uma alta eficiência para o cultivo de *S. aureus*. Krischke et al.⁹ assinalam que o soro de leite contém proteínas de baixo peso molecular, peptídeos e sais inorgânicos, os quais são parcialmente

perdidos após a esterilização e ajuste de pH, sendo necessário, segundo Lund et al.¹⁰, a suplementação do soro com uma fonte de nitrogênio assimilável.

Os resultados, obtidos pela determinação da biomassa e contagem em placas, quando analisados e comparados respectivamente aos meios controles (BHI e BP), foram satisfatórios. Ainda nesse contexto, é importante ressaltar a eficiência do meio Baird-Parker, especificamente formulado para o crescimento de *S. aureus*, e em razão disso destacar a potencialidade do meio soro para o cultivo dessa espécie bacteriana.

REFERÊNCIAS

1. Yang ST, Zhu H, Hong G. Continuous propionate production from whey permeate using a novel fibrous bed bioreactor. *Biotechnol Bioeng*. 1994;43:1124-30.
2. Wong HH, Lee SY. Poly-(3-hydroxybutyrate) production from whey by high-density cultivation of recombinant *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1998;50:30-3.
3. Ibrahim AS, Bezkorovainy A. Growth-promoting factors for *Bifidobacterium longum*. *J Food Sci*. 1994;59(1):189-91.
4. Huang SJ, Wang YJ, Cai QY, Fang JD. Detection of *Staphylococcus aureus* in different liquid mediums using wireless magnetoelastic sensor. *Chin J Anal Chem*. 2010;38(1):105-8.
5. Frank JF. Milk and Dairy Products. In: Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ. *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. Washington: ASM Press; 2007. p. 101-16.
6. Figueiredo HM, Passos FJV. Influência da fonte de nitrogênio no crescimento de *Lactobacillus acidophilus* UFV H2B20. *Sitientibus*. 2003;28:37-50.
7. Parfentjev IA, Catelli AR. Tolerance of *Staphylococcus aureus* to sodium chloride. *J Bacteriol*. 1964;88(1):1-3.
8. Suarez LD, Liria CW, Kilikian BV. Effect of yeast extract on *Escherichia coli* growth and acetic production. *World J Microbiol Biotechnol*. 1998;14(3):331-5.
9. Krischke W, Schröder M, Trösch W. Continuous production of L-lactic acid from whey permeate by immobilized *Lactobacillus casei* subsp. *casei*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1991;34(5):573-78.
10. Lund B, Norddahl B, Ahring B. Production of lactic acid from whey using hydrolyzed whey protein as nitrogen source. *Biotechnol Lett*. 1992;14:851-6.

Contaminação fúngica em condimentos de feiras livres e supermercados

Fungal contamination in spices sold in street markets and supermarkets

RIALA6/1456

Luciana Portela da SILVA¹, Adelayne Rodrigues ALVES¹, Cíntia de Moraes BORBA², Mitra MOBIM^{1*}

*Endereço para correspondência: 1Faculdade de Saúde, Ciências Humanas e Tecnológicas do Piauí – Novafapi, Rua Vitorino Orthiges Fernandes, n. 6123, Bairro do Uruguai, CEP 64057-100, Teresina, PI, Brasil. Tel.: +55 (81) 2106-0700. E-mail: mitramobin@novafapi.com.br ou mitra_mobin@yahoo.com.br.

²Laboratório de Taxonomia, Bioquímica e Bioprospecção de Fungos do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ.

Recebido: 25.02.2011 - Aceito para publicação: 11.01.2012

RESUMO

Quatro tipos de condimentos, *Bixa orellana* L.(urucum), *Cuminum cyminum* L. (cominho), *Curcuma longa* L. (açafraão) e *Piper nigrum* L. (pimenta-do-reino), provenientes de feiras livres e de supermercados da cidade de Teresina-PI, Brasil, foram avaliados quanto à contaminação por fungos. Das 36 amostras analisadas, 28 (77,77%) apresentaram resultado positivo e 12 espécies fúngicas foram identificadas. Os valores das unidades formadoras de colônias por grama de produto (UFC/g) detectado nas amostras de condimentos comercializados nas feiras livres e industrializados foram maiores do que os do padrão federal de referência, variando de $8,6 \times 10^3$ a $1,3 \times 10^5$. Não houve diferença significativa entre esses valores. *Aspergillus* foi o gênero predominante, com seis espécies identificadas, seguido do gênero *Penicillium* (três espécies). Das amostras de corante, cominho e açafraão, provenientes das feiras livres, nos condimentos foram detectados os maiores valores de UFC/g, respectivamente, para as espécies *Exserohilum mcginnisii*, *Absidia corymbifera* e *Aspergillus nidulans*. Os condimentos analisados neste estudo mostraram a contaminação por fungos potencialmente patogênicos e produtores de micotoxinas, os quais podem constituir um risco para a saúde dos consumidores.

Palavras-chave. condimentos, contaminação fúngica, urucum, cominho, açafraão, pimenta-do-reino.

ABSTRACT

Four types of spices, *Bixa orellana* L. (annatto), *Cuminum cyminum* L.(cumin), *Curcuma longa* L. (turmeric) and black *Piper nigrum* L. (black pepper) collected from street markets and supermarkets in the city of Teresina, PI, Brazil, were examined for mould contamination. Of 36 samples evaluated, 28 (77.77%) were positive and 12 fungal species were identified. The values of colony forming units per g (CFU/g), detected in spices samples from street markets and supermarkets, were higher than those established by the federal reference limit, ranging from 8.6×10^3 to 1.3×10^5 ; and no significant differences were observed among them. The most predominant fungal genera were *Aspergillus* and *Penicillium*, with six and three identified species respectively. Annatto, cumin and turmeric, collected from street markets, showed the highest CFU/g values for *Exserohilum mcginnisii*, *Absidia corymbifera* and *Aspergillus nidulans*, respectively. The spices evaluated in this study showed contamination with potentially pathogenic fungi and mycotoxicogenic species, which might be a health hazard for humans.

Keywords. spices, fungi contamination, annatto, cumin, turmeric, black pepper.

INTRODUÇÃO

Os condimentos ou especiarias têm se destacado na vida do homem, desde a Grécia antiga, como símbolos de crenças culturais ou para fins medicinais, aromatizantes e conservantes, e são constituídos de diferentes partes de vegetais dessecados, grosseiramente subdivididos ou moídos¹.

Provenientes de plantas com características especiais, os condimentos ou especiarias não têm apenas a função de realçar o sabor ou dar gosto especial aos alimentos, pois, quando usados de forma adequada, têm um importante papel na digestão do homem, por promoverem maior salivacão, secreção mais abundante das glândulas digestivas e aumento do peristaltismo intestinal, facilitando, assim, a degradação do alimento até a fase final¹.

Os fungos são considerados os contaminantes predominantes nas especiarias, mas muitas populações microbianas são, provavelmente, residentes comensais sobre a planta que sobreviveram ao processo de secagem e estocagem. Entretanto, fungos podem ser responsáveis pela deterioração dos alimentos e ainda pela produção de micotoxinas carcinogênicas, tornando-se um risco para o consumidor. Dessa forma, quando os condimentos são produzidos ou comercializados em condições desfavoráveis, armazenados em locais úmidos, mal ventilados, eles propiciam a multiplicação das espécies contaminantes que podem atingir níveis insatisfatórios para consumo.

A legislação em vigor no que se refere aos padrões microbiológicos para alimentos é a RDC n. 12, de 2 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), em que não há limite para fungos filamentosos e leveduras nas especiarias. Entretanto, considerando o potencial patogênico das espécies fúngicas presentes nos condimentos, baseamos na Portaria n. 451 da Anvisa, de setembro de 1997, em que é descrito o valor de referência para fungos de 5×10^3 unidades formadoras de colônia por grama do produto (UFC/g). Levando em consideração que muitos condimentos são consumidos *in natura*, valores de contaminação acima do estabelecido pela Anvisa podem contaminar outros alimentos na hora do preparo e, com isso, podem causar danos à saúde do consumidor.

A avaliação da microbiota de alimentos em relação às espécies fúngicas tem tradicionalmente recebido menos atenção que a avaliação da microbiota

bacteriana². No entanto, é de suma importância o conhecimento da extensão da contaminação fúngica nos produtos alimentícios como forma de certificação da segurança e da qualidade dos mesmos.

Assim o objetivo do presente estudo foi avaliar a contaminação fúngica em condimentos comercializados em feiras livres e supermercados da cidade de Teresina-PI, Brasil.

METODOLOGIA

Foram utilizadas neste estudo quatro tipos de condimentos desidratados: *Bixa orellana* L. (urucum), *Cuminum cyminum* L. (cominho), *Curcuma longa* L. (açafrão) e *Piper nigrum* L. (pimenta-do-reino). Foi adquirida uma amostra de cada condimento em seis feiras livres (FL), localizadas na cidade de Teresina-PI, Brasil, perfazendo um total de 24 amostras. Também foi obtida uma amostra de cada condimento industrializado, em três supermercados (I) situados na mesma cidade, perfazendo um total de 12 amostras.

As amostras foram levadas para o laboratório de pesquisa da Faculdade Novafapi, Teresina-PI, para análise de fungos, segundo metodologia de Silva³, no período de 16 de agosto a 20 de setembro de 2010. Elas foram pesadas, asepticamente, e 25 g de cada amostra foram transferidos para frascos de Erlenmeyer contendo 225 mL de água peptonada (0,1%), e foram realizadas diluições seriadas, 10^1 , 10^2 e 10^3 . De cada diluição, foram retirados 100 μ L para serem inoculados em placa de Petri contendo batata dextrose ágar (Himedia Laboratories Pvt, Ltd., Mumbai, Índia) acrescido de cloranfenicol (INLAB, São Paulo, Brasil) na concentração de 0,05 g/L. As placas foram incubadas, à temperatura ambiente (± 28 °C), por 72 horas para o crescimento e contagem dos fungos.

Após a contagem das colônias fúngicas, microculturas foram realizadas para melhor visualização das estruturas e identificação do gênero e espécie^{4,5}.

O teste estatístico Anova, nível de significância $p < 0,05$, foi utilizado para comparar a contaminação fúngica nos condimentos de feiras livres e industrializados.

RESULTADOS

Das 36 amostras de condimentos, 28 (77,77%) apresentaram resultados positivos para fungos, e nessas foram identificadas 12 espécies fúngicas (Tabela 1). *Aspergillus* foi o gênero predominante, com seis espécies

Tabela 1. Média das contagens de espécies fúngicas isoladas, expressa em unidade formadora de colônias por grama de produto, presentes em condimentos desidratados comercializados em feira livre e supermercado na cidade de Teresina, PI

Condimento	Origem	Espécie fúngica	UFC/g
<i>Bixa orellana</i> L. (urucum)	FL	<i>Aspergillus niger</i>	$9,1 \times 10^4$ *
		<i>Curvularia clavata</i>	$3,0 \times 10^4$
		<i>Exserohilum mcginnisii</i>	$1,0 \times 10^5$
	I	<i>Penicillium citrinum</i>	$2,0 \times 10^3$
		<i>Aspergillus flavus</i>	$1,4 \times 10^4$
		<i>Aspergillus niger</i>	$6,6 \times 10^4$
<i>Cuminum cyminum</i> L. (cominho)	FL	<i>Penicillium decumbens</i>	$5,0 \times 10^4$
		<i>Absidia corymbifera</i>	$1,3 \times 10^5$ *
		<i>Aspergillus nidulans</i>	$2,2 \times 10^3$
		<i>Aspergillus niger</i>	$1,6 \times 10^4$
		<i>Aspergillus ochraceus</i>	$6,0 \times 10^4$
	I	<i>Penicillium decumbens</i>	$1,0 \times 10^4$
		<i>Aspergillus flavus</i>	$8,2 \times 10^4$ *
		<i>Aspergillus niger</i>	$1,7 \times 10^4$
		<i>Fusarium oxysporum</i>	$1,8 \times 10^3$
		<i>Penicillium decumbens</i>	$2,5 \times 10^4$
<i>Curcuma longa</i> L. (açafraão)	FL	<i>Aspergillus nidulans</i>	$1,3 \times 10^5$
		<i>Aspergillus niger</i>	$7,2 \times 10^4$ *
		<i>Fusarium oxysporum</i>	$1,3 \times 10^5$ *
	I	<i>Penicillium decumbens</i>	$8,6 \times 10^3$
		<i>Aspergillus niger</i>	$1,3 \times 10^3$
		<i>Penicillium decumbens</i>	$1,9 \times 10^4$
<i>Piper nigrum</i> L. (pimenta-do-reino)	FL	<i>Aspergillus nidulans</i>	$1,5 \times 10^3$
		<i>Aspergillus niger</i>	$9,4 \times 10^4$ *
		<i>Aspergillus ochraceus</i>	$4,0 \times 10^4$
		<i>Aspergillus terreus</i>	$1,1 \times 10^3$
		<i>Aspergillus sydowii</i>	$2,0 \times 10^3$
	I	<i>Penicillium decumbens</i>	$3,0 \times 10^3$
		<i>Penicillium oxalicum</i>	$1,5 \times 10^3$
		<i>Aspergillus nidulans</i>	$1,5 \times 10^3$
		<i>Aspergillus niger</i>	$1,6 \times 10^3$
		<i>Aspergillus ochraceus</i>	$1,3 \times 10^4$
		<i>Penicillium decumbens</i>	$3,4 \times 10^4$

FL = condimento comercializado em feira livre

I = condimento industrializado comercializado em supermercado

UFC/g = unidade formadora de colônia por grama de condimento

*= contagem estimada (Silva, 2007)

identificadas, seguido do gênero *Penicillium*, com três espécies.

A Tabela 1 apresenta a média das contagens de espécies fúngicas, expressa em unidade formadora de colônia (UFC) por grama de produto, presentes nos condimentos desidratados provenientes das feiras livres e dos supermercados, comercializados na cidade de Teresina-PI. Quando as placas apresentaram mais de 250 colônias, o número de UFC/g foi estimado, segundo Silva³.

Em relação à quantificação fúngica, verificou-se que tanto os condimentos provenientes das feiras livres quanto os industrializados comercializados em supermercados apresentaram valores de UFC/g acima do valor de referência, variando de $8,6 \times 10^3$ a $1,3 \times 10^5$, não havendo diferença significativa entre eles.

Bixa orellana L. (urucum), *Cuminum cyminum* L. (cominho) e *Curcuma longa* L. (açafraão) provenientes das feiras livres foram os condimentos que apresentaram os maiores valores de UFC/g para as espécies

Exserohilum mcginnisii ($1,0 \times 10^5$ UFC/g), *Absidia corymbifera* ($1,3 \times 10^5$ UFC/g), *Aspergillus nidulans* ($1,3 \times 10^5$ UFC/g) e *Fusarium oxysporum* ($1,3 \times 10^5$ UFC/g). Comparativamente, a *Piper nigrum* L. (pimenta-do-reino) de feira livre apresentou a maior diversidade fúngica, porém os valores de UFC/g estavam abaixo do valor estabelecido pela ANVISA para a maioria das espécies, com exceção de *A. niger* e *A. ochraceus*. A pimenta-do-reino de supermercado apresentou valores acima do padrão federal somente para *P. decumbens* (Tabela 1).

Os condimentos são obtidos por métodos simples e são comumente expostos a muitos contaminantes antes de serem secos o suficiente para impedir a multiplicação microbiana. Entretanto, as condições de estocagem dos mesmos podem favorecer a contaminação por insetos, roedores, fungos, entre outros. Em condições ambientais favoráveis, de umidade e de temperatura, os esporos dos fungos germinam, desenvolvendo hifas, que podem contaminar vários substratos¹.

O isolamento das espécies fúngicas, nos condimentos analisados neste trabalho, é comparável ao encontrado em outros estudos^{6,7}. Além disso, tem sido demonstrada a prevalência do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* em especiarias, corroborando nossos achados, principalmente em pimenta⁶. Hoffmann et al.⁸ afirmaram que, normalmente, fungos e leveduras estão presentes em especiarias *in natura*, porém em grande número pode indicar processamento e armazenamento inadequados.

Adicionalmente, os condimentos não sofrem deterioração como os demais grupos de alimentos, apesar de poder haver a multiplicação de fungos durante a desidratação, conferindo-lhes alta carga de esporos. Como eles são adicionados a outras preparações, se estiverem contaminados, acabam por elevar a carga microbiana dos alimentos¹.

Dos fungos isolados, dos diferentes condimentos analisados aqui, 22 apresentaram valores de UFC/g do produto maiores que o padrão microbiológico estabelecido pela Anvisa, que é de 5×10^3 UFC/g. Nossos dados são semelhantes aos resultados obtidos a partir da análise microbiológica de especiarias comercializadas na cidade de Londrina-PR, onde os autores encontraram valores de UFC/g acima do estabelecido pela ANVISA⁹. Infelizmente, os autores não identificaram o gênero e a espécie dos fungos encontrados. Em adição, Freire et al.⁶ relataram a alta frequência de fungos, em pimenta e

castanha-do-pará, principalmente do gênero *Aspergillus*. Os dados apresentados por esses autores corroboram os dados aqui apresentados e indicam que devem ser feitas melhorias no processamento e no armazenamento dos condimentos.

As espécies aqui encontradas com os maiores valores de UFC/g foram *Exserohilum mcginnisii*, *Absidia corymbifera* e *Aspergillus nidulans*. É importante ressaltar que *E. mcginnisii* é um fungo demáceo, agente da feohifomicose, descrito como espécie nova causando sinusite com oclusão do seio nasal em um paciente jovem⁵. Não há registro de como o paciente se contaminou, mas pode-se supor que o paciente tenha se contaminado por inalação de propágulos fúngicos, pois não houve descrição de trauma no local. Em relação a *A. corymbifera* e *A. nidulans*, ambos são descritos como agentes de infecções, o primeiro sendo agente causal de vários casos descritos de infecção invasiva em pacientes com aids, neutropênicos, transplantados e leucêmicos, e o segundo descrito como agente de várias infecções em humanos e animais, como infecção pulmonar e produtor de esterigmatocistina, uma micotoxina hepatocarcinogênica que inibe a síntese de DNA⁵.

Além dessas, as demais espécies isoladas e identificadas neste trabalho também já foram relatadas como agentes causais de diversas infecções⁵, e algumas delas como produtoras de micotoxinas, como aflatoxina, ocratoxina, citrinina, tricotecenos, fumonisina e zearalenona. Os fungos toxigênicos pertencem basicamente aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, os quais são responsáveis pela produção da maioria das micotoxinas, extremamente tóxicas, podendo causar danos hepáticos, renais e na medula óssea, até hoje conhecidas e estudadas¹⁰.

Diante do exposto, há que se enfatizar a necessidade de fiscalização no controle de qualidade, em todas as fases de obtenção dos condimentos, desde a coleta até a oferta ao consumidor, visto que os níveis de contaminação fúngica encontrados aqui excederam os valores estabelecidos pela Anvisa, além da possibilidade de esses fungos produzirem micotoxinas.

CONCLUSÃO

De acordo com os dados apresentados, conclui-se que os condimentos comercializados em feiras livres e os industrializados vendidos em supermercados estão contaminados com fungos potencialmente patogênicos e

produtores de micotoxinas. Esse resultado, corroborado com outros artigos publicados apresentando dados semelhantes, levanta uma questão preocupante sobre a higiene de manipuladores, utensílios e equipamentos utilizados na manufatura do produto, assim como sobre as condições de armazenamento dos condimentos.

Assim, os condimentos analisados aqui, em nosso ponto de vista, representam um risco à saúde do consumidor, uma vez que espécies isoladas nas especiarias são potencialmente patogênicas. Portanto, além de ser necessário o esclarecimento dos consumidores quanto ao risco de consumir produtos contaminados com fungos, seria de grande valia para a minimização desses riscos a realização de programas de treinamento para os produtores sobre técnicas adequadas de manuseio, secagem e estocagem dos condimentos.

REFERÊNCIAS

1. Rodrigues RMM, Martini MH, Chiarini PFT, Prado SPT. Matérias estranhas e identificação histológica em manjerona (*Origanum majorana* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.) e salsa (*Petroselinum sativum* Hoffm) em flocos comercializados no estado de São Paulo. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2005;64:25-30.
2. Sagoo SK, Little CL, Greenwood M, Mithani V, Grant KA, McLauchlin J, et al. Assessment of the microbiological safety of dried spices and herbs from production and retail premises in the United Kingdom. *Food Microbiol*. 2009;26:39-43.
3. Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. 3. ed. São Paulo: Livraria Varela; 2007.
4. Pitt JI, A laboratory guide to common *Penicillium* species. North Ryde: Commonwealth Scientific and Industrial; 1985.
5. Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. Atlas of clinical fungi. 2. ed. Washington: ASM Press; 2004.
6. Freire FCO, Kozakiewicz Z, Paterson RRM. Mycoflora and mycotoxins in Brazilian black pepper, white pepper and Brazil nuts. *Mycopathologia*. 2000;149:13-9.
7. Souza JCR, Barros GC, Mendes ES, Mendes PP, Alves CAB. Avaliação microbiológica de condimentos artesanais e industrializados da grande Recife, PE. *Hig Aliment*. 2006;20:105-8.
8. Hoffmann FL, Garcia-Cruz CH, Vinturim TM. Qualidade higiênico-sanitária de condimentos e especiarias produzidas por uma indústria da cidade de São José do Rio Preto. *Bol CEPPA*. 1994;12:81-8.
9. Furlaneto L, Mendes S. Análise microbiológica de especiarias comercializadas em feira livre e em hipermercados. *Alim Nutrição*. 2004;15:87-91.
10. Sweeney MJ, Dobson ADW. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *Int J Food Microbiol*. 1998;43:141-58.

Avaliação da qualidade química e microbiológica de salsichas tipo Viena

Evaluation of the chemical and microbiological qualities of Vienna sausages

RIALA6/1457

Tahis Regina BAÚ, Cristiane de Abreu DIAS, Alexandre da Trindade ALFARO*

* Endereço para correspondência: Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus de Francisco Beltrão, Linha Santa Bárbara, s/n, CEP 85601-971, Francisco Beltrão, PR. E-mail: alexandre@utfpr.edu.br.

Recebido: 14.04.2011 - Aceito para publicação: 08.01.2012

RESUMO

A salsicha tipo Viena é um alimento muito consumido pela população brasileira, com grande volume de comercialização. No entanto, este produto apresenta um elevado risco de contaminação, principalmente em função de sua excessiva manipulação. Este estudo avaliou a qualidade de salsichas tipo Viena por meio de análises microbiológicas e físico-químicas. As amostras demonstraram qualidade sanitária adequada e teores de amido, nitrito e nitrato inferiores ao especificado pela legislação.

Palavras-chaves. salsicha, aditivos, qualidade sanitária.

ABSTRACT

The Vienna sausage is highly consumed by the Brazilian population, and it holds a high trade bulk. Nonetheless, this product has a high risk of contamination, mainly due to its excessive manipulation. This study evaluated the quality of Vienna sausages by determining the microbiological and physicochemical qualities. The analyzed samples showed adequate sanitary quality and acceptable starch contents, and the nitrite and nitrate amounts were lower than those established by legislation.

Keywords. sausage, additives, sanitary quality.

INTRODUÇÃO

O estilo de vida dos consumidores mudou muito nos últimos anos, e a tendência ao consumo de alimentos de preparo fácil e rápido é cada vez maior. Nesse contexto, as salsichas tipo *hot dog* de carne bovina e de aves merecem destaque devido a sua aceitabilidade e praticidade¹. Entretanto, os embutidos cárneos são alimentos muito suscetíveis a contaminação microbiana, o que reduz seu prazo de validade e os torna um potencial veículo de patógenos.

Antimicrobianos têm sido cada vez mais utilizados como principal intervenção para inativar ou inibir o crescimento de micro-organismos patogênicos em alimentos. O nitrito é um exemplo de antimicrobiano alimentar específico para inibir o crescimento de *Clostridium botulinum* em produtos cárneos. No entanto, a razão mais importante para a inclusão de nitrito e/ou nitrato em salsichas é a formação e a fixação da cor rósea avermelhada, que é obtida por meio da formação do pigmento nitrosilmioglobina, oriundo da reação da mioglobina com o óxido nítrico proveniente da redução do nitrito².

A aplicação de nitratos e nitritos acima do limite máximo estabelecido pela legislação vigente pode acarretar sérios riscos à saúde humana, pela possibilidade de manifestações de efeitos tóxicos agudos e crônicos. Os efeitos adversos são representados principalmente pela metamioglobina tóxica e pela formação de nitrosaminas, substâncias consideradas carcinogênicas, mutagênicas e teratogênicas³.

As salsichas são produtos cárneos emulsionados. Assim, é necessário adicionar um agente capaz de manter a emulsão estável e formar gel quando submetido ao calor. O amido é o aditivo mais utilizado, pois atua como substância ligadora, enchedora, emulsionadora e estabilizadora. A utilização do amido, além de colaborar para as características sensoriais do produto, aumenta o rendimento no cozimento².

Este trabalho procurou avaliar a qualidade microbiológica (coliformes termotolerantes, *Salmonella* spp e clostrídios sulfito redutores), química (nitrito e nitrato) e quantificar o amido de salsichas tipo Viena comercializadas a granel. As amostras foram adquiridas em estabelecimentos de grande porte situados nas três maiores cidades (A, B, C) da região Sudoeste do Paraná. A coleta das amostras foi efetuada quinzenalmente, em cinco períodos. Para cada lote (1, 2, 3, 4, 5) de amostras,

foram escolhidos aleatoriamente três pontos comerciais, um por cidade, totalizando 15 amostras.

METODOLOGIA

A determinação de nitritos foi realizada segundo o método de Griess-Ilosvay⁴. Os nitratos foram determinados por reação colorimétrica, e a leitura, realizada em espectroscópio (Micronal, B442) a 410 nm⁴. Para a determinação do teor de amido, o polissacarídeo foi submetido a hidrólise em meio fortemente ácido, com posterior determinação de glicose pelo método de Lene-Eynon⁴. Para conversão do teor de glicose em amido, foi utilizado o fator de correção 0,99⁴. As análises microbiológicas para determinação de coliformes termotolerantes, *Salmonella* spp e clostrídios sulfito redutores foram realizadas segundo procedimentos descritos por Silva et al.⁵. Os ensaios foram realizados em triplicata, e os resultados submetidos a análise de variância e teste de Tukey, considerado significativamente diferente quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Os valores médios de nitrito (mg.kg^{-1}) determinados nas amostras estão apresentados na Tabela 1. Segundo a legislação vigente⁶, o valor máximo de nitrito permitido em embutidos cárneos é de 150 mg.kg^{-1} , indicando que as amostras analisadas estão de acordo com os parâmetros estabelecidos.

Tabela 1. Valores médios de nitrito (mg.kg^{-1}) em diferentes lotes de salsichas tipo Viena comercializadas em três cidades da região Sudoeste do Paraná

Cidades	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Lote 5
A	148,0 \pm 0,7 ^a	149,2 \pm 0,9 ^a	149,9 \pm 1,6 ^a	148,9 \pm 0,4 ^a	148,7 \pm 0,5 ^a
B	147,5 \pm 1,5 ^a	148,2 \pm 0,9 ^a	148,9 \pm 1,7 ^a	149,4 \pm 1,6 ^a	148,9 \pm 0,3 ^a
C	149,1 \pm 1,8 ^a	149,4 \pm 0,6 ^a	148,9 \pm 1,7 ^a	149,0 \pm 0,6 ^a	148,9 \pm 1,6 ^a

Valores médios \pm desvio-padrão referentes a três determinações. Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey

Outros trabalhos são relatados na literatura e corroboram os resultados obtidos neste estudo. Lira et al.⁷ avaliaram o teor de nitrito em 81 amostras de produtos cárneos, encontrando resultados similares. Eles observaram teores abaixo do limite máximo permitido em todos os produtos avaliados. Resultados diferentes foram encontrados por Melo Filho et al.³ quando

avaliaram a qualidade de 54 amostras de salsicha de diversas origens e marcas quanto aos níveis de nitrito e nitrato. Os autores constataram que 67% das amostras possuíam teor de nitrito superior a 150 mg.kg⁻¹.

Nesse estudo, as amostras de salsichas tipo Viena coletadas nas cidades A, B e C apresentaram teor médio de nitrito de 148,9, 148,6 e 149,1 mg.kg⁻¹, respectivamente.

Segundo a legislação vigente⁶, o limite máximo estabelecido para nitrato é 300 mg.kg⁻¹. A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos para as determinações de nitrato nas salsichas tipo Viena.

Tabela 2. Valores médios de nitrato (mg.kg⁻¹) em diferentes lotes de salsichas tipo Viena comercializadas em três cidades da região Sudoeste do Paraná

Cidades	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Lote 5
A	298,9 ± 1,6 ^a	297,9 ± 1,4 ^a	298,8 ± 1,6 ^a	298,3 ± 0,2 ^a	299,0 ± 1,6 ^a
B	299,1 ± 1,7 ^a	299,6 ± 1,2 ^a	299,4 ± 1,5 ^a	299,7 ± 1,0 ^a	299,5 ± 1,3 ^a
C	298,9 ± 0,8 ^a	299,9 ± 0,9 ^a	299,5 ± 1,2 ^a	299,2 ± 1,6 ^a	298,9 ± 1,5 ^a

Valores médios ± desvio-padrão referentes a três determinações Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si (p < 0,05) pelo teste de Tukey

Nesse estudo, observou-se que as amostras avaliadas não excederam os parâmetros estabelecidos. Os valores médios de nitrato encontrados nas salsichas tipo Viena comercializadas nas cidades A, B e C foram 298,6, 299,5 e 299,3 mg.kg⁻¹, respectivamente. No entanto, Melo Filho et al.³ relataram que 83% das 54 amostras de salsicha avaliadas apresentaram teores de nitrato acima de 300 mg.kg⁻¹. A utilização desses sais acima do limite máximo permitido pode acarretar sérios riscos à saúde humana, pela possibilidade de manifestações de efeitos tóxicos agudos e crônicos.

Segundo a Portaria nº 1.004, de 11 de novembro de 1998⁶, do Ministério da Saúde, o teor máximo de amido para salsicha é 2%. Todas as amostras apresentaram percentual de amido próximo ao limite determinado pela legislação, e apenas duas amostras excederam ligeiramente esse valor (2,01% e 2,03%). Os percentuais médios de amido nas salsichas tipo Viena comercializadas nas cidades A, B e C foram 1,97%, 1,98% e 1,98%, respectivamente, estando de acordo com os parâmetros exigidos pela legislação vigente.

Sabe-se que o amido é um produto de baixo custo, sendo utilizado em salsichas com a finalidade de conferir maior consistência à massa. O amido absorve água, e, portanto, sua utilização, mesmo em pequenas

quantidades, acarretará aumento do peso e pode representar fraude ao consumidor.

Alimentos de origem animal vendidos a granel são muito suscetíveis a contaminações, já que, além das condições de processamento, armazenagem e transporte, são excessivamente manipulados, facilitando o contato com micro-organismos patogênicos.

A RDC nº 12 de 2001⁸ determina os seguintes padrões microbiológicos para salsichas: coliformes termotolerantes: 10³ UFC/g; clostrídios sulfito redutores: 5 × 10² UFC/g; *Salmonella* spp: ausência em 25 g. Os resultados das análises microbiológicas demonstraram que as salsichas tipo Viena atendiam aos parâmetros exigidos pela legislação vigente.

Martins et al.¹, ao analisarem salsichas tipo *hot dog*, verificaram que 17% das amostras apresentaram coliformes termotolerantes acima do limite permitido. Em relação à presença de *Salmonella* spp em embutidos, a literatura apresenta diversos trabalhos que relatam a presença desse micro-organismo.

Observa-se também uma considerável variação quanto à presença de clostrídios em produtos cárneos. Stagnitta et al.⁹, avaliando a carne e seus derivados na cidade de São Luis, Argentina, encontraram *Clostridium perfringens* em 26,35% das amostras de linguiça frescal, em 19% das amostras de hambúrgueres e em 24% das amostras de carne moída avaliadas. Em contrapartida, Ferreira et al.¹⁰ não verificaram presença de clostrídios ao analisarem amostras de salsicha fresca, resultado similar ao encontrado neste trabalho.

Não foi observada diferença significativa (p < 0,05) entre os resultados obtidos nas três cidades da região para as concentrações de amido, nitrito e nitrato, estando seus valores abaixo dos limites máximos especificados. As análises microbiológicas comprovaram a qualidade sanitária das amostras avaliadas. As salsichas tipo Viena a granel, comercializadas na região Sudoeste do Paraná, atenderam às exigências da legislação vigente.

AGRADECIMENTOS

À Fundação Araucária, pela concessão das bolsas.

REFERÊNCIAS

1. Martins LL, Santos IF, Franco RM, Oliveira LA, Bezz J. Avaliação do perfil bacteriológico de salsichas tipo "hot dog" comercializadas em embalagens a vácuo e a granel em supermercados dos municípios Rio de Janeiro e Niterói. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2008;67(3):215-20.

2. Faria JAF, Felício PE, Neves MA, Romano MA. Formação e estabilidade da cor de produtos cárneos curados – revisão. *Rev Tecnol Carnes*. 2001;3(2):16-22.
3. Melo Filho AB, Biscontini TM, Andrade SA. Níveis de nitrito e nitrato em salsichas comercializadas na região metropolitana do Recife. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2004;24(3):390.
4. Laboratório Nacional de Referência Animal (LANARA). Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes: métodos físicos e químicos. Brasília: Ministério da Agricultura e Abastecimento; 1981.
5. Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. São Paulo: Varela; 1997.
6. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Portaria nº 1.002/1.004, de 11 de dezembro de 1998. Aprova o regulamento técnico de atribuição de função de aditivos, e seus limites máximos de uso para a categoria 8 – Carne e Produtos Cárneos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, 22 mar 1999, Seção I, p. 15.
7. Lira GM, Silva Neta ML, Souza JB, Barros ES. Teores de nitrito de sódio em produtos cárneos comercializados em Maceió-AL. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2003;62(3):165-70.
8. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, 10 jan 2001, Seção I, p. 45-53.
9. Stagnitta PV, Micalizzi B, Guzmán AMS. Prevalence of Enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in meats in San Luis, Argentina. *Anaer Food Microbiol*. 2002;8:253-8.
10. Ferreira MC, Fraqueza MJ, Barreto AS. Avaliação do prazo de vida útil da salsicha fresca. *Rev Port Cienc Veterin*. 2007;102:141-3.

Solar and conventional drying of residual annatto grains

SANTOS, Dyego C. **Secagem solar e convencional de grãos residuais de urucum**. Campina Grande, PB, 2012. [Dissertação de Mestrado – Área de concentração: Processamento e Armazenamento de Produtos Agrícolas. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, Centro de Tecnologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de Campina Grande]. Orientadores: Alexandre José de Melo Queiroz e Rossana Maria Feitosa de Figueirêdo

Residual annatto seeds are a subproduct derived from the extraction of bixin and norbixin pigments in the food industry. The fact that most of these seeds are typically discarded demonstrates the need for making better use of these residues, through studies aimed at incorporating them into the human diet. The objective of this study was to dry residual annatto seeds and annatto seed powder using conventional means (oven-drying) and solar energy. The seeds and powder were oven dried with forced air circulation at temperatures of 40, 50, 60 and 70 °C. Two dryers were used in the solar energy method, one for daytime drying, called a solar dryer, and the other for nighttime drying, denominated a heat accumulator for nighttime drying (ACSN). The ACSN dryer is composed of two independent water circulation circuits. The solar collector circuit/reservoir was in operation in the daytime. This was interrupted during the night, whereupon the reservoir circuit/drying chamber was opened. In solar drying, samples were collected in concrete trays covered with a black plastic tarp (polyethylene). Diffusion Approximation, Two Term, Midilli, Page and Thompson mathematical models were used to represent the drying kinetics of annatto seeds and powder dried in an oven and solar and nighttime dryers, as well as by direct exposure to the sun. In conventional drying, an increase in temperature promoted reductions in drying time. Using the ACSN dryer at night avoided water absorption by the samples, promoting their drying and resulting in a product with lower water content. For samples dried at night, employing the ACSN dryer led to greater drying rates compared to the control sample, generating a product with lower water content. Solar dryers exhibited shorter drying times than those observed in conventional dryers. Diffusion Approximation, Two Term, Midilli, Page and Thompson models showed a good fit to experimental data derived from the drying kinetics of annatto seed samples and residual powder, with and without oil, using conventional and solar methods.

Keywords. *Bixa orellana* L., natural coloring, solar dryer, nighttime dryer

Dissertação disponível na Biblioteca
Central da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG
E-mail: dyego.csantos@gmail.com

Processing, characterization and storage of traditional and diet umbu-caja jams

Oliveira ENA. **Processamento, caracterização e armazenamento de geleia tradicional e dietética de umbu-cajá.** Campina Grande, PB, 2012. [Dissertação de Mestrado – Área de concentração: Processamento e Armazenamento de Produtos Agrícolas. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, Centro de Tecnologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de Campina Grande]. Orientadores: Ana Paula Trindade Rocha e Josivanda Palmeira Gomes

Umbu-caja fruits are normally sold and consumed fresh, which can result in large post-collection losses. An alternative to make maximum use of this fruit is to devise new products, including jams. Thus, the aim of this study was to manufacture and assess traditional and diet umbu-caja jams. Ripe fruits were physically characterized and depulped. Pulp was then submitted to physical, chemical, physicochemical and microbiological analyses. We used 22 experimental planning with two central points to manufacture the jams, considering the following independent variables: sugar (50, 55 and 60%), aspartame (0.055, 0.065 and 0.075%) and pectin (0.50, 1.00 and 1.50%). The jams were characterized and submitted to sensory analysis, in order to select the two most acceptable samples from each planning matrix to be stored for 180 days. With respect to traditional jams, increased sugar and a reduction in pectin resulted in greater yield. A rise in pectin and lower sugar levels led to higher extrusion force. Firmness and adhesiveness showed no negative influence from either independent variable for traditional jam. However, a tendency to greater firmness was observed with an increase of pectin and more adhesiveness with a reduction. Diet jams showed no significant difference for dependent variables. In relation to extrusion and firmness, no tendencies were detected with a variation in aspartame; however, an increase in pectin caused a tendency to higher extrusion and firmness values. Sensory analysis revealed that the highest acceptability indices of traditional jams were for jams 1 and 5 and for diet jams, samples 3 and 4, all of which were stored. In traditional jams, water content, water activity, acidity, sucrose and yellow intensity decreased with storage, while pH, °Brix and reducing sugars increased under the same conditions. For diet jams, reducing sugars, luminosity, and yellow intensity declined with storage, and pH, water activity and °Brix/acid ratio were higher. Employing umbu-caja to manufacture traditional and diet jams is a viable alternative for using surplus production, in addition to introducing a new product into the market.

Keywords. *Spondias spp.*, experimental planning, texture, storage

Dissertação disponível na Biblioteca
Central da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG
E-mail: emanuel.oliveira16@gmail.com

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

A Revista do Instituto Adolfo Lutz (RIAL), iniciada em 1941, é uma publicação trimestral com a missão de divulgar resultados de investigações científicas relacionadas às ações de promoção à saúde, prevenção e controle de agravos e doenças de interesse em saúde pública, além de incentivar a produção de artigos científicos nas áreas de vigilância epidemiológica e sanitária e de proporcionar a atualização e aprimoramento de profissionais da área em âmbito nacional e internacional.

A RIAL é inter e multidisciplinar, arbitrada, aberta a contribuições de autores nacionais e estrangeiros. Publica prioritariamente pesquisas originais com contribuições relevantes na área laboratorial em saúde pública, realizadas com rigor científico e que possam ser replicadas e generalizadas.

POLÍTICA EDITORIAL

Editada nos formatos impresso e eletrônico, a RIAL tem interesse por trabalhos originais em todas as áreas laboratoriais em saúde pública. São também publicadas outras contribuições inéditas, desde que sobre temas atuais e importantes – revisões de literatura, comunicações breves e notas científicas – além de resumos de teses e dissertações.

Os manuscritos devem destinar-se exclusivamente à RIAL, não sendo permitida sua apresentação simultânea a outro periódico. As contribuições podem ser apresentadas em português ou inglês.

Os manuscritos submetidos são analisados inicialmente pelos editores quanto ao atendimento aos padrões da RIAL e às normas para o envio dos originais. Aqueles manuscritos selecionados são encaminhados para avaliação por pares externos de área pertinente, sempre de instituições distintas àquela da origem do manuscrito, sendo garantido o anonimato e a confidencialidade durante todo o processo de avaliação. Após receber os pareceres, o Corpo Editorial, que detém a decisão final sobre a publicação ou não do texto, avalia a aceitação do texto sem modificações, a recusa ou a devolução ao autor com as sugestões apontadas pelos relatores. Os manuscritos submetidos devem atender à política editorial da RIAL e às Instruções aos Autores, que seguem os *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication* (<http://www.icmje.org>).

Os critérios éticos da pesquisa devem ser respeitados. Os autores devem explicitar em MÉTODOS que a pesquisa foi conduzida dentro dos padrões exigidos pela Declaração de Helsink e aprovada por comissão de ética (CEP) reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) – vinculada ao Conselho Nacional de Saúde (CNS) – bem como registro dos estudos de ensaios clínicos em base de dados, conforme recomendação aos editores da Lilacs e Scielo, disponível em: <http://bvsmodelo.bvsalud.org/site/lilacs/homepage.htm>. O nome da base de dados, sigla e/ou número do ensaio clínico, assim como o número do processo e o nome da comissão de ética que aprovou o projeto, deverão ser colocados ao final do RESUMO. Nos casos de ensaios envolvendo animais, estes deverão atender a Lei Federal 9.605 contra crimes ambientais, a Lei Federal 6.638/76 e a Lei 11.794/08, que normatiza a utilização de animais em pesquisa científica. Os autores deverão ter em seu poder todos os documentos referentes a este procedimento, que poderão ser solicitados em qualquer momento pelos editores.

Os autores serão responsáveis por reconhecer e revelar conflitos financeiros, de interesse comercial e/ou associativo, relacionados ao material de trabalho ou outros que possam influenciá-los, apresentando uma declaração sobre a existência ou não de tais conflitos. Os relatores também devem revelar aos editores qualquer conflito que possa influir ou impedir as suas avaliações.

Os manuscritos publicados são de propriedade da RIAL. A transferência de direitos autorais será solicitada após a aprovação do manuscrito para publicação.

INFORMAÇÕES GERAIS

Os manuscritos submetidos à publicação na RIAL devem ser apresentados de acordo com as Instruções aos Autores.

São aceitos manuscritos nos idiomas: português e inglês.

O manuscrito deve ser encaminhado em formato eletrônico (e-mail) ou impresso, aos cuidados do editor-chefe da RIAL, no seguinte endereço:

Revista do Instituto Adolfo Lutz (RIAL)

Núcleo de Acervo

Av. Dr. Arnaldo, 355 - Cerqueira César - São Paulo - SP - Brasil - CEP: 01246-902

Ou por meio eletrônico em rial@saude.sp.gov.br

Pormenores sobre os itens exigidos para apresentação do manuscrito estão descritos a seguir.

1. CATEGORIA DE ARTIGOS

1.1 ARTIGOS ORIGINAIS: Incluem estudos relacionados à prevenção e controle de agravos e à promoção à saúde. Devem ser baseados em novos dados ou perspectivas relevantes para saúde pública. Cada artigo deve conter objetivos e hipóteses claras, desenho e métodos utilizados, resultados, discussão e conclusões.

INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES:

- Devem ter até 20 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.
- As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 05 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.

▪ As referências bibliográficas, limitadas a 40, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.

▪ Os resumos em português e em inglês (*abstract*) devem ter até 200 palavras, com a indicação de 3 a 6 palavras-chave (*keywords*).

A estrutura dos artigos originais de pesquisa é a convencional: Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão e Conclusão, embora outros formatos possam ser aceitos, mas respeitando a lógica da estrutura de artigos científicos.

1.2 ARTIGOS DE REVISÃO: Dedicados à apresentação e à discussão de temas de interesse científico e de relevância para a saúde pública. Devem apresentar formulação clara de um objeto científico de interesse, argumentação lógica, crítica teórico-metodológica dos trabalhos consultados e síntese conclusiva. Devem ser elaborados por pesquisadores com experiência no campo em questão ou por especialistas de reconhecido saber.

Informações complementares:

▪ Devem ter até 25 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.

▪ As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 03 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.

▪ As referências bibliográficas, limitadas a 50, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.

▪ Os resumos em português e em inglês (*abstract*) devem ter até 200 palavras, com a indicação de 3 a 6 palavras-chave (*keywords*).

1.3 COMUNICAÇÕES BREVES: São relatos sucintos destinados à rápida divulgação de eventos significativos no campo da pesquisa de interesse em saúde pública e que não comportam uma análise mais abrangente.

Informações complementares:

▪ Devem ter até 10 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.

▪ As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 02 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.

▪ As referências bibliográficas, limitadas a 15, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.

▪ Os resumos em português e em inglês (*abstract*) devem ter até 200 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (*keywords*).

▪ Sua apresentação deve acompanhar as mesmas normas exigidas para artigos originais.

1.4 NOTAS CIENTÍFICAS: São relatos sucintos destinados à rápida divulgação de eventos relevantes de uma pesquisa experimental que justifique a publicação de resultados parciais.

Informações complementares:

▪ Devem ter até 06 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.

▪ As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 02 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.

▪ As referências bibliográficas, limitadas a 10, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.

▪ Os resumos em português e em inglês (*abstract*) devem ter até 200 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (*keywords*).

▪ Sua apresentação deve acompanhar as mesmas normas exigidas para artigos originais, porém na forma de texto único.

1.5 RELATOS DE CASO: São textos que contemplam principalmente a área médica, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada.

Informações complementares:

▪ Devem ter até 03 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.

▪ As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 02 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.

▪ As referências bibliográficas, limitadas a 10, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.

- Os resumos em português e em inglês (*abstract*) devem ter até 200 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (*keywords*).
- Devem apresentar Introdução, Relato de caso, Discussão e Conclusão, na forma de texto único.

1.6 RESUMOS DE TESES E DISSERTAÇÕES: São aceitos resumos de teses e dissertações até um ano após a defesa.

Informações complementares:

- Devem ter até 400 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (*keywords*).
- Sua apresentação deve conter o nome do autor e do orientador, título do trabalho em português e em inglês, nome da instituição em que foi apresentado, área de concentração e ano da defesa.

2. APRESENTAÇÃO DO MANUSCRITO: Os textos devem ser redigidos em processador de texto *Word for Windows* 2003 ou compatível, no formato A4, espaço duplo, fonte *Times New Roman*, tamanho 12. Devem ser evitados arquivos compactados. A estrutura do manuscrito deve estar em conformidade com as normas do Sistema Vancouver – Título; Autores e Instituições; Resumo e Abstract; Introdução; Material e Métodos; Resultados; Discussão; Conclusão; Agradecimentos; Referências; Tabelas; Figuras e Fotografias.

2.1 PÁGINA DE IDENTIFICAÇÃO: Deve constar:

Título em português e em inglês: O título deve ser conciso, completo e conter informações. Se o manuscrito for submetido em inglês, deve ser fornecido um título em português.

Autores: De acordo com o *International Committee of Medical Journal Editors* (ICMJE), são considerados autores aqueles que contribuíram substancialmente para a concepção e planejamento, ou análise e interpretação dos dados; contribuíram significativamente na elaboração do rascunho ou na revisão crítica do conteúdo e participaram da aprovação da versão final do mesmo. Somente a aquisição de financiamento, a coleta de dados ou supervisão geral de grupos de pesquisa não justificam autoria – maiores esclarecimentos sobre autoria podem ser encontrados na página do ICMJE (<http://www.icjme.org>). Deve constar o nome completo, sem abreviações e com último sobrenome em caixa alta (exemplo: Ana Maria Camargo da SILVA) e o e-mail do autor responsável. O autor responsável para troca de correspondência deve estar assinalado com asterisco (*) e apresentar também o endereço completo.

Afiliação: Deve ser indicada a instituição à qual cada autor está afiliado, na seguinte ordem de hierarquias institucionais de afiliação: laboratório, setor, seção, serviço, divisão, departamento, instituto, faculdade e universidade.

Financiamento da pesquisa: Se a pesquisa foi subvencionada, indicar o tipo de auxílio, o nome da agência financiadora e o respectivo número do processo.

Apresentação prévia: Quando baseado em tese ou dissertação, indicar o nome do autor, título, ano, nome do programa de pós-graduação e instituição onde foi apresentada. Quando apresentado em evento científico, indicar o nome do evento, local e ano da realização.

2.2 PREPARO DO MANUSCRITO:

Resumo/Abstract: Todos os textos deverão ter resumos em português e inglês, dimensionados para ter até 200 palavras. Como regra geral, o resumo deve incluir objetivos do estudo, principais procedimentos metodológicos, principais resultados e conclusões.

Palavras-chave/keywords: Devem ser indicados entre 3 a 6 descritores do conteúdo, extraídos do vocabulário Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) da Bireme (disponível em <http://www.bireme.br>) nos idiomas português e inglês. Em inglês, com base no *Medical Subject Headings* (MeSH). Caso não sejam encontrados descritores adequados para a temática do manuscrito, poderão ser indicados termos não existentes nos conjuntos citados.

Estrutura do texto:

A) Introdução: Deve ser breve, relatando o contexto e a justificativa do estudo, apoiados em referências pertinentes ao objetivo do manuscrito, sintetizando a importância e destacando as lacunas do conhecimento abordadas. Não deve incluir dados ou conclusões do estudo em referência

B) Material e Métodos: Os procedimentos adotados devem ser descritos claramente, bem como as variáveis analisadas, com a respectiva definição, quando necessária, e a hipótese a ser testada. Devem ser descritas a população e a amostra, instrumentos de medida, com a apresentação, se possível, de medidas de validade e conter informações sobre a coleta e processamento de dados. Deve ser incluída a devida referência para os métodos e técnicas empregados, inclusive os métodos estatísticos; métodos novos ou substancialmente modificados devem ser descritos, justificando as razões para seu uso e mencionando suas limitações. Os critérios éticos da pesquisa devem ser respeitados; os autores devem explicitar que a pesquisa foi conduzida dentro de padrões éticos e foi aprovada por comitê de ética, indicando o nome do comitê de ética, número e data do registro.

C) Resultados: Devem ser apresentados em uma sequência lógica, iniciando-se com a descrição dos dados mais importantes. Tabelas e figuras devem ser restritas àquelas necessárias para argumentação e a descrição dos dados no texto deve ser restrita aos mais importantes. Os gráficos devem ser utilizados para destacar os resultados mais relevantes e resumir relações complexas. Dados em gráficos e tabelas não devem ser duplicados nem repetidos no texto. Os resultados numéricos devem especificar os métodos estatísticos utilizados na análise.

D) Discussão: A partir dos dados obtidos e resultados alcançados, os novos e importantes aspectos observados devem ser interpretados à luz da literatura científica e das teorias existentes no campo. Argumentos e provas baseadas em comunicação de caráter pessoal ou divulgadas em documentos restritos não podem servir de apoio às argumentações do autor. Tanto as limitações do trabalho quanto suas implicações para futuras pesquisas devem ser esclarecidas. Incluir somente hipóteses e generalizações baseadas nos dados do trabalho. As conclusões podem finalizar esta parte, retomando o objetivo do trabalho ou serem apresentadas em item separado.

E) Agradecimentos: Este item é opcional e pode ser utilizado para mencionar os nomes de pessoas que, embora não preencham os requisitos de autoria, prestaram colaboração ao trabalho. Será preciso explicitar o motivo do agradecimento, por exemplo, consultoria científica, revisão crítica do manuscrito, coleta de dados etc. Deve haver permissão expressa dos nomeados e o autor responsável deve anexar a Declaração de Responsabilidade pelos Agradecimentos. Também pode constar desta parte apoio logístico de instituições.

2.3 CITAÇÃO NO TEXTO: A exatidão das referências é de responsabilidade dos autores. Devem ser indicadas pelo seu número na listagem, na forma de **expoente**, sem uso de parênteses, colchetes e similares. Nos casos em que há citação do nome do autor, o número da referência deve ser colocado a seguir do nome do autor. Trabalhos com dois autores devem fazer referência aos dois autores ligados por “e”. Nos outros casos apresentar apenas o primeiro autor (seguido de et al, em caso de autoria múltipla).

Exemplos: Nos Estados Unidos e Canadá, a obrigatoriedade da declaração dos nutrientes no rótulo do alimento é mais antiga e foram desenvolvidos métodos hidrolíticos, como o AOAC 996.06¹, de extração e determinação da GT por cálculo a partir dos AG obtidos por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (GC/DIC)^{2,3}.

Segundo Chang et al³¹, o aumento do tamanho das partículas resulta numa redução da área de superfície conferindo uma melhora na retenção e estabilidade das mesmas.

2.4 REFERÊNCIAS: Listadas ao final do texto, devem respeitar a quantidade definida para cada categoria de artigos aceitos pela RIAL. As referências devem ser normalizadas de acordo com o estilo *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication*, numeradas consecutivamente na ordem em que foram mencionadas a primeira vez no texto.

Os títulos de periódicos devem ser referidos de forma abreviada, de acordo com o *Medline*, disponível no endereço <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=journals>. Para consultar periódicos nacionais e latino-americanos: <http://portal.revistas.bvs.br/main.php?home=true&lang=pt>.

No caso de publicações com até seis autores, citam-se todos; acima de seis, citam-se os seis primeiros, seguidos da expressão latina “et al”. Referências de um mesmo autor devem ser organizadas em ordem cronológica crescente.

Exemplos:

Artigos de periódicos:

Aued-Pimentel S, Zenebon O. Lipídios totais e ácidos graxos na informação nutricional do rótulo dos alimentos embalados: aspectos sobre legislação e quantificação. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2009;68(2):121-6.

Weihrauch JL, Posati LP, Anderson BA, Exler J. Lipid conversion factors for calculating fatty acids contents of foods. *J Am Oil Chem Soc*. 1977;54:36-40.

Hennington EA. Acolhimento como prática interdisciplinar num programa de extensão. *Cad Saude Coletiva* [Internet]. 2005;21(1):256-65. Disponível em: [<http://www.scielo.br/pdf/csp/v21n1/28.pdf>].

Livros:

Ringsven MK, Bond D. *Gerontology and leadership skills for nurses*. 2ª ed. Albany (NY):Delmar Publishers;1996.

Lopez D, organizador. *Estudos epidemiológicos qualitativos*. São Paulo: James Martim; 2009.

Institute of Medicine (US). *Looking at the future of the Medicaid program*. Washington (DC): The Institute; 1992.

Foley KM, Gelband H, editors. *Improving palliative care for cancer*. Washington: National Academy Press 2001 [acesso 2003 Jul 13]. Disponível em: [http://www.nap.edu/catalog.php?record_id=10149].

Capítulos de livro:

Wirdh L. História da Epidemiologia. *In*: Lopez D, organizador. *Estudos epidemiológicos qualitativos*. São Paulo: James Martim; 2009.p.64-76.

Dissertações, teses e monografias:

Santos EP. Estabilidade química da manteiga da terra [dissertação de mestrado]. Bananeiras (PB): Universidade Federal da Paraíba;1995.
Moreschi ECP. Desenvolvimento e validação de métodos cromatográficos e avaliação da estabilidade de vitaminas hidrossolúveis em alimentos [tese de doutorado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2006.

Trabalhos de congressos, simpósios, encontros, seminários e outros:

Barboza et al. Descentralização das políticas públicas em DST/AIDS no Estado de São Paulo. III Encontro do Programa de Pós-Graduação em Infecções e Saúde Pública; agosto de 2004; São Paulo: Rev Inst Adolfo Lutz. p. 34 [resumo 32-SC].

Dados eletrônicos:

Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo – SABESP. O que fazemos/Qualidade da água. [acesso 2008 Set 17]. Disponível em: [http://www.sabesp.com.br/CalandraWeb/CalandraRedirect/?temp=4&proj=sabesp&pub=T&db=&doc].

Legislação:

Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil. Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1, nº7-E. p.45-53.

Autoria institucional:

Instituto Adolfo Lutz (São Paulo - Brasil). Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 4ª ed. [1ª ed. digital]. São Paulo (SP): Instituto Adolfo Lutz; 2008. Disponível em: [http://www.ial.sp.gov.br/index.php?option=com_remository&Itemid=7&func=select&orderby=1&Itemid=7].

Organización Mundial de la Salud – OMS. Como investigar el uso de medicamentos em los servicios de salud. Indicadores seleccionados del uso de medicamentos. Ginebra; 1993. (DAP. 93.1).

Patente:

Larsen CE, Trip R, Johnson CR, inventors: Novoste Corporation, assignee. Methods for procedures related to eletrophysiology of the heart. US patent 5,529,067. 1995 Jun 25.

Casos não contemplados nesta instrução devem ser citados conforme indicação do *Committee of Medical Journals Editors (Grupo Vancouver)*, disponível em: <http://www.cmje.org>.

Referências a documentos não indexados na literatura científica mundial, em geral de divulgação circunscrita a uma instituição ou a um evento (teses, relatórios de pesquisa, comunicações em eventos, dentre outros) e informações extraídas de documentos eletrônicos, não mantidas permanentemente em sites, se relevantes, devem figurar no rodapé das páginas do texto onde foram citadas.

2.5 NÚMEROS DE FIGURAS E TABELAS: A quantidade de figuras e tabelas de cada manuscrito deve respeitar a quantidade definida para cada categoria de artigos aceitos pela RIAL. Todos os elementos gráficos ou tabulares apresentados serão identificados como *figura* ou *tabela*, e numerados sequencialmente a partir de um, e não como *quadros*, *gráficos* etc.

A) Tabelas: Devem ser redigidas em processador de texto *Word for Windows* 2003 ou compatível e serem apresentadas em arquivos separados, numeradas consecutivamente com algarismos arábicos, na ordem em que foram citadas no texto. A cada uma deve-se atribuir um título breve, não se utilizando traços internos horizontais ou verticais. As notas explicativas devem ser limitadas ao menor número possível e colocadas no rodapé das tabelas e não no cabeçalho ou título. Se houver tabela extraída de outro trabalho, previamente publicado, os autores devem solicitar formalmente autorização da revista que a publicou, para sua reprodução.

B) Figuras: As ilustrações (fotografias, desenhos, gráficos etc.) devem ser citadas como Figuras, apresentadas em arquivos separados e numeradas consecutivamente com algarismos arábicos na ordem em que foram citadas no texto. Devem conter título e legenda apresentados na parte inferior da figura. Só serão admitidas para publicação figuras suficientemente claras e com qualidade digital que permitam sua impressão, preferencialmente no formato vetorial. No formato JPEG, a resolução mínima deve ser de 300 dpi. Figuras em cores serão publicadas quando for necessária à clareza da informação e os custos deverão ser cobertos pelos autores. Se houver figura extraída de outro trabalho, previamente publicado, os autores devem solicitar autorização, por escrito, para sua reprodução.

3. DECLARAÇÕES E DOCUMENTOS SOLICITADOS: Em conformidade com as diretrizes do *International Committee of Medical Journal Editors*, são solicitados alguns documentos e declarações do(s) autor(es) para a avaliação de seu manuscrito. Observe a relação dos documentos abaixo e, nos casos em que se aplique, anexe o documento ao processo. O momento em que tais documentos serão solicitados é variável:

Documento/declaração	Quem assina	Quando anexar
Carta de Apresentação	Todos	Submissão
Responsabilidade pelos Agradecimentos	Autor responsável	Aprovação
Transferência de Direitos Autorais	Todos	Aprovação

A carta de Apresentação do manuscrito, assinada por todos os autores, deve conter:

- Um parágrafo declarando a responsabilidade de cada autor: ter contribuído substancialmente para a concepção e planejamento ou análise e interpretação dos dados; ter contribuído significativamente na elaboração do rascunho ou na revisão crítica do conteúdo; e ter participado da aprovação da versão final do manuscrito. Para maiores informações sobre critérios de autoria, consulte a página do ICMJE (<http://www.icjme.org>).
- Um parágrafo contendo a declaração de potenciais conflitos de interesses dos autores.
- Um parágrafo contendo a declaração que o trabalho não foi publicado, parcial ou integralmente, em outro periódico. Todos os autores devem ler, assinar e enviar documento transferindo os direitos autorais. O artigo só será liberado para publicação quando esse documento estiver de posse da RIAL .

4. VERIFICAÇÃO DOS ITENS EXIGIDOS NA SUBMISSÃO:

1. Nome e instituição de afiliação de cada autor, incluindo e-mail e telefone do autor responsável.
2. Título do manuscrito, em português e inglês.
3. Texto apresentado em letras *Times New Roman*, corpo 12, em formato *Word* ou similar (doc, txt, rtf).
4. Resumos em dois idiomas, um deles obrigatoriamente em inglês.
5. Carta de Apresentação assinada por todos os autores.
6. Nome da agência financiadora e número(s) do processo(s).
7. No caso de artigo baseado em tese/dissertação, indicar o nome da instituição/Programa, grau e o ano de defesa.
8. Referências normalizadas segundo estilo Vancouver, ordenadas pela citação no texto e numeradas, e se todas estão citadas no texto.
9. Tabelas numeradas sequencialmente, com título e notas, e no máximo com 12 colunas, em formato *Word* ou similar (doc, txt, rtf).
10. Figura no formato vetorial ou em pdf, ou tif, ou jpeg ou bmp, com resolução mínima 300 dpi.

5. REVISÃO DA REDAÇÃO CIENTÍFICA: Para ser publicado, o manuscrito aprovado é submetido à revisão da redação científica, gramatical e de estilo. A RIAL se reserva o direito de introduzir alterações nos originais, visando a manutenção da homogeneidade e qualidade da publicação, respeitando, porém, o estilo e as opiniões dos autores. Inclusive a versão em inglês do artigo terá esta etapa de revisão.

6. PROVAS: Após sua aprovação pelos editores, o manuscrito será revisado quanto à redação científica. O autor responsável pela correspondência receberá as provas gráficas para revisão por correio eletrônico em formato pdf (*portable document format*). O prazo máximo para a revisão da prova é de dois dias. É importante cumprir os prazos de revisão para garantir a publicação no fascículo programado. Atrasos nesta fase poderão resultar em remanejamento do artigo para fascículos subsequentes.

7. PUBLICAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO: Os artigos serão publicados em ordem cronológica de aprovação. As datas de recebimento e de aprovação do artigo constarão obrigatoriamente no mesmo.

É permitida a reprodução, no todo ou em parte, de artigos publicados na RIAL, desde que sejam indicados a origem e o nome do autor, de conformidade com a legislação sobre os direitos autorais.

A Revista do Instituto Adolfo Lutz é distribuída gratuitamente a entidades governamentais, culturais ou em permuta de periódicos nacionais ou estrangeiros.

Assessoria Editorial:

TIKINET

www.tiki.net.br/tiki



Instituto Adolfo Lutz



SECRETARIA
DA SAÚDE

