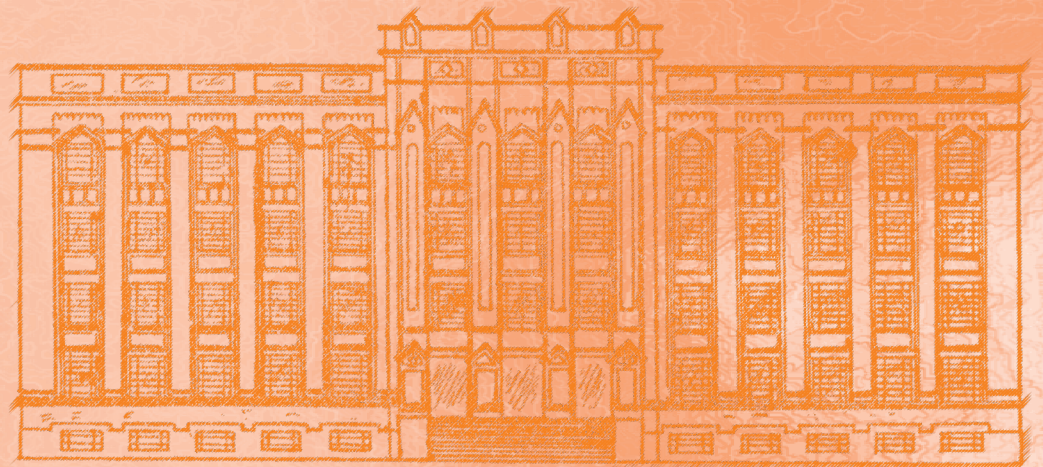


REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

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



Volume 71 número 2, 2012





Coordenadoria de Controle de Doenças
Instituto Adolfo Lutz

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Volume 71 número 2, 2012
Abril - Junho 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.

Lúgia Bicudo de Almeida Muradian, São Paulo, Brasil.

Luz Elena Cano Restrepo, Medellín, Colômbia.

Maria José Mendes Gianini, Araraquara, Brasil.

Marluce Bibbo, Pennsylvania, EUA.

Martin Emilio Munk, Copenhagen, Dinamarca.

Myrna Sabino, São Paulo, Brasil.

Paul W. Flinn, Kansas, EUA.

Pedro Paulo Chieffi, São Paulo, Brasil.

Regina Maura Bueno Franco, Campinas, Brasil.

Susana Córdoba, Buenos Aires, Argentina.

Terezinha de Jesus Andreoli Pinto, São Paulo, Brasil.

Thales de Brito, São Paulo, Brasil.

Vanessa Yardley, London, UK.

Venâncio Avancini Ferreira Alves, São Paulo, Brasil.

Vera Akiko Maihara, São Paulo, Brasil.

Vera Lucia Garcia Calich, São Paulo, Brasil.

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

1941

2012, 71(2)

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

- 1458 Ilhas de patogenicidade de *Salmonella enterica*: uma revisão**
Salmonella enterica pathogenicity islands: a review
Tanise Pacheco FORTES, Michel Quevedo FAGUNDES, Flávia Aleixo VASCONCELLOS, Cláudio Dias TIMM,
Éverton Fagonde da SILVA 219-227
- 1459 Caracterização dos surtos causados pelo grupo *Mycobacterium abscessus***
Characterization of the outbreaks caused by the *Mycobacterium abscessus* group
Natalia Fernandes Garcia de CARVALHO, Lucilaine FERRAZOLI, Maria Beatriz Acosta RIVERON, Erica CHIMARA 228-236
- 1460 Prevalence and antimicrobial susceptibility profile of *Enterococcus* spp isolated from frozen chicken carcasses**
Prevalência e perfil de susceptibilidade antimicrobiana de *Enterococcus* spp isolados de carcaças de frango congeladas
Christiane Asturiano RISTORI, Ruth Estela Gravato ROWLANDS, Alzira Maria Morato BERGAMINI,
Giselle Ibette Silva Lopez LOPES, Ana Maria Ramalho de PAULA, Maria Aparecida de OLIVEIRA, Marisa Jesus de Castro LIMA,
Luciana S TEGANI, Adriana Hitomi WATANABE, Miyoko JAKABI, Rosemeire Cobo ZANELLA..... 237-243
- 1461 Comparative study on PCR and microbiological culture performance for identifying *Mycobacterium tuberculosis* complex and *Mycobacterium bovis* specie in bovine samples**
Comparação entre o cultivo microbiológico e a PCR na identificação do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e da espécie *Mycobacterium bovis* em amostras bovinas
Alessandra Figueiredo de Castro NASSAR, Simone MIYASHIRO, Rosa Maria PIATTI, Cristina Corsi DIB, Eliana ROXO,
Ronaldo Zucatelli MENDONÇA 244-249
- 1462 Isolation of *Staphylococcus* from minas frescal type cheese and detection of enterotoxin genes**
Isolamento de *Staphylococcus* de queijo minas frescal e detecção de genes de enterotoxinas
Juliana de Castro Beltrão da COSTA, Elaine Ibrahim de FREITAS, Anderson Almeida de LEMOS, Carla de Oliveira ROSAS,
Valéria de Mello MEDEIROS, Márcia Barbosa WARNKEN, Neide Hiromi Tokumaru MIYAZAKI, Victor Augustus MARIN .. 250-258
- 1463 Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de queijos coalho**
Profile of susceptibility of bacteria, isolated from curdle cheese
Alaíse Gil GUIMARÃES, Ryzia de Cassia Vieira CARDOSO, Priscila Florêncio AZEVÊDO, Roberta Barbosa de MENESES.... 259-265
- 1464 Avaliação da qualidade do leite e seu processamento na produção de leite em pó associado a Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle**
Quality evaluation of milk and its processing for producing milk powder in accordance with Hazard Analysis and Critical Control Points
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..... 266-273

1465	Eficiência alimentar e qualidade proteica das sementes de baru e pequi procedentes do Cerrado brasileiro Eficiência alimentar e qualidade proteica das sementes de <i>baru</i> e <i>pequi</i> procedentes do Cerrado brasileiro Amanda Goulart Oliveira SOUSA, Daniela Canuto FERNANDES, Maria Margareth Veloso NAVES	274-280
1466	Geleia de cagaita (<i>Eugenia dysenterica</i> DC.): desenvolvimento, caracterização microbiológica, sensorial, química e estudo da estabilidade Cagaita (<i>Eugenia dysenterica</i> DC.) jelly: development, microbiological, sensory, chemical characterization, and stability study Priscila Rossini Gomes SANTOS, Leandro de Moraes CARDOSO, Sabrina de Freitas BEDETTI, Fabiana Rossi HAMACEK, Ana Vlândia Bandeira MOREIRA, Hércia Stampini Duarte MARTINO, Helena Maria PINHEIRO-SANT'ANA	281-290
1467	Caracterização físico-química e microbiológica da linhaça dourada e marrom (<i>Linum Usitatissimum</i> L.) Golden and brown flaxseed (<i>Linum Usitatissimum</i> L.) physicochemical and microbiological characterization Daiana NOVELLO, Marise Aparecida Rodrigues POLLONIO	291-300
1468	Chemical composition and functional properties of chocolate cakes formulated with yacon tube roots (<i>Smallanthus sonchifolius</i>) Caracterização e propriedades funcionais de bolos de chocolate formulados com raízes tuberosas de yacon (<i>Smallanthus sonchifolius</i>) Vivianne Montarroyos PADILHA, Silvana Magalhães SALGADO, Priscilla Moura ROLIM, Alda Verônica Souza LIVERA, Samara Alvachian Cardoso ANDRADE, Nonete Barbosa GUERRA, Ruth Cavalcanti GUILHERME	301-307
1469	Análise descritiva de iogurte light suplementado com farinha de yacon (<i>Smallanthus sonchifolius</i>) Descriptive analysis of light yogurt supplemented with yacon (<i>Smallanthus sonchifolius</i>) flour Christiane Mileib VASCONCELOS, Célia Lúcia de Luces Fortes FERREIRA, Mônica Ribeiro PIROZI, José Benício Paes CHAVES ..	308-316
1470	Desenvolvimento e caracterização de bebida achocolatada à base de extrato hidrossolúvel de quinoa e de arroz Production and characterization of the quinoa and rice water soluble extract-based chocolate drink Rafaela Suzuki BENTO, Mônica Regina da Silva SCAPIM, Miriam Carla Bonicontró AMBROSIO-UGRI	317-323
1471	Aceitabilidade sensorial de biscoito tipo cracker adicionado de farinha de casca de limão siciliano (<i>Citrus limon</i> L. Burm.) Sensory acceptability of cream cracker prepared by adding sicilian lemon peel (<i>Citrus limon</i> L. Burm.) flour Ana Cláudia THOMAZ, Gabriela Regina da SILVA, Daiana NOVELLO, Herta Stutz DALLA SANTA, Melissa dos Santos RAYMUNDO, Mateus Gatti BATISTA	324-330
1472	Assessing the ascorbic acid contents in beverages and powdered juices: comparison between the experimental data and the values displayed on the product label Avaliação do conteúdo de ácido ascórbico em bebidas e refrescos em pó: comparação entre valores experimentais e os declarados no rótulo Daniel GRANATO, Flavia Vilas Boas Wiecheteck PIEKARSKI, Maria Lucia MASSON	331-336
1473	Chemical characterization and size distribution of sorghum genotypes for human consumption Caracterização química e distribuição granulométrica de genótipos de sorgo para alimentação humana Hércia Stampini Duarte MARTINO, Priscila Alves TOMAZ, Érica Aguiar MORAES, Lisiane Lopes da CONCEIÇÃO, Daniela da Silva OLIVEIRA, Valéria Aparecida Vieira QUEIROZ, José Avelino Santos RODRIGUES, Mônica Ribeiro PIROZI, Helena Maria PINHEIRO-SANT'ANA, Sônia Machado Rocha RIBEIRO	337-344
1474	Resíduos de inseticidas organofosforados: validação de método e ocorrência em hortícolas Residues of insecticides organophosphorus: method validation and occurrence in vegetables Eliane Hooper AMARAL, Alexandre Augusto SOARES, Leandro Augusto Ferreira de SOUSA, Scheilla Vitorino Carvalho de SOUZA, Roberto Gonçalves JUNQUEIRA	345-354

- 1475 Validation of new analytical methodology for determining fenoterolhydrobromide by HPLC: application in pharmaceutical products**
Validação de uma nova metodologia analítica para determinação de bromidrato de fenoterol por CLAE: aplicações em produtos farmacêuticos
Helena Miyoco YANO, Fernanda Fernandes FARIAS, Marcelo Beiriz DEL BIANCO, Pedro Lopez GARCIA 355-361
- 1476 Tolerância de *Mycobacterium abscessus subsp. bolletii* a desinfetantes de alto nível**
Tolerance of *Mycobacterium abscessus subsp. bolletii* to high-level disinfectants
Aline da Silva Soares SOUTO, Bruna Peres SABAGH, Alessandra Oliveira de ABREU, Sérgio Alves da SILVA, Daniella Cristina Rodrigues PEREIRA, Marta de Campos NEVES, Rodrigo Rollin PINHEIRO, Rafael Silva DUARTE, Neide Hiromi Tokumaru MIYAZAKI, Maria Helena Simões VILLAS BÔAS..... 362-371
- 1477 Bifenilos policlorados em soro de homens e sua relação com o nível de antígeno prostático específico**
Polychlorinated biphenyls in serum samples from male individuals and their relationship with the prostatic specific antigen levels
Joseane de Oliveira MOZZAQUATRO, Susana MOHR, Marta Maria Medeiros Frescura DUARTE, Ijoni Hilda COSTABEBER..... 372-377
- 1478 Efeito inibitório de óleos essenciais do gênero *Citrus* sobre o crescimento de micro-organismos**
Inhibitory effect of essential oils from the genus *Citrus* on the microorganisms growth
Tamara Cubiaki PIRES, Roberta Hilsdorf PICCOLI 378-385
- 1479 Essential oil from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf: a promising natural product against *Malassezia* spp.**
Óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf: um produto natural promissor contra *Malassezia* spp.
Egberto Santos CARMO, Fillipe de Oliveira PEREIRA, Ana Carolina Pessoa MOREIRA, Lizandro Leite BRITO, Carla Wanderley GAYOSO, José Galberto Martins da COSTA, Edeltrudes de Oliveira LIMA 386-391
- 1480 Avaliação do efeito do uso de conservante e dos diferentes momentos de coleta para a determinação de iodo na urina**
The effect of the use of preservative and of the different samples collection times on the iodine determination in urine
Regina Maria CATARINO, Juliana Martinez PEREIRA, Jerenice Esdras FERREIRA, Gláucia Cruzes DUARTE, Patrícia Emília BRAGA, Marina Yoshiê Sakamoto MAEDA, Raimunda Telma de Macêdo SANTOS..... 392-399
- COMUNICAÇÃO BREVE/BRIEF COMMUNICATION
- 1481 Temporalidade de amostras biológicas e de produtos no Instituto Adolfo Lutz**
Temporality of biological samples and products at the Instituto Adolfo Lutz
Luz Marina TRUJILLO, Márcia Jorge CASTEJÓN, Luzia Setuko Umeda YAMAMOTO, Marilena OSHIRO, Lia Teixeira BASTOS, Maria de Fátima Henriques CARVALHO, Patrícia de Lima Vicente COLETA, Marisa Lima CARVALHO..... 400-404
- 1482 Avaliação da rotulagem de alguns vinhos brasileiros**
Evaluation of the quality of labels on some of the Brazilian wines samples
Elaine Marra de Azevedo MAZON, Caroline de Almeida ROSSI, Marcelo Alexandre PRADO, Solange CADORE 405-409
- 1483 Propriedade antimicrobiana do eugenol frente às amostras de *alicyclobacillus* spp. isoladas de suco de laranja**
Antimicrobial properties of eugenol on *alicyclobacillus* spp. isolated from orange juice
Juliana Guerra de OLIVEIRA, Benício Alves de ABREU FILHO 410-414
- 1484 Qualidade microbiológica de castanhas de caju (*Anacardium occidentale*, L.) industrializadas e processadas artesanalmente**
Study on the microbiological quality of industrialized and handmade cashew nuts (*Anacardium occidentale* L.)
Aline Maria Dourado RODRIGUES, Rodrigo Maciel CALVET, Melina da Conceição Macêdo da SILVA, Francisco das Chagas Cardoso FILHO, Aline Marques MONTE, Carina Maricel PEREYRA, Maria Christina Sanches MURATORI, Fábio Coelho Gomes NÓBREGA, Maria Marluvia Gomes PEREIRA..... 415-419

1485	Risco microbiológico associado a drogas vegetais psicoativas adquiridas no comércio popular	
	Microbiological contamination risk of psychoactive herbal drugs purchased in informal trade	
	Julino Assunção Rodrigues SOARES NETO, Eliana RODRIGUES, Adriana Aparecida Buzzo ALMODOVAR, Tatiana Caldas PEREIRA, Adriana BUGNO	420-423
1486	Análise epidemiológica das agressões causadas por animais e do tratamento antirrábico humano no período de janeiro de 1999 a dezembro de 2006	
	Epidemiological analysis on the aggression caused by animals and the human anti-rabies treatment, during the period from January 1999 to December 2006	
	Daniel Friguglietti BRANDESPIM, Gesika Maria da SILVA, José Wilton PINHEIRO JUNIOR, Maria Lucia Xavier de Barros VIANA, Maria Dulcineide Guilherme da ROCHA.....	424-428
■ RESUMOS DE TESES E DISSERTAÇÕES		
	Estudo da administração de ácidos graxos poli-insaturados no condicionamento com cocaína em camundongos	
	Study of the effects of polyunsaturated fatty acids on cocaine-conditioned place preference in mice	
	Eserian JK	429
■ INSTRUÇÕES AOS AUTORES.....		
		431-436

Ilhas de patogenicidade de *Salmonella enterica*: uma revisão

Salmonella enterica pathogenicity islands: a review

RIALA6/1458

Tanise Pacheco FORTES¹, Michel Quevedo FAGUNDES², Flávia Aleixo VASCONCELLOS³, Cláudio Dias TIMM¹, Éverton Fagonde da SILVA^{1*}

*Endereço para a correspondência: ¹Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Campus Universitário Capão do Leão, Prédio 1, Caixa Postal 354, CEP 96010-900, Pelotas, RS. E-mail: efsilva@ufpel.edu.br

²Centro de Desenvolvimento Tecnológico, UFPEL

³Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, UFPEL

Recebido: 31.08.2011 - Aceito para publicação: 03.06.2012

RESUMO

Salmonella é um bom modelo bacteriano para o estudo das interações entre hospedeiro e agente patogênico. Embora muitos de seus fatores de virulência tenham sido caracterizados, os mecanismos de especificidade aos hospedeiros com o desfecho na doença não estão elucidados. As ilhas de patogenicidade (PAI) são elementos genéticos dos cromossomos de um amplo número de agentes patogênicos. Nas salmonelas, muitos dos fatores de virulência são codificados por genes presentes nas PAI, as quais são referidos como ilhas de patogenicidade da *Salmonella* (SPI). Nesta revisão, são sumarizados os relatos na literatura específica dos últimos vinte anos sobre o papel das SPI na patogenia da doença e como elas influenciam nos mecanismos envolvidos na invasão e colonização das bactérias patogênicas no hospedeiro.

Palavras-chave. *Salmonella enterica*, ilhas genômicas, salmoneloses.

ABSTRACT

Salmonella is a suitable bacterial model for conducting the study on the host-pathogen interactions. Although many virulence factors have been characterized, the host specificities mechanisms with disease outcome have not been fully elucidated yet. Pathogenic islands (PAI) are the genetic elements on the chromosomes of a large number of pathogens. In *Salmonella*, many of the virulence factors are encoded by genes on PAI, which are known as *Salmonella* pathogenicity islands (SPI). This review summarizes the reported investigations in the last twenty years regarding to the role of SPI in the disease pathogenesis, and their effects on the pathogen invasion and colonization mechanisms in the host.

Keywords. *Salmonella enterica*, genomic islands, salmonellosis.

INTRODUÇÃO

Bactérias do gênero *Salmonella* são consideradas a principal causa de doença transmitida por alimentos no mundo. As salmonelas são geralmente transmitidas para os humanos por meio do consumo de alimentos de origem animal contaminados, principalmente a carne, aves, ovos e leite¹. A estimativa feita pela Food and Drug Administration² é de que ocorram de 2 a 4 milhões de casos de salmonelose anualmente nos Estados Unidos.

Sorovares de *Salmonella* são patógenos intracelulares capazes de causar doenças em aves e mamíferos³. Duas características marcantes na patogenia da salmonelose são a invasão do hospedeiro e a proliferação intracelular, as quais estão diretamente ligadas a genes localizados nas ilhas de patogenicidade (PAI), elementos genéticos móveis que contribuem para rápidas mudanças no potencial de virulência⁴.

Assim como outros patógenos bacterianos, *Salmonella* abriga *clusters* de genes de virulência, os quais foram adquiridos por meio de transferência genética horizontal⁵. Estes genes de virulência encontram-se reunidos em ilhas genômicas (GI), consideradas “saltos quânticos” na evolução bacteriana, podendo prover bases moleculares para o entendimento da patogênese da doença⁵. Além disso, acredita-se que os genes pertencentes aos plasmídios de virulência, operons de fímbrias, pseudogenes, fagos lisogênicos e ilhas de patogenicidade são importantes para conferir especificidade ao hospedeiro⁶.

Nesta revisão, resumimos a literatura dos últimos vinte anos com respeito ao papel das SPI na patogênese da doença, e como elas influenciam os mecanismos envolvidos na invasão e colonização dos patógenos no hospedeiro.

Ilhas de patogenicidade

As ilhas de patogenicidade são um tipo particular de ilha genômica encontradas nas salmonelas e outros patógenos. Elas estão presentes somente em bactérias patogênicas e carregam um ou mais genes de virulência⁷. A elucidação da função e da distribuição destes genes presentes nas SPI nos sorovares de *Salmonella* pode prover um entendimento da evolução dos sorovares patogênicos e o papel das SPI na diferença de patogênese e epidemiologia entre os sorovares³.

As SPI codificam genes envolvidos na adesão de células do hospedeiro, invasão, sobrevivência dentro

da célula, mecanismos de defesa do sistema imune e, ao menos em parte, na especificidade ao hospedeiro⁸⁻¹¹. Além disso, as SPI também são reconhecidas por contribuírem com a evolução genômica por transferência horizontal de genes em muitos patógenos bacterianos. Evidências indicam que elementos equivalentes em espécies não patogênicas, as ilhas genômicas, são importantes na evolução destas bactérias, influenciando traços como resistência a antibióticos, simbiose e adaptação em geral¹².

Ilha de patogenicidade da *Salmonella* - 1 (SPI-1)

A ilha de patogenicidade 1 de *Salmonella* (SPI-1) é uma região de 40 Kb que forma uma inserção específica no cromossomo⁸. Os genes presentes nesta região foram identificados originalmente em cepas mutantes deficientes na invasão da célula hospedeira. Diferente da maioria das SPI, esta não está associada com genes de tRNA, uma das características que definem uma SPI⁸.

A principal função dos genes codificados por SPI-1 são de secreção do T3SS (*Type-3 Secretory System*). Porém, nem todos os genes localizados neste *locus* estão necessariamente relacionados com o T3SS. O *cluster* do gene *sit*, por exemplo, que codifica um sistema de captura de ferro, também está localizado em SPI-1. Historicamente, a função SPI-1 está associada à invasão de células não fagocíticas, uma característica de virulência importante de *S. enterica*. O T3SS codificado pela SPI-1 forma um apêndice na superfície celular no formato de uma agulha, o qual pode mediar a secreção de proteínas de *Salmonella* extracelular diretamente no citosol das células hospedeiras de eucariotos¹³. Estas proteínas chamadas de efetoras alteram as funções celulares do eucarioto e auxiliam na infecção, promovendo a invasão de células epiteliais não fagocíticas e a iniciação da resposta inflamatória no intestino, além de estarem envolvidas na sobrevivência e persistência da bactéria no hospedeiro¹⁴.

Uma série de proteínas efetoras codificadas por SPI-1 e genes adicionais fora de SPI-1 são translocados dessa mesma forma. Um subgrupo destas proteínas efetoras modifica vias de transdução de sinais, resultando na reorganização temporal do citoesqueleto de actina na célula hospedeira. As proteínas SptP, SopE e SopE2 interferem com a função de proteínas celulares de uma família de pequenas GTPases do hospedeiro (Cdc42, Rac-1 e Rho) que regulam a formação de filamentos de F-actina e a dinâmica do citoesqueleto¹⁵.

Estas proteínas efetoras foram associadas com disrupções das *tight junctions*, sendo que SopB, SipA, SopE e SopE2 funcionam como fatores de troca de GTP, resultando na ativação de Cdc42 e levando a formação de filamentos de actina no sítio de translocação destas proteínas efetoras¹⁵. A modificação localizada do citoesqueleto é seguida de mudanças dramáticas na superfície da célula hospedeira que se aparentam como ondulações na superfície da membrana. Como consequência, células não fagocíticas como as epiteliais, internalizam grandes partículas como bactérias por meio de macropinocitose¹⁵. Foi demonstrado que a proteína efetora SptP possui um efeito antagonista pela sua função como fator ativador de GTPase. SptP pode mediar a inativação de Cdc42 e Rac-1, resultando na terminação da polimerização de actina e ondulamento da membrana¹⁶.

A translocação de proteínas efetoras de SPI-1 dentro de macrófagos pode induzir a formação rápida de um processo apoptótico. A proteína SipB codificada pela SPI-1 está envolvida na apoptose do macrófago pela ativação da caspase-1, a qual cliva a pró-IL-1B e pró-IL-18, precursores de citocinas pró-inflamatórias, uma função similar a IpaB de *Shigella* spp.¹⁷. Isto resulta, também, na liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-8.

Outra função associada à SPI-1 é o controle da captura de *Salmonella* por células dendríticas. Um trabalho com mutantes em *invC*, gene que codifica uma ATPase envolvida na geração de energia para o T3SS, mostrou que estas células foram capturadas com maior eficiência em relação à cepa selvagem, mostrando que SPI-1 funcional controla o número de bactérias que adentram as células dendríticas. Este controle, juntamente com a modulação de citocinas pró-inflamatórias, sugere que a função de modulação da resposta imune do hospedeiro é uma função de grande importância de SPI-1¹⁷.

Já o segundo subgrupo de proteínas efetoras de SPI-1 está relacionado com sintomas de diarreia. As proteínas efetoras SopA, SopB e SopD translocadas pelo sistema T3SS de SPI-1 são necessárias para este fenótipo. SopB é uma fosfatase de inositolfosfato, e sua atividade enzimática resulta na ativação de canais de cloro e perda de fluidos e eletrólitos no lúmen intestinal¹⁸. As funções de SopA e SopD não são totalmente entendidas, mas ambos efetores contribuem para o fenótipo diarréico no modelo bovino de *S. Dublin*¹⁹.

As interações das proteínas codificadas por SPI-1 com o hospedeiro parecem variar muito conforme a cepa

e o modelo de estudo. Trabalhos com cepas mutantes em diferentes modelos animais têm demonstrado incongruências entre a função do T3SS codificado por SPI-1, que se pensava ser exclusivamente de invasão celular. Por exemplo, no modelo galináceo, estudos com *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* com diferentes mutações em SPI-1 demonstraram que as proteínas codificadas por esta ilha têm um papel importante, mas não essencial na invasão tecidual²⁰. Mutantes de SPI-1 não impediram a colonização do ceco, sendo que, no fígado e baço, a invasão foi dependente de ambas SPI-1 e SPI-2^{14,20}. Já com *S. Gallinarium*, mutações em SPI-1 tiveram pouco efeito na virulência e nenhuma alteração na sobrevivência intracelular em macrófagos. Apesar disso, a sinalização pró-inflamatória e a infiltração heterófila foi dependente de SPI-1²¹.

No modelo porcino, foi demonstrado que a invasão de células epiteliais e a indução da inflamação no intestino são dependentes de SPI-1, mas a invasão nas tonsilas é independente de SPI-1²². Em células fagocíticas, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* mutantes em SPI-1 tiveram sua habilidade em invadir macrófagos drasticamente diminuída, com um aumento significativo da expressão de citocinas pró-inflamatórias, mostrando que SPI-1 é necessária não somente para invasão de macrófagos, mas para supressão da expressão prematura de citocinas pró-inflamatórias²³. Em modelo bovino, mutantes em SPI-1 apresentaram uma patologia nas alças ileais semelhantes à cepa selvagem após a infecção com *S. Typhimurium*²⁴. No modelo murino, o principal modelo de estudo de salmonelose sistêmica pela sua semelhança com a febre tifóide de humanos, foi demonstrado que a contribuição de SPI-1 na patogenia está relacionada principalmente com a sobrevivência intracelular em macrófagos²⁵ e modulação da resposta inflamatória por meio dos receptores eucariotos Nod1 e Nod2²⁶.

Quanto à invasão, a expressão de SPI-1 é importante em estágios iniciais da doença, como a invasão de células do trato epitelial, mas parece não estar diretamente envolvida em estágios mais tardios, como invasão de macrófagos hemofagocíticos²⁷. Interessantemente, foi demonstrado no modelo murino que cepas mutantes em SPI-1 e SPI-2 foram capazes de invadir e colonizar células de carcinoma de cólon, sugerindo que as proteínas codificadas por estas ilhas de patogenicidade não são essenciais para a colonização tumoral²⁸. Outro estudo demonstrava que SPI-2 era necessário para a colonização tumoral²⁹. Apesar de todas

estas evidências, em um estudo utilizando um modelo de epitélio intestinal organotípico 3D, foi demonstrado que o T3SS codificado por SPI-1 não é necessário para a invasão de células intestinais²⁹.

Cepas mutantes de *S. Typhimurium* em SPI1, SPI2 e do flagelo foram capazes de invadir diferentes tipos celulares intestinais, como enterócitos, células de Paneth e células M, mostrando que a invasão é um processo ativo de *Salmonella*, independente de T3SS. Entretanto, o T3SS de SPI-1 foi necessário para a replicação intracelular bacteriana no modelo 3D³⁰. Coletivamente, estes dados sugerem que o T3SS é dispensável para a invasão, mas é requerido para o crescimento intracelular. Estas diferenças na patogenia, juntamente com estudos filogenéticos, que demonstram que genes presentes nas ilhas de patogenicidade evoluíram diferencialmente em função e estrutura e sugerem que outro papel importante das SPI é determinar a especificidade ao hospedeiro das diferentes cepas de *Salmonella*³.

A regulação da expressão de SPI-1 é um processo complexo, o qual não é inteiramente entendido. Os genes codificadores do T3SS de SPI-1 são estreitamente regulados por uma rede de reguladores transcricionais que respondem a sinais ambientais e intracelulares. Os genes de SPI-1 são reprimidos em *Salmonella* intracelular e são expressos sob condições impostas aos patógenos pelo microambiente do hospedeiro como o ambiente intestinal. Tais condições incluem níveis de oxigênio, osmolaridade, fase de crescimento, pH, presença de ácidos graxos voláteis de cadeia curta³¹.

SPI-1 codifica alguns reguladores transcricionais. HilA tem um papel de regulador principal no controle da expressão de genes da SPI-1. Este regulador ativa a expressão de genes que codificam o componente estrutural do T3SS de SPI-1, ativando a também a expressão do fator transcricional tipo-AraC InvF, envolvido na regulação da expressão de HilD e HilC que interagem com uma sequência de DNA adjacente do promotor de HilA, presumidamente bloqueando a ligação de um repressor neste local, e InvF controla a expressão de genes que codificam proteínas de substrato para SPI-1³².

A regulação de SPI-1 envolve cascata de ativações transcricionais, nas quais HilD e HilC, HilA e InvF agem sequencialmente para ativar genes T3SS. Inicialmente, HilD e HilC ligam-se a diversos sítios dentro do promotor de HilA e desreprimem a transcrição de HilA. Então, HilA liga-se aos sítios de transcrição de *invF* e

prgH, ativando sua expressão. Um regulador de captura de ferro, Fur, modula a expressão de *hilD* por meio de sua ligação no BoxA, localizado adjacente do promotor de *hilD*³². Isto reflete o fato de que muitos sinais, tanto ambientais quanto intracelulares, afetam a expressão dos genes de SPI-1, por meio da modificação da atividade da proteína HilD. Esta cascata resulta na expressão de genes que codificam componentes do T3SS.

Ilha de patogenicidade da *Salmonella* - 2 (SPI-2)

Esta ilha de patogenicidade tem função essencial para a patogênese de *Salmonella*. O locus SPI-2 possui 40 Kb e está associado com o gene de tRNA *vallV*. No mesmo local, uma inserção de 9 Kb sem função de virulência foi detectado em *E.coli* K-12³³. SPI-2 possui uma estrutura de mosaico de pelo menos dois elementos genéticos. Uma porção de 25 Kb codifica o T3SS e tem um conteúdo de G+C de 43%. Outra porção de 15 Kb mostra uma composição de G+C similar ao *core* genômico, e genes desta porção não são necessários a função de T3SS.

SP-2 está ligada à habilidade de *Salmonella* em sobreviver nas células fagocíticas e replicar-se dentro de vesículas nas células eucarióticas. A SPI-2 foi descoberta por meio do estudo de cepas mutantes que não conseguiam proliferar sistematicamente em camundongos infectados³³, assim como por meio da triagem de regiões específicas no genoma de *Salmonella*³⁴. Cepas mutantes deficientes no T3SS que codifica SPI-2 são altamente atenuadas na sua virulência⁹ e o uso destas cepas como vacina contra a febre tifóide têm sido avaliada.

Existem vários fenótipos celulares relacionados à SPI-2. A função de T3SS codificada por SPI-2 é necessária para a proteção do patógeno nas vesículas que contêm *Salmonella* (SCV) contra os mecanismos da imunidade inata. Estudos têm mostrado que a função de SPI-2 previne a co-localização da oxidase fagocítica³⁵ e da síntese de óxido nítrico³⁶ dentro da SCV. Ambas as funções podem estar relacionadas com a modificação no tráfico da célula hospedeira³⁷. Como consequência, a *Salmonella* intracelular fica protegida de intermediários de nitrogênio e oxigênio reativos e contra a atividade antimicrobiana do peroxinitrito, o qual é gerado por reações de intermediários de nitrogênio e oxigênio reativos. Estes mecanismos de defesa representam uma adaptação específica ao ambiente intracelular, especialmente dentro de células fagocíticas.

Assim como no caso de SPI-1, o modelo animal estudado mostra diferenças importantes na função de SPI-2. Em camundongos, a virulência de *S. Enteritidis* é exclusivamente dependente de SPI-2. Por meio de estudos com cepas mutantes, foi demonstrado que mutantes de SPI-2 não são capazes de replicar-se em macrófagos²⁵, modulam a intensidade da inflamação tecidual juntamente com SPI-1²⁶ e causam depleção de células NK no baço e no sangue³⁸. Já em bovinos e galináceos, mutantes em diferentes locus de SPI-2 causaram a atenuação da virulência de *Salmonella*²⁴.

A expressão dos genes T3SS de SPI-2 é induzida em *Salmonella* intracelular e a expressão é controlada positivamente pelo sistema de dois componentes SsrAB⁴ e negativamente pela interação Ella^{Ntr}-SsrB, que controla os níveis basais de expressão de SPI-2³⁹. A proteína efetora SifA, codificada por um locus fora de SPI-2, é translocada pelo T3SS codificado em SPI-2, e esta proteína é necessária para manter a integridade da membrana fagocítica da SCV durante a proliferação intracelular. Diversas proteínas codificadas em SPI-2 são secretadas e translocadas nas células hospedeiras⁴. Para a SpiC, codificada por SPI-2, foi demonstrada funções de translocação e interferência no tráfico intracelular³⁷. Entretanto, também há evidência de que SpiC é um componente funcional do T3SS³⁷.

O locus SPI-2 é estável e parece ser conservado entre vários sorovares de *S. Enterica*. A SPI-1 está presente em *S. Enterica* assim como em *S. bongori*, enquanto a SPI-2 foi somente detectada em *S. Enterica*, sugerindo uma recente aquisição^{33,34}. A aquisição de SPI-2 é considerada um passo evolucionário em direção à colonização sistêmica de hospedeiros de sangue quente. Uma característica comum de ambas, SPI-1 e SPI-2, é que somente um subgrupo de proteínas efetoras que são translocadas é codificado por genes dentro da ilha de patogenicidade. De fato, a maioria dos efetores é codificada em *loci* distintos espalhados por meio do cromossomo⁴⁰.

Muitos destes *loci* estão associados com genes de bacteriófagos. Tanto SPI-1 quanto SPI-2 evoluíram em regiões estáveis do genoma de *Salmonella*, e estes *loci* codificam um T3SS e um pequeno número de proteínas efetoras. A maior parte das proteínas efetoras é codificada por genes localizados fora de SPI-1 e SPI-2. A associação frequente de *loci* efetores com bacteriófagos indica que estes genes efetores codificam um *pool* de fatores de virulência altamente dinâmico e móvel⁴¹. A combinação

de genes efetores em diferentes sorovares de *Salmonella* spp. pode contribuir para a especificidade ao hospedeiro dos vários sorotipos assim como para o desenvolvimento da doença⁴¹.

Ilha de patogenicidade da *Salmonella* - 3 (SPI-3)

A organização genética e funcional de SPI-3 é diferente de SPI-1 e SPI-2. Esta SPI está inserida no gene de tRNA *SelC*, um locus que serve de local de inserção de SPI em cepas de *E. coli* patogênicas. Este locus possui cerca de 17 Kb, com uma composição de bases semelhante ao *core* genômico¹⁰. Dois fragmentos de elementos de inserção estão localizados na região central de SPI-3, e o conteúdo de G+C de genes dentro deste locus é variado. Além disso, SPI-3 mostra uma estrutura heterogênea nas diferentes subespécies de *Salmonella*¹⁰.

O principal fator de virulência codificado por SPI-3 é um sistema de transporte de alta afinidade com Magnésio (MgtCB), o qual é importante para o fenótipo de *Salmonella* intracelular. Para a replicação intracelular, a bactéria precisa adaptar-se ao ambiente microbicida e pobre em nutrientes do fagossomo, o qual é limitado em purinas, pirimidinas, alguns aminoácidos e Mg²⁺. Um número grande de vias metabólicas e sistemas de transporte é necessário para a adaptação a este ambiente⁴².

Cepas mutantes deficientes no sistema MgtCB são incapazes de proliferação intracelular e virulência sistêmica. Os sistemas MgtB e MgtC estão localizados na membrana citoplasmática. Enquanto MgtB é um transportador de Magnésio⁴³, a função de MgtC ainda não é clara. Outro suposto fator de virulência é o gene *misL*, que codifica um suposto T5SS com similaridade ao *VirG* de *Shigella flexneri* e a adesina AIDA-1 de EPEC¹⁰. O papel de *misL* e outros genes codificados dentro da SPI-3 ainda não foi elucidado, tendo sido sugerido que diferenças genômicas e funcionais entre SPI-3 entre sorovares podem ter implicações na especificidade de funções no hospedeiro⁴⁴.

Ilha de patogenicidade da *Salmonella* - 4 (SPI-4) <2>

A SPI-4 foi inicialmente identificada usando uma abordagem para procurar segmentos de DNA que estavam presentes em *Salmonella* Typhimurium, mas ausentes em *E. coli* K-12 e poderiam constituir SPI⁴⁵. SPI-4 é uma inserção de 27 Kb e está localizada adjacente ao gene *ssb* tRNA-like³³. Como SPI-3, SPI-4 possui estrutura em mosaico. As fases de leitura aberta (ORF, *open*

reading frame) possuem baixo conteúdo G+C quando comparado ao cromossomo de *Salmonella*, enquanto as regiões intergênicas possuem alto conteúdo G+C⁴⁶.

O papel de SPI-4 na virulência de *Salmonella* ainda não foi completamente esclarecido, mas muitos fatores de virulência estão presentes, como o T1SS e ORFs similares a toxinas RTX³³. Genes da SPI-4 são necessários para a fase intestinal da doença pela codificação de adesinas não fimbriais²⁰. SPI-4 codifica um T1SS para a adesina não fimbrial SiiE, que media o contato íntimo da bactéria com os microvilosidades da membrana apical. SiiE é necessária para adesão da *Salmonella* às células epiteliais polarizadas¹¹.

O estabelecimento de contato próximo é um pré-requisito para subsequente invasão mediada pela translocação de proteínas efetoras comandada pelo T3SS codificado pela SPI-1⁴⁷. A adesão às células epiteliais mediada por SPI-4 pode ser um requerimento funcional para a subsequente translocação de proteínas efetoras mediada por SPI-1, resultando em inflamação e respostas inflamatórias¹¹. Sem a adesão mediada pela secreção de SiiE, *Salmonella* é quase incapaz de ativar a remodelação do citoesqueleto celular mediada pela SPI-1 levando à absorção do patógeno¹¹.

Ilha de patogenicidade da *Salmonella* – 5 (SPI-5)

SPI-5 é um pequeno locus de 7,6 Kb que está inserido adjacente ao tRNA *serT*. SPI-5 codifica proteínas efetoras para os T3SS codificados por SPI-1 e SPI-2. SopB é translocado pelo T3SS codificado pela SPI-1 e a expressão de *sopB* é controlada por HilA, o regulador de transcrição central de SPI-1³³. SopB é uma inositol fosfatase cuja atividade produz 1,4,5,6-tetraquifosfato inositol, uma molécula sinalizadora que promove a secreção de cloreto, associada ao influxo de fluido e aos sintomas de diarreia⁴⁶. Em contraste, PipB é um efetor translocado pelo T3SS codificado por SPI-2 sob o controle do sistema SsrAB³³.

SPI-5 possui estrutura de mosaico. O gene *sopB* está presente em *Salmonella bongori* e em todas as subespécies de *Salmonella enterica*. Ainda existe uma diferença na composição básica de diferentes porções de SPI-5, suportando a hipótese de aquisição independente de dois elementos no tRNA *serT*³³. Como observado para outras proteínas efetoras, a presença de genes codificando proteínas efetoras se correlaciona com a presença de SPI codificando T3SS cognatos³³. SPI-5

parece estar associada com enteropatogênese: mutações em *Salmonella* Dublin *pipD* (proteína codificada pela SPI), *sopB* (proteína exterior de *Salmonella*), *pipB* ou *pipA* tem efeito mínimo nas infecções sistêmicas em ratos, mas mostra marcadas respostas secretórias em modelos bovinos⁴⁶. Em contraste, PipB é o efetor translocado pelo T3SS codificado pela SPI-2 sob o controle do sistema SsrAB³³.

Ilha de patogenicidade da *Salmonella* - 6 (SPI-6) ou *Salmonella Chromosomal Island* (SCI)

Um locus de 59 Kb no genoma do sorovar Typhi foi chamado SPI-6 e subsequentemente SCI para o sorovar Typhimurium. SPI-6 está inserida adjacente ao gene *aspV* tRNA e contém o gene *saf* para fimbrias, *pagN* que codifica uma invasina e muitos genes de função desconhecida³³. O locus SCI foi detectado em *Salmonella enterica* subespécie I, e a presença de porções de SCI no locus *aspV* tRNA de isolados das subespécies IIIb, IV e VII foi tomada como uma indicação para a estrutura em mosaico desta SPI. Existe uma sintonia parcial entre SPI-6 e a PAI OI#7 de *E. coli* enteroemorrágica, que também está associada ao gene *aspV* tRNA. Outros homólogos de SPI-6 foram identificados nas sequência genômicas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Yersinia pestis*, mas a função destes homólogos nestes patógenos não é conhecida³³. Apesar de SPI-6 codificar muitos genes de virulência, o papel dessa ilha de *Salmonella* em animais ainda não foi elucidado⁴⁵.

Ilha de Patogenicidade da *Salmonella* - 7 (SPI-7) ou *Major Pathogenicity Island* (MPI)

SPI-7 possui 133 Kb de tamanho e está inserida adjacente ao tRNA *pheu*³³. SPI-7 é um locus específico para os sorovares Typhi, Dublin e Paratyphi C³³ e sua estrutura em forma de mosaico compreende regiões implicadas na virulência⁴⁸. Um importante fator de virulência codificado pela SPI-7 é o antígeno Vi, um exopolissacarídeo capsular. O fago *sopE* que codifica a proteína efetora SopE do T3SS-SPI1 está presente em SPI7. Outro fator de virulência é o pilus IVB codificado pelo grupo de genes *pil*³³.

A organização genômica de SPI-7 é bastante complexa e indica que este locus é composto de diferentes elementos adquiridos horizontalmente. A presença dos genes *pil*, *tra* e *sam* indica que SPI-7 se originou de um plasmídeo conjugativo ou transposon conjugativo.

Pickard et al.⁴⁹ demonstraram que uma porção de SPI-7 está presente em outras bactérias como *Pseudomonas aeruginosa* SG17M. Além disso, a perda do fenótipo capsular Vi pode ser observada em isolados do sorovar Typhi, sugerindo instabilidade do *locus* SPI-7, o qual não está presente nos sorotipos que causam diarreia inflamatória³³.

Ilha de Patogenicidade da *Salmonella* – 8 (SPI-8)

Esta ilha foi identificada durante o sequenciamento do genoma do sorovar Typhi CT18 e é um segmento de DNA com 6,8 Kb⁴⁵. O *locus* está localizado adjacente ao gene *pheV* tRNA e os fatores de virulência são bacteriocinas. A presença de um gene codificando uma integrase indica a mobilidade deste elemento³³. SPI8 parece ser específica para o sorovar Typhi, mas sua distribuição ainda não foi investigada em detalhes³³.

Ilha de patogenicidade da *Salmonella* – 9 (SPI-9)

SPI-9 possui organização similar à SPI-4 e codifica quatro genes, três deles homólogos àqueles requeridos para o T1SS⁴⁵. Os fatores de virulência codificados pelo SPI-9 são um T1SS e uma grande proteína RTX-like³³. Este *locus* também está presente no cromossomo do sorovar Typhimurium. Partes de SPI-9 e do genoma bacteriófago adjacente também estão presentes em sequências genômicas incompletas de outros sorovares e de *Salmonella bongori*, indicando uma distribuição conservada desta ilha³³.

Ilha de patogenicidade da *Salmonella* - 10 (SPI-10)

SPI-10 é uma grande inserção de 32,8 Kb localizada no tRNA *leuX*. Os fatores de virulência codificados por SPI-10 são fímbrias Sef³³. A distribuição das fímbrias Sef é restrita a um subconjunto de sorovares, como Typhi e Enteritidis, e é considerada como um fator que determina a especificidade ao hospedeiro⁴⁵.

Ilha genômica de *Salmonella* -1 (SGI-1)

O surgimento de cepas resistentes atualmente é um grande problema associado com as infecções por *Salmonella*. A caracterização dos fatores de resistência desses isolados levou à identificação de uma ilha genômica em cepas multirresistentes de *Salmonella enterica* sorovares Typhimurium DT 104, Paratyphi B

e Agona³³. Esse locus chamado de ilha genômica 1 da *Salmonella* (SGI-1) é uma ilha genômica de 43 Kb que tem 44 ORF, muitas com homologias a genes conhecidos e outros com funções desconhecidas.

Os genes de resistência a antibióticos estão localizados em um segmento de 13 Kb da SGI-1⁵⁰. Na SGI-1, genes que conferem o fenótipo de penta-resistência (i.e., resistência a tetraciclina, ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina e sulfonamidas) estão localizados na região de resistência a multidrogas, composta por dois integrons. Além disso, um retrofago oculto foi identificado em SGI-1. Em contraste a resistência a antibióticos adquirida por plasmídeos, a SGI-1 cromossomal parece ser estável na ausência de pressão seletiva³³.

A presença de SGI-1 em *Salmonella* Typhimurium DT104 pode ser associada com o surgimento mundial e epidêmico de cepas multirresistentes. Genes associados com a mobilidade de DNA, como transposases, integrases e excisionases, com sequências similares a genes transposon foram detectados na SGI-1. Variantes da SGI-1 foram identificados em outros sorovares nas mesmas localizações cromossômicas, indicando transferência horizontal e recombinação sítio-específica³³.

Independente da origem de SGI-1, o possível mecanismo para criação das variações na resistência é por recombinação homóloga entre segmentos idênticos de DNA⁴⁵. O gene *floR* (responsável pela resistência a cloranfenicol/florfenicol) é relacionado ao gene de resistência ao cloranfenicol (*cmlA*) conhecido por estar localizado em um plasmídeo conjugativo de *Pseudomonas aeruginosa*. Além disso, esse gene contém um conteúdo diferente de G+C do que aquele no cromossomo de *Salmonella*, indicando que eles podem ter sido adquiridos horizontalmente⁵⁰.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste artigo de revisão, destacamos os principais avanços no conhecimento das ilhas de patogenicidade das salmonelas (SPI) nos últimos vinte anos. A análise criteriosa dos dados disponíveis sugere que as SPI são requeridas, individualmente ou de forma sinérgica, para a colonização de órgãos humanos e animais, por apresentarem importantes fatores de virulência na patogênese da doença. Não há consenso sobre o real papel ou a forma exata da participação das ilhas

de patogenicidade na patogênese das infecções por *Salmonella* spp. Estudos adicionais devem ser realizados com os antígenos das SPI, com o intuito de testar a sua capacidade de conferir proteção em modelo animal, no diagnóstico e como alvos para epidemiologia molecular durante a investigação de surtos.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro e pela concessão das bolsas de estudo aos três primeiros autores (T.P.F, M.Q.F, F.A.V.).

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. Health topics Salmonella. [Acesso 2011 ago 30]. Disponível em: [http://www.who.int/topics/salmonella/en/].
2. Food and Drug Administration (FDA). *Salmonella* spp. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook, 2009. [acesso 2011 ago 20]. Disponível em: [http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/ucm069966].
3. Eswarappa SM, Janice J, Nagarajan AG, Balasundaram SV, Karnam G, Dixit NM, et al. Differentially Evolved Genes of *Salmonella* Pathogenicity Islands: Insights into the Mechanism of Host Specificity in *Salmonella*. *PLoS ONE*. 2008;3:e3829.
4. Kuhle V, Hensel M. Cellular microbiology of intracellular *Salmonella enterica*: functions of the type III secretion system encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2. *Cell Molec Life Sci*. 2004;61(22):2812-26.
5. Fluit AC. Towards more virulent and antibiotic-resistant *Salmonella*? *FEMS Immun Med Microbiol*. 2005;43:1-11.
6. Amavisit P, Lightfoot D, Browning GF, Markham PF. Variation between pathogenic serovars within *Salmonella* Pathogenicity Islands. *J Bacteriol*. 2003;185(12):3624-35.
7. Rabsh WHL, Andrews RA, Kingsley RP, Prager R, Tschape H, Adams LG, et al. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and its host-adapted variants. *Infect Immun*. 2002;70:2249-55.
8. Mills DM, Bajaj V, Lee CA. A 40 kb chromosomal fragment encoding *Salmonella* Typhimurium invasion genes is absent from the corresponding region of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *Mol Microbiol*. 1995;15:749-59.
9. Shea JE, Hensel M, Gleeson C, Holden DW. Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella* Typhimurium. *PNAS*. 1996;93:2593-7.
10. Blanc-Potard AB, Solomon F, Kayser J, Groisman EA. The SPI-3 pathogenicity island of *Salmonella* Enterica. *J Bacteriol*. 1999;181:998-1004.
11. Gerlach RG, Jackel D, Stecher B, Wagner C, Lupas A. *Salmonella* Pathogenicity Island 4 encodes a giant non-fimbrial adhesion and the cognate type 1 secretion system. *Cell Microbiol*. 2007;9:1834-50.
12. Dobrindt U, Hochhut B, Hentschel U, Hacker J. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nature Rev Microbiol*. 2004;2:414-24.
13. Kubori T, Matsushima Y, Nakamura D, Uralil J, Lara TM, Sukhan A, et al. Supramolecular structure of the *Salmonella* Typhimurium type III protein secretion system. *Science*. 1998;280:602-5.
14. Dieye Y, Ameiss K, Mellata M, Curtis III R. The *Salmonella* Pathogenicity Island (SPI) 1 contributes more than SPI2 to the colonization of the chicken by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *BMC Microbiol*. 2009;9:3.
15. Hardt WD, Chen LM, Schuebel KE, Bustelo XR, Galan JE. *S. Typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. *Cell*. 1998;93:815-26.
16. Fu Y, Galan JE. A *Salmonella* protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion. *Nature*. 1999;401:293-7.
17. Hersh D, Monack DM, Smith MR, Ghori N, Falkow S, Zychlinsky A. The *Salmonella* invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *PNAS*. 1999;96:2396-401.
18. Norris FA, Wilson MP, Wallis TS, Galyov EE, Majerus PW. SopB, a protein required for virulence of *Salmonella* Dublin, is an inositol phosphate phosphatase. *PNAS*. 1998;95:14057-9.
19. Jones MA, Wood MW, Mullan PB, Watson PR, Wallis TS, Galyov EE. Secreted effector proteins of *Salmonella* Dublin act in concert to induce enteritis. *Infect Immun*. 1998;66:5799-804.
20. Rychlik I, Karasova D, Sebkova A, Volf J, Sisak F, Havlickova H, et al. Virulence potential of five major pathogenicity islands (SPI-1 to SPI-5) of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis for chickens. *BMC Microbiol*. 2009;9:268.
21. Jones MA, Wigley P, Page KL, Hulme SD, Barrow PA. *Salmonella enterica* Serovar Gallinarum Requires the *Salmonella* Pathogenicity Island 2 Type III Secretion System but Not the *Salmonella* Pathogenicity Island 1 Type III Secretion System for Virulence in Chickens. *Infect Immun*. 2001;69:5471-6.
22. Boyen F, Pasmans F, Immerseel FV, Morgan E, Adriaensen C, Hernalsteens J, et al. *Salmonella* Typhimurium SPI-1 genes promote intestinal but not tonsillar colonization in pigs. *Microb Infect*. 2006;8:2899-907.
23. Pavlova B, Volfi J, Ondrackova P, Matiasovic J, Stepanova H, Crhanova M, et al. SPI-1-encoded type III secretion system of *Salmonella enterica* is required for the suppression of porcine alveolar macrophage cytokine expression. *Vet Res*. 2011;42:16.
24. Coombes BK, Coburn BA, Potter AA, Gomis S, Mirakhor K, Li Y, Finlay BB. Analysis of the Contribution of *Salmonella* Pathogenicity Islands 1 and 2 to Enteric Disease Progression Using a Novel Bovine Ileal Loop Model and a Murine Model of Infectious Enterocolitis. *Infect Immun*. 2005;73:7161-9.
25. Silva-Herzog E, Detweiler CS. *Salmonella enterica* Replication in Hemophagocytic Macrophages Requires Two Type Three Secretion Systems. *Infect Immun*. 2010;78:3369-77.
26. Geddes K, Rubino S, Streutker C, Cho JH, Magalhães JG, Bourhis LL, et al. Nod1 and Nod2 Regulation of Inflammation in the *Salmonella* Colitis Model. *Infect Immun*. 2010;78:5107-15.
27. Aiastui A, Pucciarelli MG, Portillo FG. *Salmonella* Enterica Serovar Typhimurium Invades Fibroblasts by Multiple Routes Differing from the Entry into Epithelial Cells. *Infect Immun*. 2010;78:2700-13.

28. Crull K, Bumann D, Weiss S. Influence of infection route and virulence factors on colonization of solid tumors by *Salmonella* Enterica serovar Typhimurium. *FEMS Immun Med Microbiol*. 2011;62:75-83.
29. Pawelek JM, Sodi S, Chakraborty AK, Platt JT, Miller S, Holden DW, Hensel M, et al. *Salmonella* pathogenicity island-2 and anticancer activity in mice. *Cancer Gene Ther*. 2002;9:813-8.
30. Radtke AL, Wilson JW, Sarker S, Nickerson CA. Analysis of Interactions of *Salmonella* Type Three Secretion Mutants with 3-D Intestinal Epithelial Cells. *PLoS ONE*. 2010;5:e15750.
31. Durant JA, Corrier DE, Ricke SC. Short-chain volatile fatty acids modulate the expression of the hilA and invF genes of *Salmonella* Typhimurium. *J Food Protect*. 2000;3:573-8.
32. Saini S, Ellermeier JR, Schlauch JM, Rao CV. The Role of Coupled Positive Feedback in the Expression of the SPI1 Type Three Secretion System in *Salmonella*. *PLoS Path*. 2010;6:e1001025.
33. Hensel M. Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. *Int J Med Microbiol*. 2004;294:95-102.
34. Ochman H, Soncini FC, Solomon F, Groisman EA. Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. *PNAS*. 1996;93:7800-4.
35. Vazquez-Torres A, Xu Y, Jones-Carson J, Holden DH, Lucia SM, Dinauer MC, et al. *Salmonella* pathogenicity island 2-dependent evasion of the phagocyte NADPH oxidase. *Science*. 2000;287:1655-8.
36. Chakravorty D, Hansen-Wester I, Hensel M. *Salmonella* pathogenicity island 2 mediates protection of intracellular *Salmonella* from reactive nitrogen intermediates. *J Exp Med*. 2002;195:1155-66.
37. Uchiya K, Barbieri MA, Funato K, Shah AH, Stahl PD, Groisman EA. A *Salmonella* virulence protein that inhibits cellular trafficking. *EMBO J*. 1999;18:3924-33.
38. Karasova D, Sebkova A, Havlickova H, Sisak F, Volf J, Faldyna M, et al. Influence of 5 major *Salmonella* pathogenicity islands on NK cell depletion in mice infected with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *BMC Microbiol*. 2010;10:75.
39. Choi J, Shin D, Yoon H, Kim J, Lee C, Kim M, et al. *Salmonella* pathogenicity island 2 expression negatively controlled by EIIANtr-SsrB interaction is required for *Salmonella* virulence. *Proc Nat Acad*. 2010;107:20506-11.
40. Miao EA, Miller SI. A conserved amino acid sequence directing intracellular type III secretion by *Salmonella* Typhimurium. *PNAS*. 2000;97:7539-44.
41. Figueroa-Bossi N, Uzzau S, Maloriol D, Bossi L. Variable assortment of prophages provides a transferable repertoire of pathogenic determinants in *Salmonella*. *Mol Microbiol*. 2001;39:260-71.
42. Garcia-del Portillo F, Foster JW, Maguire ME, Finlay BB. Characterization of the micro-environment of *Salmonella* Typhimurium-containing vacuoles within MDCK epithelial cells. *Mol Microbiol*. 1992;6:3289-97.
43. Snavelly MD, Miller CG, Maguire ME. The mgtB Mg²⁺transport locus of *Salmonella* Typhimurium encodes a P-type ATPase. *J Biol Chem*. 1991;266:815-23.
44. Retamal P, Castillo-Ruiz M, Villagra NA, Morgado J, Mora GC. Modified Intracellular-Associated Phenotypes in a Recombinant *Salmonella* Typhi Expressing S. Typhimurium SPI-3 Sequences. *PLoS ONE*. 2010;5:e9394.
45. Morgan E. *Salmonella* Pathogenicity Islands. In: Rhen M, Maskell D, Mastroeni P, Threlfall J. *Salmonella* Molecular Biology and Pathogenesis. Horizon Bioscience; 2007; 67-87.
46. Marcus SL, Brummel JH, Pfeifer CG, Finlay BB. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microb Infect*. 2000;2:145-56.
47. Wagner C, Polke M, Gerlach RG, Linke D, Stierhof Y, Schwarz H, et al. Functional dissection of SiiE, a giant non-fimbrial adhesion of *Salmonella enterica*. *Cell Microbiol*. 2011;13:1286-301.
48. Schmidt H, Hensel M. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin Microbiol Rev*. 2004;17(1):14-56.
49. Pickard D, Wain J, Baker S, Line A, Chohan S, Fookes M, et al. Composition, Acquisition, and Distribution of the Vi Exopolysaccharide-Encoding *Salmonella enterica* Pathogenicity Island SPI7. *J Bacteriol*. 2003;185(17):5055-65.
50. Mulvey MR, Boyd DA, Olson BD, Cloeckert A. The genetics of *Salmonella* genomic island 1. *Microb Infect*. 2006;8:1915-22.

Caracterização dos surtos causados pelo grupo *Mycobacterium abscessus*

Characterization of the outbreaks caused by the *Mycobacterium abscessus* group

RIALA6/1459

Natalia Fernandes Garcia de CARVALHO¹, Lucilaine FERRAZOLI¹, Maria Beatriz Acosta RIVERON², Erica CHIMARA^{1*}

*Endereço para correspondência: ¹Núcleo de Tuberculose e Micobacterioses, Centro de Bacteriologia, Instituto Adolfo Lutz. Av. Dr. Arnaldo, 351, 9º andar, Cerqueira Cesar, São Paulo, SP, CEP 01246-902. E-mail: erchimara@yahoo.com.br

²Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo, SP, Brasil

Recebido: 01.03.2012- Aceito para publicação: 19.06.2012

RESUMO

O gênero *Mycobacterium* contempla espécies do complexo *M. tuberculosis* e as denominadas micobactérias não tuberculosas (MNT). As micobactérias, quando em contato com o homem e alguns animais, podem causar doenças por meio de quebra da barreira do hospedeiro. Em virtude de sua natureza ambiental e muitas vezes oportunista, as micobactérias de crescimento rápido podem causar infecções nosocomiais, e com maior frequência pela espécie *Mycobacterium abscessus*. O *M. abscessus* causa diversos tipos de infecções teciduais e é altamente resistente à maioria dos quimioterápicos. Foi realizada uma revisão da literatura sobre os surtos de ocorrência nacional e internacional, com o objetivo de averiguar as principais causas que facilitaram a sua proliferação. Em 28 publicações, foram descritas as características das MNT e 15 trabalhos foram referentes ao relato de surtos, dos quais três nacionais associados aos procedimentos clínicos invasivos e 12 internacionais, correlacionados aos procedimentos médicos não invasivos. Todos os artigos relataram a frequente ocorrência de práticas inadequadas de limpeza, de procedimentos e de desinfecção. Estes fatos mostram a necessidade de sistema de qualidade mais eficiente e de estudos adicionais sobre a natureza do agente patogênico para tomada de medidas profiláticas mais efetivas.

Palavras-chave. micobactéria de crescimento rápido, *Mycobacterium abscessus*, surtos.

ABSTRACT

Mycobacterium genus comprises the species of the *M. tuberculosis* complex and those called as nontuberculous mycobacteria (NTM). When humans and some animals come into contact with mycobacteria, these microorganisms might cause severe pathogenic infections by breaking the host barrier. Due to their environmental nature and frequently as opportunistic infection, the rapid growing mycobacteria have been related to nosocomial infections, and *M. abscessus* has been one of the mostly frequent species. This microorganism may cause many types of tissue infections and it has been highly resistant to the majority of chemotherapeutic agents. A literature review on international and national outbreaks caused by this pathogen was performed to search the foremost causes which facilitate its proliferation. Twenty-eight publications described the NTM characteristics. The NTM outbreaks were reported in 15 articles, being three of them national studies which were related to invasive medical procedures, and 12 were international investigations linked to noninvasive procedures. All of the papers reported the occurrence of inadequate cleaning practices and disinfection procedures, indicating that a highly efficient quality system are needed, and also the further studies on the pathogen nature for carrying on the more effective preventive measures.

Keywords. rapid growing mycobacteria, *Mycobacterium abscessus*, outbreaks.

INTRODUÇÃO

O gênero *Mycobacterium* contempla espécies do complexo *M. tuberculosis* e as denominadas Micobactérias Não Tuberculosas (MNT). Este último grupo é constituído por micro-organismos saprófitos presentes no solo, água e poeira e são capazes de sobreviver a condições extremas de nutrientes, pH e temperatura pela formação de biofilmes¹⁻⁴.

As MNTs podem ser classificadas de acordo com o tempo de crescimento em Micobactérias de Crescimento Lento (MCL), que formam colônias visíveis em meio sólido após sete dias e em Micobactérias de Crescimento Rápido (MCR), que apresentam colônias visíveis em meio sólido de três a sete dias⁵.

As micobactérias, quando em contato com o homem e alguns animais, podem causar doenças (micobacterioses) de significante patogenicidade. Geralmente, as micobacterioses ocorrem em hospedeiros com alterações na defesa imune. Essas alterações podem ser danos à barreira da mucosa ou pele, doenças pulmonares de base ou imunossupressão causada pelo HIV, câncer ou drogas utilizadas em diversos tratamentos^{4,6,7}.

Esses organismos normalmente causam doença de pele, linfadenite, doença pulmonar e doença disseminada em indivíduos gravemente imunocomprometidos^{4,8,9}. O sucesso do tratamento das micobacterioses causadas por MCRs depende da identificação da espécie, pois estas possuem diferentes padrões de suscetibilidade aos antimicrobianos. As MCRs são naturalmente resistentes aos fármacos convencionais para o tratamento da tuberculose (isoniazida, rifampicina, etambutol e pirazinamida), incluindo tetraciclinas, fluoroquinolonas e sulfonamidas e testes de sensibilidade a fármacos *in vitro* podem não refletir completamente seus efeitos *in vivo*, que depende do sítio ou local da infecção e condição ou vulnerabilidade imunológica do hospedeiro².

Mycobacterium abscessus

M. abscessus é uma MCR acromógena e apresenta colônias com morfologia rugosa a lisa¹⁰. Historicamente, era considerada como subespécie de *M. chelonae* ou ainda considerada parte do complexo *Mycobacterium fortuitum*. Desde 1993, é possível distinguir essa espécie por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida de restrição enzimática do gene *hsp65*, com sequências conservadas entre as espécies¹¹. Recentemente, *M. abscessus* foi dividida

em três subespécies: *M. abscessus sensu stricto*, *M. massiliense* e *M. bolletii*^{4,12,13}. Entretanto, Leão e col.¹⁴, pela técnica de homologia DNA-DNA, verificaram que *M. massiliense* e *M. bolletii* são geneticamente idênticas, sugerindo a junção das espécies em uma subespécie, *M. abscessus* subespécie *bolletii*. Atualmente, esta espécie é dividida em duas subespécies: *M. abscessus* subespécie *abscessus* e *M. abscessus* subespécie *bolletii*^{4,14}. Este grupo causa diversos tipos de infecções teciduais, sendo as infecções cutâneas e infecções pulmonares as mais comuns, principalmente em crianças, pacientes imunocomprometidos e pacientes com doenças pulmonares crônicas^{4,8,15-20}.

M. abscessus é muito resistente, tanto *in vivo* como *in vitro*, à maioria dos agentes quimioterápicos. No tratamento das infecções causadas por este patógeno, é necessária a remoção do tecido lesionado, necrosado e também a remoção de corpos estranhos como próteses de silicone e outros materiais. Em pacientes com infecções pulmonares, as cirurgias podem ter papel importante na cura, se for possível realizá-las⁸. Esta espécie é naturalmente sensível à claritromicina, azitromicina e amicacina, sendo esta última a mais importante no tratamento, devendo ser combinada com a administração de outros fármacos⁹. Pode ocorrer, raramente, resistência à claritromicina, especialmente em casos de monoterapia⁸.

Tendo em vista a virulência e patogenicidade do *M. abscessus* e sua alta resistência a agentes antimicrobianos, como antibióticos e desinfetantes, o objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão de literatura e descrição sobre os surtos internacionais e nacionais causados por *M. abscessus* para identificar as principais causas que facilitaram a sua proliferação.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizada uma revisão bibliográfica de publicações nacionais e internacionais sobre o tema deste trabalho por meio de cruzamento de descritores previamente selecionados: *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium abscessus* e surto (“outbreak”), *Mycobacterium abscessus* e características microbiológicas, *Mycobacterium abscessus* e nomenclatura. Em virtude da mudança de taxonomia ao longo do tempo, os descritores *Mycobacterium massiliense* e *Mycobacterium bolletii* foram pesquisados e observou-se que os resultados obtidos com estes descritores estavam incluídos quando a pesquisa foi realizada com o descritor *Mycobacterium abscessus*. Esta

verificação foi necessária para que fosse evitada a perda de artigos que relatassem surtos com a nomenclatura anterior. Foram consultadas as bases informativas PubMed e Google Acadêmico, não utilizando qualquer tipo de filtro para determinação do período. Os artigos foram inicialmente selecionados pelos títulos e resumos e somente os artigos com as descrições dos surtos e identificação dos agentes foram selecionados.

Os artigos que relataram a ocorrência de surtos devido a *M. abscessus* e aqueles que apresentaram as características clínicas e microbiológicas desta espécie foram lidos na íntegra para obtenção das seguintes informações: sítio de infecção, procedimentos realizados, equipamentos utilizados, técnicas empregadas na identificação e possível fonte de infecção.

RESULTADOS

A revisão bibliográfica utilizou as bases informativas PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) e Google Acadêmico (<http://scholar.google.com.br/>), obtendo 44 artigos. Após a leitura de cada artigo, as informações foram tabuladas de acordo com as características comuns entre os relatos de surtos (Tabela 1).

Surtos Internacionais

Surtos pós-injeções

Villanueva et al.²¹ reportaram um surto causado por *M. abscessus* pós-injeção na cidade de Barranquilla, Colômbia. Um médico que praticava medicina alternativa notou que seus pacientes apresentavam lesões nodulares e abscessos cutâneos pós-injeção subcutânea ou intramuscular de lidocaína 2% e outros analgésicos. As lesões foram diagnosticadas com presença de MCR. Foi

Tabela 1. Comparação entre os artigos com descrição de surtos de *M. abscessus*, mostrando as principais características dos surtos

Autor	Sítio de infecção	Procedimento	Equipamentos	Técnicas de identificação	Fonte de infecção
Internacionais					
Wenger et al. ²⁹	Pé	Podologia	Não se aplica	Bioquímico	Água destilada
Maloney et al. ³¹	Tecido	Broncoscopia e gastroendoscopia	Endoscópios e lavadora automática	Bioquímico	Água
Villanueva et al. ²¹	Tecido mole	Injeção	Seringa	TSA PFGE	Água de torneira sabonete
Galil et al. ²²	Tecido mole	Injeção	Seringa	Cromatografia e fluorescência	ECA
Zhibang et al. ²³	Tecido mole	Injeção	Seringa	Bioquímicos	Penicilina
Tiwari et al. ²⁴	Tecido mole e articulações	Injeção	Seringa	Cultura	Cloreto benzalcônio
Song et al. ²⁷	Tecido mole	Acupuntura	agulhas, bolsas de água quente, toalhas, camas	Cultura, bioquímico e molecular	Agulha
Toy e Frank ²⁵	tecido mole	Injeção	Seringa	BAAR e molecular	Hyacell
Furuya et al. ³²	tecido mole	Abdominoplastia	Não descrito	BAAR e microscopia fluorescente	Não descrito
Yuan et al. ²⁶	tecido mole	Injeção	Seringa	BAAR, bioquímicos	Solução fisiológica
Nakanaga et al. ³⁰	tecido mole	Limpeza	Equipamentos de limpeza	Bioquímico e molecular	Não identificado
Koh et al. ²⁸	tecido mole	Acupuntura	Agulhas	Cultura	Glutaraldeído a 2%
Nacionais					
Viana-Niero et al. ³³	tecido mole	Laparoscopia e mesoterapia	Equipamento de vídeo-cirurgia	Bioquímico e molecular	Glutaraldeído a 2%
Cardoso et al. ³⁴	tecido mole	artroscopia e laparoscopia	Equipamento de vídeo-cirurgia	Bioquímico e molecular	Glutaraldeído a 2%
Duarte et al. ¹⁸	tecido mole	colecistectomia e vídeo-assistidos	Equipamento de vídeo-cirurgia	Bioquímico e molecular	Glutaraldeído a 2%
Leão et al. ¹⁴	tecido mole	artroscopia e laparoscopia	Equipamento de vídeo-cirurgia	Molecular	Glutaraldeído a 2%

verificado que, no período do surto (novembro de 1992 a março de 1993), 2.000 pacientes haviam recebido injeções, dentre os quais 350 apresentavam lesões semelhantes. Foram coletadas amostras de seringas usadas, do chão, de vários utensílios de pia, da pia e da água de torneira do escritório médico, sendo todas culturas negativas. Apesar de as culturas de amostras do escritório não apresentarem crescimento, os investigadores sugeriram que a água da torneira e o sabonete, usados na limpeza das seringas reutilizáveis, poderiam ter sido fontes de contaminação e transmissão da infecção.

Galil et al.²² reportaram um surto causado por *M. abscessus* associado ao uso de produto injetável contendo extrato de córtex adrenal (ECA), utilizado na medicina alternativa para tratamento da doença de Addison. Foram identificadas 140 pessoas, pelas autoridades de vigilância de alguns estados dos Estados Unidos, que receberam injeção contendo ECA no período de janeiro de 1995 a agosto de 1996, 87 apresentaram abscessos nos locais de aplicação das injeções. As culturas de amostras clínicas e de sete frascos do produto (seis fechados) apresentaram cultura positiva para *M. abscessus*. A análise por PFGE e o teste de sensibilidade mostraram perfil idêntico entre os isolados clínicos e os isolados de ECA. A produção deste produto e a utilização de água destilada foram as prováveis fontes de contaminação. A empresa responsável pela produção de ECA não tinha permissão legal e rotulava os frascos com nomes de empresas farmacêuticas não existentes.

Zhibang et al.²³ reportaram um surto causado por *M. chelonae* subsp. *abscessus* pós-injeção de penicilina entre janeiro de 1997 a julho de 1998 na China. De 850 pacientes que haviam recebido injeções de penicilina, 86 apresentaram infecções nos locais das aplicações. Os testes bioquímicos identificaram todas as amostras clínicas, uma amostra de penicilina e uma amostra do chão como *M. chelonae* subsp. *abscessus*. Os isolados clínicos apresentavam o mesmo perfil que o isolado de penicilina e do chão quando comparados os perfis de proteínas e de plasmídeos. Os autores relataram que a fonte do surto foi confirmada ao observarem que o local de armazenamento das drogas era úmido e os pacotes dos frascos estavam danificados, conseqüentemente contaminando os mesmos.

Tiwari et al.²⁴ relataram um surto causado por *M. abscessus* devido a contaminação do desinfetante cloreto de benzalcônio, no Estado do Texas, Estados Unidos. Em julho de 1999, um médico reportou infecções articulares

e de tecido mole causadas por *M. chelonae*/*M. abscessus* em seis pacientes. Estes pacientes frequentavam a mesma clínica para tratamento de artralgia, artrite ou esporões do calcâneo por injeção de esteróides intra ou periarticular. Amostras de spray de cloreto de etila, do cloridrato de lidocaína, do cloreto de benzalcônio não diluído e diluído, das preparações de iodo, de água destilada usada para a diluição do cloreto de benzalcônio e da água de torneira das salas foram coletadas. Foram encontrados 58 pacientes submetidos a injeções, dos quais 10 apresentaram cultura positiva para *M. abscessus*. Quatro amostras ambientais foram positivas para *M. abscessus*, sendo ligadas aos preparativos do cloreto de benzalcônio. Em cada sala de procedimento, pelo menos uma amostra revelou cultura positiva. A confirmação do surto foi determinada pelo perfil idêntico das dez amostras clínicas e das quatro amostras ambientais pela técnica RAPD-PCR. A fonte do surto não foi determinada, já que amostras da água destilada e do cloreto de benzalcônio concentrado apresentaram cultura negativa.

Toy e Frank²⁵ reportaram a ocorrência de um surto causado por *M. abscessus* após aplicação de botox na cidade de Nova York, Estados Unidos. Os autores relatam que, em 30 de junho de 2002, o Departamento da Saúde da cidade de Nova York emitiu um alerta sobre um grupo genético de infecções por *M. abscessus* pós-injeção com finalidade cosmética. Os casos envolvidos eram de mulheres hispânicas, com idade entre 31 a 65 anos, que haviam feito o procedimento com uma mesma médica venezuelana. O primeiro caso envolveu uma mulher mexicana de 41 anos, que apresentou múltiplos nódulos doloridos ao redor das bochechas e mandíbula. A cultura para micobactérias identificou *M. abscessus*, sensível a claritromicina. Um agente tecidual chamado Hyacell, um ácido hialurônico, foi confiscado e possivelmente trazido ilegalmente da Venezuela. O Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Estados Unidos, concluiu que esta foi a substância envolvida no surto. O produto era descrito como contendo ácido hialurônico, zinco, selênio, vanádio e um inespecífico extrato embrionário.

Yuan et al.²⁶ reportaram a investigação em clínicas rurais na província de Guangdong, China, com ocorrência de aumento de abscessos formados pós-injeção de medicamentos em junho de 2006. O teste BAAR foi positivo para quatro de cinco biópsias de abscessos e foi realizada uma revisão dos prontuários dos pacientes, revelando que estes pacientes haviam recebido injeções de Cefradina, Ribavirina, Ribostamicina e

Dexametasona. Foram identificados 35 casos de 184 pacientes, todos de uma única clínica, que haviam recebido injeções intramusculares. Os agentes isolados foram identificados como *M. abscessus* resistente à Isoniazida, Rifampicina, ácido p-aminossalicílico, Levofloxacina e Capreomicina. Dentre as amostras ambientais coletadas, somente a amostra de água de abastecimento revelou *M. abscessus*, sendo que nunca foi tratada com cloro ou outro desinfetante. Em junho de 2006, a enfermeira responsável pelas injeções, passou a usar garrafas de dose múltipla (100 mL) de solução fisiológica para diluir as drogas Cefradina e Ribostamicina. Rotineiramente, deixava uma agulha de calibre 16 inserida no septo do frasco e, ao preparar uma injeção, retirava a seringa, colocava-a sobre a mesa e anexava uma segunda seringa para retirar a quantidade que necessitava de solução fisiológica. Esta segunda seringa também era usada para aspirar o fármaco e aplicar no paciente. Os autores concluíram que o surto causado por *M. abscessus* ocorreu devido a uma prática de injeção de risco, especificamente a reutilização de seringas do frasco de dose múltipla de solução fisiológica, resultando na contaminação de preparações de drogas.

Surtos relacionados com acupuntura

Song et al.²⁷ reportaram um surto causado por *M. abscessus* associado a acupuntura em uma clínica na Coreia do Sul. De agosto a novembro de 2001, 40 casos foram identificados pelo médico da clínica, que notou lesões nodulares nos locais de aplicação de acupuntura em diversos pacientes. Os isolados clínicos foram identificados como *M. abscessus*, entretanto, as amostras ambientais coletadas foram negativas para micobactérias, mas positivas para outros patógenos. A explicação dada para as culturas negativas das amostras ambientais foi a mudança de esterilização dos materiais utilizados, sugerindo que estes eram possivelmente a fonte do surto. Os autores concluíram que a contaminação dos pacientes pode ter sido pelas agulhas no processo da acupuntura.

Koh et al.²⁸ relataram um surto causado por *M. abscessus* na República da Coreia em 2008. Os aparelhos utilizados durante as sessões de acupuntura em uma clínica eram desinfetados em submersão com uma solução diluída de glutaraldeído, preparada com água de torneira, durante a noite toda. Na manhã seguinte, esta solução era descartada. De todos os pacientes informados, 109 desenvolveram lesões de pele compatíveis com infecção por *M. abscessus* nos locais de aplicação de acupuntura,

mas somente 31 tiveram isolamento do agente. Das amostras ambientais coletadas, *M. abscessus* foi isolado de nove, sendo elas da solução de glutaraldeído, eletrodos, macas, pia e de um pote de água encontrado nas salas de aplicações. Os isolados apresentaram perfil molecular idêntico pela técnica de PCR e PFGE e apresentaram mesmo perfil de suscetibilidade aos fármacos. A investigação concluiu que a fonte do surto foi a solução diluída de glutaraldeído, contaminada com *M. abscessus*, que contaminou os eletrodos durante as lavagens de desinfecção. Todos os outros materiais que entraram em contato com estes eletrodos também foram contaminados.

Surtos relacionados com estética

Wenger et al.²⁹ reportaram um surto causado por *M. chelonae* subsp. *abscessus* envolvendo pacientes submetidos a procedimentos de podologia no período de fevereiro a abril de 1988. Oito pacientes foram hospitalizados com infecções causadas por *M. chelonae* subsp. *abscessus* no pé, sendo que todos haviam frequentado a mesma clínica. *M. chelonae* subsp. *abscessus* foi isolado de material clínico e da água destilada. Além disso, foi realizado o teste de sensibilidade ao desinfetante utilizado na clínica, revelando que os isolados clínicos e o da água destilada apresentavam o mesmo perfil de resistência, apontando esta como fonte do surto. Os autores acreditam que a contaminação do galão de água destilada, utilizada na limpeza dos injetores, pode ter ocorrido por acondicionamento inadequado ou por reuso do mesmo com água da torneira.

Nakanaga et al.³⁰ investigaram um surto causado por *M. massiliense* relacionado com “hot spa” no Japão. Sete trabalhadores deste estabelecimento apresentaram em seu braço e antebraço múltiplos nódulos no período de novembro de 2007 a outubro de 2008. A análise por testes bioquímicos e moleculares identificaram nos isolados clínicos e uma amostra da parte inferior de uma das camas, *M. abscessus* e posteriormente foi identificado como *M. massiliense* pelo sequenciamento do gene *rpoB*. Os isolados foram comparados utilizando a técnica RAPD-PCR, evidenciando que apenas uma amostra clínica apresentava perfil idêntico à amostra da cama. Este é o primeiro caso de infecções por *M. massiliense* cutânea não associada a procedimentos médicos invasivos no Japão.

Surtos pós-procedimentos invasivos

Maloney et al.³¹ investigaram a fonte de um surto relacionado com lavadora automática de endoscópios

utilizados em broncoscopia e gastroendoscopia. *M. abscessus* foi isolado em 18 espécimes de 16 pacientes, em uma amostra de um broncoscópico e diversas amostras dos tanques de lavagens e da água utilizada na lavagem automática. Apesar dos isolados clínicos apresentarem culturas positivas, os pacientes não apresentavam infecções, indicando pseudoinfecções. Os autores explicam que isso acontece devido à limpeza ou desinfecção inadequada dos endoscópios, que possuem uma complexa engenharia, ou por contaminação de lavadoras automáticas. A utilização de água de torneira durante as lavagens também poderia resultar na contaminação.

Furuya et al.³² relataram um surto causado por *M. abscessus* envolvendo pacientes norte-americanos, que foram para a República Dominicana realizar abdominoplastia. Foram realizados esfregaços dos espécimes corados com Auramina e, após o isolamento das cepas, foram realizados teste de sensibilidade pelo método de MIC e caracterização molecular por PFGE e por elementos repetitivos de PCR. Vinte casos confirmados foram identificados, dos quais todas eram mulheres com feridas pós-abdominoplastia. Dez delas também foram submetidas a cirurgia de mama, e oito, a lipoaspiração. Das mulheres que foram submetidas a cirurgia de mama, seis desenvolveram infecção de mama, sendo que duas mulheres tiveram que retirar os implantes. De 19 entrevistadas, nove reportaram que suas cirurgias foram realizadas em uma mesma clínica em Santo Domingo. Oito isolados recuperados dessas nove pacientes possuíam o mesmo perfil por tipagem molecular.

Surtos nacionais

Viana-Niero et al.³³ analisaram a caracterização molecular de *M. massiliense* e *M. bolletii* isolados de um surto relacionado com infecções pós-laparoscopia e procedimentos cosméticos. De fevereiro de 2004 a junho de 2005, 311 pacientes, submetidos a diferentes procedimentos invasivos realizados em 16 hospitais particulares e clínicas na cidade de Belém no Pará, apresentaram sinais e sintomas de infecções localizadas. A identificação revelou o grupo *M. abscessus/M. massiliense/M. bolletii*. Os isolados de procedimentos invasivos apresentaram perfil idêntico pela técnica de PFGE, enquanto os isolados de mesoterapia apresentaram três perfis distintos. A fonte da infecção não foi determinada, já que os pacientes foram operados por diferentes cirurgiões, que utilizaram seus

próprios equipamentos laparoscópicos desinfetados com imersão de glutaraldeído a 2% entre as cirurgias. A hipótese levantada foi que incoerências nas limpezas de equipamentos, as concentrações de glutaraldeído ou o tempo de contato podem ter contribuído para seleção de *M. massiliense*, contaminando os equipamentos cirúrgicos.

Cardoso et al.³⁴ reportaram um surto causado por *M. massiliense* pós-cirurgias de artroscopia e laparoscopia na cidade de Goiânia no período de agosto de 2005 a julho de 2007. Neste período, cerca de 4.480 laparoscopias e artroscopias foram realizadas e 121 casos com infecções causadas por MNT foram notificados pelo sistema público de vigilância sanitária. Do total de casos notificados, somente para 18 cepas foram realizados testes bioquímicos e moleculares de identificação, revelando a presença de *M. abscessus*. A análise dos isolados deste episódio e de uma cepa de *M. massiliense* do surto da cidade de Belém (PA) por PFGE mostrou perfis idênticos. O sequenciamento do gene *rpoB* foi realizado, identificando os isolados como *M. massiliense* e com 100% de similaridade com o clone de Belém (PA). Não foi possível investigar as condições ambientais dos hospitais. Entretanto, os autores apontam as técnicas de assepsias como possível causa deste surto, uma vez que os isolados de *M. massiliense*, procedentes do surto da cidade de Belém, apresentaram tolerância à solução de glutaraldeído a 2%, utilizado na limpeza de equipamentos de videocirurgias.

Duarte et al.¹⁸ estudaram a epidemia de infecções pós-cirurgias causadas por *M. massiliense* na cidade do Rio de Janeiro. De agosto de 2006 a julho de 2007, 172 casos confirmados de infecções por micobactéria foram reportados, mas apenas 148 foram identificadas, com padrão de PRA-*hsp65* compatível com *M. massiliense* e *M. bolletii*. O sequenciamento do gene *rpoB* dos isolados mostrou sequências idênticas, com maior similaridade (99,71%) a *M. massiliense*. Apresentavam, também, perfil idêntico no PFGE e perfil idêntico a isolados de outros recentes surtos. Os autores reportaram a alta frequência de um único clone de *M. massiliense* causador deste surto, sendo tolerante à solução de glutaraldeído a 2%, contribuindo para a ocorrência da epidemia.

Leão et al.¹⁴ analisaram 152 cepas identificadas como *M. abscessus* subsp. *massiliense* provenientes de surtos relacionados com procedimentos médicos invasivos, que ocorreram em setes estados brasileiros no período de 2004 a 2008. O sequenciamento do gene *rpoB* confirmou a presença da espécie *M. abscessus* subsp.

massiliense e mostrou 100% de similaridade com a cepa INCQS 594, identificada no surto do Pará. Além disso, a análise dos isolados pelo PFGE revelou perfil idêntico. Os autores concluíram que uma cepa particular de *M. abscessus* subsp. *massiliense* está associada com uma prolongada epidemia de infecções pós-cirurgias em sete estados brasileiros, sugerindo que esta cepa pode estar distribuída no território brasileiro e que está adaptada, já que sua tolerância a glutaraldeído a 2% foi demonstrada. Outro fator que pode ter contribuído para sua dispersão é o uso e o transporte de equipamentos dos próprios médicos.

DISCUSSÃO

Após a descrição do primeiro caso de doença por *M. abscessus* em 1953³⁵, diversos surtos causados por estes agentes foram descritos e até o presente momento, continuam ocorrendo. Neste trabalho, foram encontrados 15 artigos que reportaram surtos causados por este grupo, relacionados com diferentes procedimentos médicos, 12 internacionais e quatro nacionais. Além disso, foram encontradas 28 publicações que estudaram as diversas características das MNT, evidenciando a importância e a necessidade de se estudar estes organismos.

Podemos observar que ao classificar os surtos em internacionais e nacionais, estes estão relacionados com procedimentos médicos distintos. Dos 12 surtos internacionais, 11 estão relacionados com os procedimentos médicos não invasivos, como acupuntura e aplicações de diversas substâncias, sendo a fonte de infecção mais comum a utilização de água de abastecimento para limpeza dos equipamentos. Song et al.²⁷ encontraram estes mesmos problemas ao estudarem um surto, ocorrido na Coreia, enfatizando as deficiências nos procedimentos de esterilização e boas práticas. Já os surtos nacionais tratam de infecções nosocomiais relacionadas com procedimentos médicos invasivos, sendo a principal fonte de infecção a utilização de desinfetantes ineficientes contra as micobactérias na desinfecção dos equipamentos utilizados. Apesar das fontes de infecções serem diferentes, podemos observar que elas refletem as características destas bactérias, como o modo de vida aquático e a resistência a diferentes agentes antimicrobianos. Isto se deve à impermeabilidade conferida por seu envelope celular e também pela formação de biofilme, evidenciando a adaptação destes organismos a diversas condições ambientais^{1, 2, 3, 4, 12}.

As diferenças detectadas sobre os tipos de procedimentos envolvidos nos surtos podem estar relacionadas com as legislações de cada país com relação ao uso e desinfecção de equipamentos e insumos. No Brasil, somente após a ocorrência dos surtos em diversos estados e a comprovação de que a cepa causadora era resistente ao desinfetante utilizado, a Anvisa publicou a resolução RDC nº 8, de 27 de fevereiro de 2009³⁶, a qual proíbe a esterilização química por imersão, utilizando agentes esterilizantes líquidos, como o uso do glutaraldeído na desinfecção de equipamentos cirúrgicos, de diagnósticos por videoscopias, de sistema vascular e outras cirurgias invasivas. Além disso, cada etapa de processamento do instrumental cirúrgico e dos produtos para saúde deve seguir um procedimento operacional padrão (POP), do qual todos os funcionários devem ser treinados e avaliados quanto à eficácia do treinamento. Cabe ainda ao responsável pelo Centro de Material e Esterilização (CME) do hospital ou clínica supervisionar todas as etapas de processamento dos artigos, mesmo que o serviço seja terceirizado.

Outro ponto em comum entre os surtos descritos foram os procedimentos realizados de forma a infringir as boas práticas, como utilizar desinfetantes fora da data de validade, não realizar a inspeção nos equipamentos para detectar sujidades após a lavagem, reuso de materiais descartáveis, entre outros. Em muitos casos, os surtos foram solucionados quando práticas adequadas de higiene e desinfecção foram aplicadas.

Esta análise mostrou a deficiência no controle dos processos que, se fossem mais rígidos, poderiam ter evitado muitos casos. O emprego de um sistema de garantia da qualidade pode auxiliar clínicas e hospitais a controlarem os procedimentos e rastreamos possíveis falhas, possibilitando a rápida detecção e solução do problema.

CONCLUSÃO

Os trabalhos analisados mostram a importância dos estudos da ocorrência dos surtos, não somente para estabelecer a causa, mas também para orientar medidas de controle e prevenção. Ainda existe a necessidade de mais estudos na área para melhor compreendermos estes patógenos, o que poderá gerar medidas de profilaxia e de tratamento, garantindo qualidade nas práticas dos profissionais.

REFERÊNCIAS

1. Primm TP, Lucero CA, Falkinham JO. Health impacts of environmental mycobacteria. Clin Microbiol Reviews. 2004;17:98-106.
2. Groote MAD, Huitt G. Infections Due to Rapidly Growing Mycobacteria. Clin Infect Dis. 2006;42:1756-63.
3. Falkinham JO. Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment. J Appl Microbiol. 2009;107(2):356-67.
4. Medjahed H, Gaillard J, Reytrat J. *Mycobacterium abscessus*: a new player in the mycobacterial field. Trends Microbiol. 2010;18(3):117-23.
5. Runyon EH. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. Med Clin North America. 1959;43:273-90.
6. Tortoli E. Clinical manifestation of nontuberculous mycobacteria infections. Clin Microbiol Infect Dis. 2009;15:906-10.
7. Jarzembowski JA, Young MB. Nontuberculous Mycobacterial Infections. Arch Pathol Lab Med. 2008;132:1333-41.
8. Wongkitisophon P, Rattanakaemakon P, Tanrattanakorn S, Vachiramon V. Cutaneous *Mycobacterium abscessus* infection associated with mesotherapy injection. Case Reports in Dermatology. 2011;3:37-41.
9. Gayathri R, Lily TK, Deepa P, Mangal S, Madhavan HN. Antibiotic susceptibility pattern of rapidly growing mycobacteria. J Post Med. 2010;56(2):76-8.
10. Catherinot E, Clarissou J, Etienne G, Ripoll JF, Daffé M, Perronne C, et al. Hypervirulence of a rough variant of the *Mycobacterium abscessus* type strain. Infect Immun. 2007;75(2):1055-8.
11. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Bottger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. J Clin Microbiol. 1993;31:175-8.
12. Adékambi T, Reynaud – Gaubert M, Greub G, Gevaudan MJ, La Scola B, Raoult D, et al. Amoebal coculture of “*Mycobacterium massiliense*” sp. Nov. from the sputum of a patient with hemoptoic pneumonia. J Clin Microbiol. 2004;42(12):5493-501.
13. Ingen J van, Zwaan R, Dekhuijzen RPN, Boeree MJ, Soolingen D van. Clinical relevance of *Mycobacterium chelonae* – *abscessus* group isolation in 95 patients. J Infect. 2009;59:324-31.
14. Leão SC, Tortoli E, Viana-Niero C, Ueki SYM, Lima KVB, Lopes ML, et al. Characterization of Mycobacteria from a Major Brazilian Outbreak Suggest that Revision of the Taxonomic Status of Members of the *Mycobacterium chelonae* – *M. abscessus* Group is needed. J Clin Microbiol. 2009;47(9):2691-8.
15. Leão SC, Viana-Niero C, Matsumoto CK, Lima KVB, Lopes ML, Palaci M, et al. Epidemic of surgical – site infections by a single clone of rapidly growing mycobacteria in Brazil. Future Microbiol. 2010;5(6):971-80.
16. Huang YC, Liu MF, Shen GH, Lin CF, Kao CC, Liu PY, et al. Clinical outcome of *Mycobacterium abscessus* infection and antimicrobial susceptibility testing. J Microbiol Immunol Infect. 2010;43(5):401-6.
17. Adekambi T, Berger P, Raoult D, Drancourt M. *rpoB* gene sequence-based characterization of emerging non-tuberculous mycobacteria with descriptions of *Mycobacterium bolletii* sp. nov., *Mycobacterium phocaicum* sp. nov. and *Mycobacterium aubagnense* sp. nov. Int J Sys Evol Microbiol. 2006;56:133-43.
18. Duarte RS, Lourenço MC, Fonseca LS, Leão SC, Aamorim EL, Rocha IL, et al. Epidemic of Postsurgical Infections caused by *Mycobacterium massiliense*. J Clin Microbiol. 2009;47(7):2149-55.
19. Padoveze MC, Fortaleza CM, Freire MP, Assis DB, Madalosso G, Pellini AC, et al. Outbreak of surgical infection caused by nontuberculous mycobacteria in breast implants in Brazil. J Hosp Infect. 2007;67:161-7.
20. Lopes ML, Lima KVB, Leão SC, Souza MS, Santili LQ, Loureiro ECB. Micobacterioses associadas a procedimentos médicos invasivos em Belém. Rev Par Med. 2005;19:87-9.
21. Villanueva A, Calderon RV, Vargas BA, Ruiz F, Aguero S, Zhang Y, et al. Report on an outbreak of postinjection abscesses due to *Mycobacterium abscessus*, including management with surgery and clarithromycin therapy and comparison of strains by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. Clin Infect Dis. 1997;24(6):1147-53.
22. Galil K, Miller LA, Yakrus MA, Wallace RJ Jr, Mosley DG, England B, et al. Abscesses due to *Mycobacterium abscessus* linked to injection of unapproved alternative medication. Emerg Infect Dis. 1999;5(5):681-7.
23. Zhibang Y, Bixia Z, Qishan L, Lihao C, Xiangquan L, Huaping L. Large-scale outbreak of infection with *Mycobacterium chelonae* subsp. *abscessus* after penicillin injection. J Clin Microbiol. 2002;40 (7):2626-8.
24. Tiwari TS, Ray B, Jost KCJr., Rathod MK, Zhang Y, Brown-Elliott BA, et al. Forty years of disinfectant failure: outbreak of postinjection *Mycobacterium abscessus* infection caused by contamination of benzalkonium chloride. Clin Infect Dis. 2003;36(8):954-62.
25. Toy BR, Frank PJ. Outbreak of *Mycobacterium abscessus* infection after soft tissue augmentation. Dermatol Surg. 2003;29(9):971-3.
26. Yuan J, Liu Y, Yang Z, Cai Y, Deng Z, Qin P, et al. *Mycobacterium abscessus* post-injection abscesses from extrinsic contamination of multiple-dose bottles of normal saline in a rural clinic. Int J Infect Dis. 2009;13(5):537-42.
27. Song JY, Sohn JW, Jeong HW, Cheong HJ, Kim WJ, Kim MJ. An outbreak of post-acupuncture cutaneous infection due to *Mycobacterium abscessus*. BMC Infect Dis. 2006;6(6). Disponível em: [http://www.biomedcentral.com/1471-2334/6/6].
28. Koh SJ, Song T, Kang YA, Choi JW, Chang KJ, Chu CS, et al. An outbreak of skin and soft tissue infection caused by *Mycobacterium abscessus* following acupuncture. Clin Microbiol Infect. 2010;16(7):895-901.
29. Wenger JD, Spika JS, Smithwick RW, Pryor V, Dodson DW, Carden GA, et al. Outbreak of *Mycobacterium chelonae* infection associated with use of jet injectors. JAMA. 1990;264(3):373-6.
30. Nakanaga K, Hoshino Y, Era Y, Matsumoto K, Kanazawa Y, Tomita A, et al. Multiple cases of cutaneous *Mycobacterium massiliense* infection in a “hot spa” in Japan. J Clin Microbiol. 2011;49(2):613-7.
31. Maloney S, Welbel S, Daves B, Adams K, Becker S, Bland L, et al. *Mycobacterium abscessus* pseudoinfection traced to an automated endoscope washer: utility of epidemiologic and laboratory investigation. J Infect Dis. 1994;169:1166-9.
32. Furuya EY, Paez A, Srinivasan A, Cooksey R, Augenbraun M, Baron M, et al. Outbreak of *Mycobacterium abscessus* wound infections among “lipotourists” from the United States who

- underwent abdominoplasty in the Dominican Republic. *Clin Infect Dis*. 2008;46(8):1181-8.
33. Viana-Niero C, Lima KV, Lopes ML, Rabello MC, Marsola LR, Brilhante VC, et al. Molecular characterization of *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* in isolates collected from outbreaks of infections after laparoscopic surgeries and cosmetic procedures. *J Clin Microbiol*. 2008;46(3):850-5.
34. Cardoso AM, Martins SE, Viana-Niero C, Bonfim BF, Pereira NZC, Leão SC, et al. Emergence of nosocomial *Mycobacterium massiliense* infection in Goiás, Brazil. *Microbes and Infection*. 2008;10(14-15):1552-7.
35. Moore M, Frerichs JB. An unusual acid-fast infection of the knee with subcutaneous, abscess-like lesions of the gluteal region; report of a case with a study of the organism, *Mycobacterium abscessus*, nov. sp. *J Invest Dermatol*. 1953;20:133-69.
36. BRASIL. Resolução ANVISA RDC nº 8, de 2009. Dispõe sobre as medidas para redução da ocorrência de infecções por Micobactérias de Crescimento Rápido - MCR em serviços de saúde. Diário Oficial [da] União, Poder Executivo, de 2 de março de 2009.

Prevalence and antimicrobial susceptibility profile of *Enterococcus* spp isolated from frozen chicken carcasses

Prevalência e perfil de susceptibilidade antimicrobiana de *Enterococcus* spp isolados de carcaças de frango congeladas

RIALA6/1460

Christiane Asturiano RISTORI^{1*}, Ruth Estela Gravato ROWLANDS¹, Alzira Maria Morato BERGAMINI², Giselle Ibetta Silva Lopez LOPES¹, Ana Maria Ramalho de PAULA¹, Maria Aparecida de OLIVEIRA², Marisa Jesus de Castro LIMA³, Luciana S TEGANI³, Adriana Hitomi WATANABE³, Miyoko JAKABI¹, Rosemeire Cobo ZANELLA³

*Endereço para correspondência: 1Núcleo de Microbiologia, Centro de Alimentos, Instituto Adolfo Lutz. Av. Dr. Arnaldo, 355, Cerqueira César, São Paulo, SP, CEP: 01246-902. Tel.: +55 (11) 3068-2932. Fax: +55 (11) 3085-3505. E-mail: microbio.ali@ial.sp.gov.br, car@usp.br

²Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas, Centro de Laboratórios Regionais, Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto VI

³Núcleo de Meningites, Pneumonias e Infecções Pneumocócicas, Centro de Bacteriologia, Instituto Adolfo Lutz

Recebido: 03.11.2011 - Aceito para publicação: 05.04.2012

RESUMO

No período de setembro de 2004 a junho de 2006, foram avaliadas a prevalência e susceptibilidade antimicrobiana de *Enterococcus* spp. em 360 amostras de carcaças de frangos congeladas, sem tempero, coletadas em estabelecimentos comerciais do Estado de São Paulo, Brasil. *Enterococcus* spp. foi isolado de todas as amostras analisadas e 1.332 cepas foram identificadas. Entre as dez espécies identificadas, houve predominância de *E. faecalis*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* e *E. faecium*. Todas as cepas de enterococos testadas apresentaram algum nível de resistência aos nove antimicrobianos utilizados no estudo. As porcentagens de resistência antimicrobiana foram: de 89,2% para tetraciclina, 91,4% para quinupristina-dalfopristina, 83,5% para eritromicina, 65% para ciprofloxacina, 55,4% para cloranfenicol, 6,5% para linezolida, 2,3% para vancomicina, 2,3% para teicoplanina e 0,2% para ampicilina. A ocorrência de alto nível de resistência aos aminoglicosídeos (HLR-A) foi detectada em 57,4% dos isolados. As espécies *E. faecalis* e *E. faecium*, consideradas importantes agentes em infecções hospitalares, apresentaram resistência, respectivamente, a oito e sete antibióticos.

Palavras-chave. *Enterococcus*; resistência; antimicrobianos; carcaças de frango.

ABSTRACT

Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Enterococcus* spp. were evaluated in 360 frozen unseasoned chicken carcasses samples collected from September 2004 to June 2006 from the retail stores in São Paulo State, Brazil. *Enterococcus* spp. was isolated from all analyzed samples, and 1,332 strains were identified from them. Among the ten identified species, the predominance of *E. faecalis*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* and *E. faecium* was occurred. All of the *Enterococci* strains showed some degree of resistance to the nine antimicrobials utilized in the study. The percentages of antimicrobial resistance were: 89.2% for tetracycline, 91.4% for quinupristin-dalfopristin, 83.5% for erythromycin, 65% for ciprofloxacin, 55.4% for chloramphenicol, 6.5% for linezolid, 2.3% for vancomycin, 2.3% for teicoplanin and 0.2% for ampicillin. The occurrence of the high level resistance to aminoglycosides (HLR-A) was detected in 57.4% of the isolates. *E. faecalis* and *E. faecium* species, which are considered as important agents in nosocomial infections, showed resistance to eight and seven antibiotics, respectively.

Keywords. *Enterococcus*; resistance; antimicrobials; chicken carcasses.

INTRODUCTION

Enterococci comprise a widespread bacterial group and are present in a variety of foods. They normally colonize the intestinal tract of humans and animals, and can be considered as indicators of fecal contamination in food. However, as opportunistic microorganisms, they are also responsible for infections in humans such as endocarditis, infections of the genitourinary tract, meningitis and septicemia. Most infections are caused by *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*, but infections by *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus durans* and *Enterococcus avium* have also been reported^{1,2}. Over the last 10 years, enterococci have emerged as major nosocomial pathogens. Approximately 12% of all nosocomial infections in the USA are caused by enterococci³.

Currently, there is a growing concern as for the increase of acquired antimicrobial resistance in bacteria, which reduce the availability of efficient and indispensable substances for the treatment and prevention of infectious diseases. Many drugs, including some with importance for human medicine, are added to animal feed as growth promoters and with prophylactic purposes. Although this technological alternative allows a better performance of the animals, specially poultry and swine, the use of antibiotics in animal production can select resistant microorganisms that can be transferred to human through ingestion of contaminated foods or via the environment⁴.

Enterococci are intrinsically resistant to a number of antimicrobials agents and can acquire resistance to others agents such as aminoglycosides, β -lactams and glycopeptides⁵. In Europe the extensive use of the glycopeptide avoparcin, as feed additive in food farms, has been pointed as the responsible by the emergence of vancomycin resistant *Enterococcus* (VRE) among isolates from human and animals⁶. Avoparcin is a molecule similar to vancomycin that exhibits the same mechanisms of action and resistance. Due to the emergence of cross-resistance to clinically important antibiotics such as vancomycin and teicoplanin, in April, 1997, the use of avoparcin was prohibited in the European Union⁷. In Brazil the use of this drug in animal feed is prohibited since 1998. However, other antimicrobials such as avilamycin, zinc bacitracin, chlorhexidine dichloride, spiramycin, enramycin, flavomycin, lincomycin, colistin sulphate, tilosyn sulphate and virginiamycin are still allowed as additives in animal feed⁸.

VRE infections are associated with high morbidity and mortality rates, and excess health care costs^{9,10}. Due to emergence of resistant strains, new agents like linezolid, daptomycin, and quinupristin/dalfopristin are also used for therapy of invasive enterococcal infections¹¹.

In Europe several studies have shown the emergence of vancomycin resistant *Enterococcus* strains in samples of sewage, food and feces of healthy animals^{12,13,14}. In Brazil the first isolation of VRE occurred in 1996¹⁵, and after that many cases have been reported^{16,17,18,19}.

The objective of this work was to evaluate the prevalence of *Enterococcus* spp. in frozen chicken carcasses ready for sale, as well as to identify the species and perform the antimicrobial sensitivity profile of the isolates.

MATERIAL AND METHODS

Samples

A total of 72 samples of frozen unseasoned chicken carcasses were collected from September, 2004 to June, 2006 in retail stores in São Paulo State; each sample were constituted of five units of chicken carcass. A total of 360 units of chicken carcasses from 26 different brands and eight producing states was analyzed (São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso, Paraná, Rio Grande do Sul, Distrito Federal, Santa Catarina and Goiás).

Procedure

The samples were thawed, in a refrigerator, for up to 48 hours. Chicken viscera were removed and each carcass was rinsed in 1% buffered peptone water (BPW; Oxoid, Basingstoke, England). For each 1 g of chicken 1 mL of BPW was added (1:1). After rinsing the whole carcass surface, two 25 mL aliquots of the rinsing water were taken. One of the aliquots was added to 225 mL of Enterococcosel broth (BBL, Beckton Dickinson, Cockeysville, MD, USA), and the other, to 225 mL Enterococcosel (BBL) containing 6 μ g/mL vancomycin (Sigma, St Louis, MO, USA). Flasks were incubated at 35 °C for 48 hours. Then, the cultures in the Enterococcosel broths with vancomycin that had turned black were seeded on Enterococcosel agar (BBL, Beckton Dickinson, Cockeysville, MD, USA) with vancomycin with the aid of a loop; the cultures from Enterococcosel broths were plated onto the same medium lacking vancomycin. After plates had been incubated for 24 hours at 35 °C, five to ten characteristic colonies were

transferred to Brain Heart Infusion (BHI) Broth (Difco, Detroit, MI, USA). Tubes were again incubated at 35 °C for 18-24 h after which Gram staining and catalase test were performed²⁰.

Identification of the species and evaluation of antimicrobial resistance

Isolates were identified by conventional biochemical tests using Gram staining, catalase, reaction on Bile-esculin medium, growth in broth containing 6.5% NaCl, acid formation in carbohydrate (mannitol, sorbitol, sorbose, arabinose, raffinose) broths, hydrolysis of arginine, pyruvate utilization, motility, pigment production, and production of pyrrolidonyl-arylamidase¹.

A multiplex PCR (Polymerase Chain Reaction) assay based on the specific detection of genes encoding D-lanine:D-alanine ligases (*ddl*) was used to confirm the identification of *E. faecalis* and *E. faecium* species. Another multiplex PCR assay based on the specific detection of genes encoding *vanC1* and *vanC2* was used to confirm the identification of *E. gallinarum* and *E. casseliflavus* species¹⁷.

E. faecalis (ATCC 29212), *E. faecium* (*vanA*-228), *E. casseliflavus* (NCTC1261) and *E. gallinarum* (NCTC 12359) were utilized as reference strains in the biochemical tests and in the PCR assay.

Antimicrobial susceptibility tests

The criterion for selection of the sampling for determining the antimicrobial susceptibility profile was based on the number of times that each brand was analyzed for the presence of *Enterococcus* spp. The criteria for selection were: 100% of the strains were evaluated when brands were analyzed up to five different times; 50% of the strains when brands were analyzed from six to 10 times; 25% of the strains when brands were analyzed from 11 to 25 times and 15% of those analyzed more than 25 times.

Evaluation of the antimicrobial susceptibility profile was done in 437 strains for vancomycin (Van), teicoplanin (Tei), ampicillin (Amp), ciprofloxacin (Cip), tetracycline (Tet), erythromycin (Ery) and chloramphenicol (Co) and in 245 isolates for linezolid (Lnz) and quinupristin-dalfopristin (Qda). The Minimum inhibitory concentrations (MIC) were determined by broth microdilution according to guidelines of the CLSI²¹. *E. faecalis* (ATCC 29212) was utilized as reference strains to MIC determination.

A total of 437 isolates were tested by agar dilution method to determinate the high-level resistance (HLR) to aminoglycosides using BHI agar plates plus gentamicin (500 µg/ml) and streptomycin (2,000 µg/ml) by CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) recommendations²¹. For measuring the concentrations of the antibiotics in the BHI agar plates, standard *E. faecalis* ATCC 29212 and ATCC 51299 were utilized as controls for susceptibility and resistance, respectively.

The criteria of susceptibility and resistance adopted for each antimicrobial were those recommended by the CLSI²².

RESULTS AND DISCUSSION

In the present study, *Enterococcus* spp. was found in 100% of the chicken carcasses analyzed. A total of 1,332 strains were isolated and identified. Similar results have been reported in other studies, confirming the high frequency of enterococci in animal products. Hayes et al.²³ have detected enterococci in 99% of the 981 samples of meat products analyzed. McGowan et al.²⁴ investigated the prevalence of enterococci in fruits, vegetables and meat products (pork, cow, chicken and turkey) purchased in the retail market; the highest occurrence of this microorganism occurred in meat products (79%), especially chicken and turkey products in which 100% of the samples were positive. In Brazil, among the 120 samples of foods analyzed by Gomes et al.²⁵, 52% were positive for enterococci, and meat products (60%) and cheeses (83.3%) were those presenting the highest contamination. The high occurrence of enterococci in meat products can be attributed to the natural presence of this microorganism in the gastrointestinal tract of animals and the microorganism's ability to adapt and develop in unfavorable environmental conditions. In addition, the several phases of poultry processing, during slaughter, may contribute for contamination of the carcasses.

As for the different species described for this genus, ten have been identified among the characterized strains (Table 1). However, we observed the predominance of four species: *E. faecalis* (51%), *E. gallinarum* (40%), *E. casseliflavus* (5%) and *E. faecium* (2%), representing about 98% of the total identified strains. Predominance of *E. faecalis* in animal products is in accordance to other studies done in Brazil²⁶ and in Europe^{27,28}.

Table 1. Distribution of species of the genus *Enterococcus* in the 360 samples of analyzed chicken carcasses collected from September, 2004 to June, 2006, in retail stores in São Paulo State

Species	N. (%)
<i>E. faecalis</i>	679 (51)
<i>E. gallinarum</i>	532 (40)
<i>E. casseliflavus</i>	69 (5)
<i>E. faecium</i>	24 (2)
<i>E. durans</i>	14 (1)
<i>E. dispar</i>	5 (0.4)
<i>E. hirae</i>	5 (0.4)
<i>E. avium</i>	1 (0.05)
<i>E. columbae</i>	1 (0.05)
<i>E. mundtii</i>	1 (0.05)
<i>Enterococcus spp</i>	1 (0.05)
Total	1,332 (100)

Enterococcus, particularly *E. faecalis* and *E. faecium*, showed intrinsic resistance to several antimicrobial drugs, including aminoglycosides, β -lactams and quinolones. In addition, these microorganisms can acquire and transfer genetic elements that confer resistance to other classes of antibiotics, especially glycopeptides such as vancomycin and teicoplanin⁵. All of the enterococci strains tested have shown some level of resistance to the nine antimicrobials utilized in the study, varying from 0.2% (ampicillin) to 89.3% (tetracycline) as show the Table 2. For vancomycin, only 2.3% of the strains were resistant and detected in only two species, *E. faecalis* and *E. faecium*. The intermediate resistance to vancomycin was observed only in the species *E. gallinarum* and *E. casseliflavus*, because this resistance is intrinsic for these two species. For the other drugs we can consider the total resistance by adding the two profiles, intermediate and resistant (I+R) and the strains show 65% resistance to ciprofloxacin, 55.4% to chloramphenicol, 83.5% to erythromycin and 89.3% to tetracycline. However, if we look at each species we observed that *E. faecium* has the lowest resistance profile for these four drugs. To evaluate the profile of resistance to linezolid and quinupristin-dalfopristin, 245 strains were tested as shown in Table 3 and 91.4% of the strains were resistant to quinupristin-dalfopristin.

Among the species, we point out *E. faecalis* which have shown resistance to quinupristin-dalfopristin (97.9%), tetracycline (89.1%), erythromycin (82%), ciprofloxacin (65.2%), chloramphenicol (59.9%), linezolid (5.9%), teicoplanin (0.7%) and vancomycin (0.7%), and *E. faecium* which have shown resistance to tetracycline (93.3%), teicoplanin (53.3%), vancomycin

(53.3%), erythromycin (93.3%), quinupristin-dalfopristin (30.8%), ciprofloxacin (20%) and chloramphenicol (20%).

Resistance to vancomycin (VRE) was detected in 10 strains (2.3%) isolated from two units of chicken produced in São Paulo. Although a low resistance rate was observed for this antibiotic, the strains that have shown this characteristic belonged to the *E. faecalis* and *E. faecium* species, which are organisms considered as important agents in hospital infections. Gomes et al.²⁵ have evaluated the antimicrobial susceptibility of 219 enterococci strains isolated from foods and have detected 3 strains (1.4%) of vancomycin resistant *E. faecium*. VRE *E. faecium* has also been found by Japanese researchers in 9% (2/22) of the chicken carcasses exported by Brazil²⁹. In other studies done in Brazil, VRE strains were not detected in samples of chicken and in swabs from chicken cloacae^{26,30}.

Higher resistance levels were observed for tetracycline, quinupristin-dalfopristin and erythromycin. Resistance to tetracycline was observed among the *E. faecium* (93.3%), *E. gallinarum* (92.5%), *E. faecalis* (89.1%), *E. casseliflavus* (66.7%) and *E. hirae* (50%) isolates. As for erythromycin resistance rates were 84.3% in *E. gallinarum*, 82% in *E. faecalis*, 90.5% in *E. casseliflavus*, 93.3% in *E. faecium*; only one *E. durans* strain has shown resistance to this antibiotic. Although the use of tetracycline as growth promoter is prohibited in Brazil since 1998, this antimicrobial and erythromycin are the drugs most used therapeutically in animal production³¹ and may contribute, consequently, for the occurrence of high resistance levels for these antimicrobials.

According to Chopra and Roberts³², co-resistance can also contribute to high resistance levels to tetracycline and erythromycin since plasmids and/or transposons can simultaneously carry genes that confer resistance to these two antibiotics.

As for quinupristin-dalfopristin, resistance was verified in *E. faecalis* (97.9%), *E. gallinarum* (80.6%), *E. casseliflavus* (85.7%) and *E. faecium* (30.8%). Quinupristin/dalfopristin, which belongs to the streptogramin family, had its use approved by the FDA³³ for treatment of severe infections in humans associated with vancomycin resistant *E. faecium*. According to Manzella³⁴, resistance to this antimicrobial is not common. *E. faecalis* shows intrinsic resistance to this antibiotic. However, in other species the occurrence of resistance can be related to the use of virginiamycin in animal production as growth promoter³⁵ since this

Table 2. Susceptibility profile of *Enterococcus* strains isolated from frozen chicken carcasses from September, 2004 to June, 2006 of retail stores in São Paulo State

Species	N. strains evaluated	Ampicillin			Ciprofloxacin			Chloram-Phenicol			Erythromycin			Teicoplanin			Tetracycline			Vancomycin		
		S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
<i>E. faecalis</i>	267	267	0	0	93	121	53	107	88	72	48	54	165	265	0	2	29	3	235	265	0	2
<i>E. gallinarum</i>	134	133	0	1	43	31	60	64	39	31	21	22	91	134	0	0	10	3	121	0	134	0
<i>E. casseliflavus</i>	21	21	0	0	5	6	10	12	5	4	2	9	10	21	0	0	7	0	14	0	21	0
<i>E. faecium</i>	15	15	0	0	12	0	3	12	1	2	1	9	5	7	0	8	1	0	14	7	0	8
Total (n/%)	437	436 (99.8)	0 (0.2)	1 (0.2)	153 (35)	158 (29)	126 (29)	195 (44.6)	133 (30.4)	109 (25)	72 (16.5)	94 (21.5)	271 (62)	427 (97.7)	0 (2.3)	10 (2.3)	47 (10.7)	6 (1.4)	384 (87.9)	272 (62.2)	155 (35.5)	10 (2.3)

Resistance Profile: S= susceptible; I= intermediate; R= resistant; NE= not evaluated

Table 3. The profile of resistance of *Enterococcus* strains to linezolid and quinupristin-dalfopristin

Species	N. strains evaluated	Linezolid			Quinupristin-Dalphopristin		
		S	I	R	S	I	R
<i>E. faecalis</i>	187	176	1	10	4	1	182
<i>E. gallinarum</i>	31	28	2	1	6	8	17
<i>E. casseliflavus</i>	14	12	1	1	2	5	7
<i>E. faecium</i>	13	13	0	0	9	1	3
Total (n/%)	245	229 (93.5)	4 (1.6)	12 (4.9)	21 (8.6)	15 (6.1)	209 (85.3)

Resistance Profile: S= susceptible; I= intermediate; R= resistant; NE= not evaluated

antimicrobial shows cross-resistance to quinupristin-dalfopristin³⁶. In Brazil the use of virginiamycin as growth promoter in animal feed is allowed in poultry meat production⁸. In the U.S., where virginiamycin is utilized over 20 years in animal production, Hayes et al.³⁷ verified that 63% of the 127 strains of *E. faecium* isolated from environmental samples in poultry production were resistant to quinupristin-dalfopristin.

Linezolid was the first representative of a new class of antimicrobials called oxazolidinones, utilized in infections caused by multi-resistant Gram positive cocci, among them VRE³⁸. Our results alert for the occurrence of resistance to this antibiotic in 5.1% of the strains. According to Scheetz et al.³⁹, the emergence of linezolid resistant among clinical strains is related to the prolonged use of this drug in the treatment of infections in humans.

The occurrence of High Level Resistance to aminoglycosides (HLR-A) was tested in 437 strains (Table 4). HLR-A (Gentamicin and/or Streptomycin) was detected in 57.4% of the isolates. High resistance levels to gentamicin (HLR-Gn) were observed in *E. gallinarum*,

E. casseliflavus and *E. faecalis*. High resistance levels to streptomycin (HLR-St) and both gentamicin and streptomycin (HLR-Gn/St) were observed in the species *E. faecalis*, *E. gallinarum*, *E. faecium* and *E. casseliflavus*.

Infections by enterococci are frequently treated with a combination of antibiotics, an aminoglycoside (e.g., gentamicin) and an agent that acts on the cell wall, such as penicillin or a glycopeptide. Thus, the percentage (46.5%) of HLR-A strains found in our study is worrisome. Differently from our results, Fracalanza et al.²⁶ have detected the occurrence of HLR-A in 10.6% of the strains isolated from chicken samples.

The results of this study revealed that enterococci are common contaminants in chicken purchased in retail stores in São Paulo State, Brazil. Considering that in Brazil the studies on the occurrence of *Enterococcus* in foods are scarce^{25,26,40,41} and that the data presented in this study regarding resistance of antibiotics are worrisome, especially for the most prevalent species in human infections (*E. faecalis* and *E. faecium*), the utilization of new antimicrobials should be done in a very rational

Table 4. Occurrence of High Level Resistance to Aminoglycosides (HLR-A) among *Enterococcus* isolated from frozen chicken carcasses in São Paulo State

Species (n.)	Number (%) of isolates that showed HLR-A			
	Number	HLR-Gn	HLR-St	HLR-Gn/St
<i>E. faecalis</i>	267	34 (12.7%)	86 (32.2%)	9 (3.4%)
<i>E. gallinarum</i>	134	62 (46.3%)	32 (23.9%)	13 (9.8%)
<i>E. casseliflavus</i>	21	3 (14.3%)	3 (14.3%)	1 (4.8%)
<i>E. faecium</i>	15	2 (13.3%)	4 (26.7%)	2 (13.3%)
Total (396)	437	101 (23.1%)	125 (28.6%)	25 (5.7%)

HLR-Gn: strains with High Level Resistance to gentamicin only;

HLR-St: strains with High Level Resistance to streptomycin only;

HLR-Gn/St: strains with High Level Resistance to gentamicin and streptomycin simultaneously.

way, both in human and animal therapy. Monitoring of antimicrobial resistance is essential since constant surveillance can halt the dissemination of *Enterococcus* clones resistant to several drugs, as well as the emergence of new resistance mechanisms.

ACKNOWLEDGMENTS

Financial support from the Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (Brazilian National Health Agency) of the Ministry of Health/National Program for Monitoring Bacterial Prevalence and Resistance in Poultry (PREBAF).

REFERENCES

- Teixeira LM, Facklam RR. *Enterococcus*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (eds.). *Manual of Clinical Microbiology*. 8. ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2003. p. 422-33.
- Malani PN, Kauffman CA, Zervos MJ. Enterococcal disease, epidemiology, and treatment. In: Gilmore MS, Clewell DB, Courvalin P, Dunny GM, Murray BE, Rice LB (eds.). *The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2002. p. 385-408.
- Edmond MB, Wallace SE, McClish DK, Pfaller MA, Jones RN, Wenzel RP. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clin Infect Dis*. 1999;29:239-44.
- Angulo FJ, Nargund VN, Chiller TC. Evidence of an association between use of anti-microbial agents in food animals and antimicrobial resistance among bacteria isolated from humans and the human health consequences of such resistance. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 2004;51(8/9):374-9.
- Murray BE. Diversity among multidrug-resistant enterococci. *Emerg Infect Dis*. 1998;4:37-47.
- Bager F, Madsen M, Christensen J, Aarestrup FM. Avoparcin used as a growth promoter is associated with the occurrence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* on Danish poultry and pig farms. *Prev Vet Med*. 1997;31(1-2):95-112.
- Commission Directive 97/6/EC. January 30, 1997, amending Council Directive 70/524/EEC concerning additives in feedingstuffs. *Official Journal of the European Communities*. 1997;35:11-3.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Lista de aditivos autorizados uso na alimentação animal no Brasil. Atualizada em 03 dez 2008. [acesso 2011 mar 2]. Disponível em: [http://www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos/aditivos-autorizados].
- Diaz Granados CA, Zimmer SM, Klein M, Jernigan JA. Comparison of mortality associated with vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible enterococcal bloodstream infections: a meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2005;41:327-33.
- Huang SS, Datta R, Platt R. Risk of acquiring antibiotic-resistant bacteria from prior room occupants. *Arch Intern Med*. 2006;166:1945-51.
- Hammerum AM, Lester CH, Heuer OE. Antimicrobial-resistant enterococci in animals and meat: a human health hazard? *Foodborne Pathog Dis*. 2010;7(10):1137-46.
- Kotzamanidis C, Zdragas A, Kourelis A, Moraitou E, Papa A, Yiantzi V, et al. Characterization of vanA-type *Enterococcus faecium* isolates from urban and hospital wastewater and pigs. *J Appl Microbiol*. 2009;107(3):997-1005.
- Haenni M, Saras E, Châtre P, Meunier D, Martin S, Lepage G, et al. VanA in *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, and *Enterococcus casseliflavus* detected in French cattle. *Foodborne Pathog Dis*. 2009;6(9):1107-11.
- López M, Sáenz Y, Rojo-Bezares B, Martínez S, del Campo R, Ruiz-Larrea F, et al. Detection of vanA and vanB2-containing enterococci from food samples in Spain, including *Enterococcus faecium* strains of CC17 and the new singleton ST425. *Int J Food Microbiol*. 2009;133(1-2):172-8.
- Dalla Costa LM, Souza DC, Martins LTF, Zanella RC, Bandilleone MC, Bokerman S, et al. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: first case in Brazil. *Braz J Infect Dis*. 1998;2:160-3.
- Zanella RC, Valderato F, Lovgren M, Tyrrel GJ, Bokermann S, Almeida SC, et al. First confirmed case of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* with vanA phenotype from Brazil: isolation from meningitis case in São Paulo. *Microb Drug Resist*. 1999;5:159-62.
- Zanella RC, Brandileone MC, Bokerman S, Almeida SC, Valdetaro F, Vitorio F, et al. Phenotypic and genotypic characterization of

- VanA *Enterococcus* isolated during the first nosocomial outbreak in Brazil. *Microb Drug Res*. 2003;9:283-91.
18. Gales AC, Sader HS, Ribeiro J, Zoccoli C, Barth A, Pignatari AC. Antimicrobial susceptibility of Gram-positive bacteria isolated in Brazilian hospitals participating in the SENTRY Program (2005–2008). *Braz J Infect Dis*. 2009;13(2):90-8.
 19. Moretti ML, Oliveira Cardoso LG, Levy CE, Nowakosky A, Bachur LF, Bratfich O, et al. Controlling a vancomycin-resistant enterococci outbreak in a Brazilian teaching hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011;30(3):369-74.
 20. Boyce JM. Vancomycin-resistant *Enterococcus*. Detection, Epidemiology and Control Measures. *Infect Dis Clin North Am*. 1997;11:367-84.
 21. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M100-S16. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2006.
 22. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Approved standard M7-A7. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2006.
 23. Hayes JR, English LL, Carter PJ, Proescholdt T, Lee KY, Wagner DD, et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus* species isolated from retail meats. *Appl Environ Microbiol*. 2003;69(12):7153-60.
 24. McGowan LL, Jackson CR, Barrett JB, Hiott LM, Fedorka-Cray P. Prevalence and antimicrobial resistance of enterococci isolated from retail fruits, vegetables, and meats. *J Food Prot*. 2006;69(12):2976-82.
 25. Gomes BC, Esteves CT, Pallazz IC, Darini AL, Felis GE, Sechi LA, et al. Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. *Food Microbiol*. 2008;25(5):668-75.
 26. Fracalanza SAP, Scheidegger EMD, Santos PF, Leite PC, Teixeira LM. Antimicrobial resistance profiles of enterococci isolated from poultry meat and pasteurized milk in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102(7):853-9.
 27. Miranda JM, Guarddon M, Mondragon A, Vázquez BI, Fente CA, Cepeda A, et al. Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. strains isolated from organic chicken, conventional chicken and turkey meat: a comparative survey. *J Food Prot*. 2007;70(4):1021-4.
 28. Pavia M, Nobile CG, Salpietro L, Angelillo IF. Vancomycin resistance and antibiotic susceptibility of enterococci in raw meat. *J Food Prot*. 2000;63(7):912-5.
 29. Ike Y, Tanimoto K, Ozawa Y, Nomura T, Fujimoto S, Tomita H. Vancomycin-resistant enterococci in imported chickens in Japan. *Lancet*. 1999;353:1854.
 30. Xavier DB, Bernal FEM, Titze-de Almeida R. Absence of VanA- and VanB- containing enterococci in poultry raised on nonintensive production farms in Brazil. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72(4):3072-3.
 31. Oliveira JS, Zanine AM, Santos EM. Uso de aditivos na nutrição de ruminantes. *RedVet*. 2005; 6(11). [acesso 2006 jun 25]. Disponível em: [http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111105.html].
 32. Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2001;65(2):232-60.
 33. U.S. Food and Drug Administration (FDA). (1999). Guidance for industry, consumer-directed broadcast advertisements. U.S. Food and Drug Administration, U.S. Department of Health and Human Services. [acesso 2003 ago 2]. Disponível em: [http://www.fda.gov/cder].
 34. Manzella JP. Quinupristin-Dalfopristin: a new antibiotic for severe Gram-Positive Infections. *Am Fam Physician*. 2001;64(11):1863-6.
 35. McDermott PF, Cullen P, Hubert SK, McDermott SD, Bartholomew M, Simjee S, et al. Change in antimicrobial susceptibility of native in chickens fed virginiamycin. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71(9):4986-91.
 36. Rende-Fournier R, Leclercq R, Galimand M, Duval J, Courvalin P. Identification of the satA gene encoding a streptogramin A acetyltransferase in *Enterococcus faecium* BM4145. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993;37(10):2119-25.
 37. Hayes JR, Wagner DD, English LL, Carr LE, Joseph SW. Distribution of streptogramin resistance determinants among *Enterococcus faecium* from a poultry production environment of the USA. *J Antimicrob Chemother*. 2005;55(1):123-6.
 38. Birmingham MC, Rayner CR, Meagher AK, Flavin SM, Batts DH, Chentag JJ. Linezolid for the treatment of multidrug-resistant, gram-positive infections: experience from a compassionate-use program. *Clin Infect Dis*. 2003;36(2):159-68.
 39. Scheetz MH, Knechtel SA, Malczynski M, Postelnick MJ, Qi C. Increasing incidence of linezolid-intermediate or-resistant, vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strains parallels increasing linezolid consumption. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(6):2256-9.
 40. Miguel MAL, Teixeira LM, Noleto ALS. Characterization of *Enterococcus* strains isolated from ready-to-eat foods. *Rev Microbiol*. 1995;26:121-4.
 41. Santos BHC, Souza EL, Oddi IC. Presença de *Enterococcus* sp. em alimento enteral e perfil de resistência a antimicrobianos. *Rev Bras Anal Clin*. 2004;36:47-56.

Comparative study on PCR and microbiological culture performance for identifying *Mycobacterium tuberculosis* complex and *Mycobacterium bovis* specie in bovine samples

Comparação entre o cultivo microbiológico e a PCR na identificação do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e da espécie *Mycobacterium bovis* em amostras bovinas

RIALA6/1461

Alessandra Figueiredo de Castro NASSAR^{1*}, Simone MIYASHIRO¹, Rosa Maria PIATTI¹, Cristina Corsi DIB¹, Eliana ROXO¹, Ronaldo Zucatelli MENDONÇA²

*Endereço para correspondência: 1Instituto Biológico, Av. Conselheiro Rodrigues Alves, 1252, CEP: 04014-002, São Paulo, SP, Brasil. Telefone/fax: +55 (11) 5087-1721. E-mail: nassar@biologico.sp.gov.br

²Laborat rio de Parasitologia e Entomologia, Instituto Butantan

Recebido: 24.02.2012- Aceito para publica o: 07.05.2012

RESUMO

Foi avaliado o desempenho das técnicas de cultivo microbiológico e de PCR na análise de amostras de órgãos bovinos com lesões suspeitas de tuberculose. Cinquenta e duas amostras, colhidas em abatedouros, foram analisadas pelo cultivo microbiológico e o DNA extraído foi amplificado por PCR, utilizando-se os *primers* NZ1 e NZ2, que identificam micobactérias do complexo *M. tuberculosis*, e o par de *primers pncA* que diferencia as espécies *M. bovis* e *M. tuberculosis*. As 30 amostras de colônias isoladas foram suspensas, e a amplifica o do DNA extraído foi feita por PCR, empregando-se os mesmos pares de *primers*. Embora a concordância entre as técnicas de cultivo microbiológico e de PCR realizado diretamente nas amostras clínicas com os *primers* NZ1 e NZ2 tenha sido fraca ($k=0,175$), os dois pares de *primers* utilizados amplificaram os genes alvos quando aplicados em 100% do DNA extraído das 30 colônias isoladas. Pela PCR com par de *primers pncA* houve identifica o de *M. bovis* nas colônias isoladas em curto intervalo de tempo, quando comparado aos testes bioquímicos. O uso concomitante de ambas as técnicas reduz o tempo para efetuar a confirma o do agente isolado, fator essencial nos estudos epidemiológicos e nas medidas de controle preventivas.

Palavras-chave. tuberculose, bovino, *Mycobacterium bovis*, PCR.

ABSTRACT

The present study aimed at evaluating the concordance between PCR and microbiological culture techniques for analysing organs samples from cattle with suspected lesions of tuberculosis. Fifty-two samples collected from slaughterhouses were analyzed by microbiological culture, and the extracted DNA was amplified by PCR using NZ1 and NZ2 primers. These primers identify the mycobacteria belonging to *M. tuberculosis* complex, and the primers pair *pncA* differentiate the *M. bovis* from *M. tuberculosis* species. The colonies isolated from 30 samples were suspended, and the extracted DNA was amplified by PCR using the same primer pairs. Although the agreement has been considered weak ($k = 0.175$) between microbiological culture and PCR performed directly in clinical samples using NZ1 and NZ2 primers, the two pairs of primers could amplify the target genes when 100% of the extracted DNA from 30 isolated colonies were used. Thus, PCR employing *pncA* primer pair enabled to identify *M. bovis* in the isolated colonies at a short time when compared with the biochemical assays. The concomitant use of PCR and bacteriological culture techniques hastens the confirmation of detected agent, which is essential in conducting the epidemiological studies and in taking preventive control measures.

Keywords. tuberculosis, bovine, *Mycobacterium bovis*, PCR.

INTRODUCTION

Tuberculosis is a zoonosis, and among the etiologic agents, detaches the species belonging to *M. tuberculosis* complex, which comprises: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canettii*, *M. caprae* and *M. Pinnipedii*¹. *M. tuberculosis* and *M. bovis* species can be pathogenic for man. *M. bovis*, the causative agent for bovine tuberculosis, is a serious public health issue because it can potentially infect humans². In Brazil, bovine population is estimated in 167 million animals, and still nowadays there is no correct estimated prevalence of animal tuberculosis in the country, the last data refers to an official notification and indicates an average national prevalence of 1.3% infected animals³. Bacteriological culture is the confirmatory diagnosis for mycobacteria detection, and is considered the gold standard test by World Organization for Animal Health (OIE). Due to dysgonic and very low growth of mycobacteria, isolation and identification of *M. bovis* by conventional biochemical methods is laborious, and may take several weeks. PCR is an efficient and fast method that can be used to detect the agent in clinical samples, with a 48 hours' time processing^{4,5,6}. Two PCR reactions with specific primers hybridizing the gene encoding the pyrazinimide (*pncA*) reported by Shah et al.⁷ to differentiate colonies between *M. bovis* and *M. tuberculosis* were one of the methodologies carried out in the present work for this differentiation.

Tuberculosis is still very frequent in Brazil and the specific diagnostic takes a long time period, it would be useful a methodology able to shorten this period. For this purpose, the present trial evaluated the use of PCR for detection of *M. tuberculosis* complex and specific differentiation (*M. bovis* and *M. tuberculosis*) directly from suspect clinical samples and also from mycobacteria isolates, in comparison with microbiological culture.

MATERIAL AND METHODS

Sampling

Samples from 52 bovine (38 lymphnodes, 11 lungs, 3 liver) (see table 1) with suggestive lesions of tuberculosis (caseous lesions) were collected at slaughterhouse from São Paulo State and were transported in sterile bags at 4°C until further analysis.

Microbiological culture

Samples were cultured in Stonebrink and Petragani media after decontamination by means of Petroff method⁸ incubating two tubes of each medium at 37 °C. The cultures were examined every week, during 90 days, for observation of mycobacteria growth, confirmed through Ziehl-Neelsen staining as described by Bier⁹.

PCR reactions detection threshold

PCR detection threshold was obtained by artificial contamination of 1 ml of a healthy macerated lung with 2.3×10^5 CFU of *M. bovis* (AN5). Then, serial dilutions were prepared from this first suspension until 2.3×10^{-3} CFU/mL. All the dilutions were processed for DNA extraction and PCR assays cited in the following topics to determine the analytical sensitivities.

Still, PCR analytical sensitivity was also evaluated for colonies suspension, starting from 2.3×10^5 CFU of *M. bovis* (AN5)/mL of ultrapure water with serial dilutions until 2.3×10^{-3} CFU/mL. The suspensions were boiled (100 °C/5 minutes) for DNA liberation and further PCR reactions.

DNA extraction

DNA was extracted from the clinical samples and from the suspensions of macerated lung artificially contaminated, and were firstly submitted to proteinase K digestion (20 mg/mL) at 56 °C for 2 hours, and then processed with commercial reagent TRIZOL (Invitrogen)¹⁰ according to the manufacturer's instructions.

Isolated colonies were suspended in 0,85% sterile saline solution and submitted to boiling (100 °C/5 minutes) for DNA exposure¹¹. Extracted DNA from clinical samples and from colonies suspension were submitted to PCR for complex *M. tuberculosis* determination and, afterwards, for identification of *M. bovis* and *M. tuberculosis* differentiation described in the next topic.

PCR Assay

PCR for *M. tuberculosis* complex detection was performed as described by Collins and Stephens¹² with primers NZ1 (5'CGACAGCGAGCAGCTTCTCGCTG 3') and NZ2 (5'GTCGCCACCACGCTGCTGGTCAGTG 3') that target IS-1081, specific insertion sequences from *M. tuberculosis* complex, which amplify a 306 bp fragment.

Amplification was performed in a total volume of 50 μ L, with 200 μ M of each dNTP, 1X PCR buffer (10 mM Tris-HCL, pH 8.0; 50 mM KCL), 2 mM MgCl₂, 25 p-mole of each primer (NZ1 and NZ2), 1.25 U Taq DNA polymerase and 10 μ L of DNA. The PCR reaction consisted of an initial denaturation of 95 °C for 4 min., 30 cycles including 94 °C for 1 min., 63 °C for 90 s and 72 °C for 1 min. followed by final extension at 72 °C for 10 min.

PCR for *M. bovis* and *M. tuberculosis* identification

For *M. bovis* identification it was carried out the system described by De Los Monteros et al.¹³, being one specific reaction for *M. bovis* detection and another one for *M. tuberculosis*. The amplification reactions were similar, only differing in the reverse primer. The protocol was carried out adding 10 μ L of DNA to a PCR mix of 50 μ L containing dNTP, buffer, MgCl₂ and Taq DNA polymerase as described above and 30 pmol of the forward primer *pncATB-1.2* (5' ATGCGGGCGTTGATCTCGTC 3') complementary to part of *pncA* gene that is present in both *M. tuberculosis* and *M. bovis* species, *M. bovis*-specific reverse primer *pncAMB-2* (5' CGGTGTGCCGGAAGCCG 3') or *M. tuberculosis* specific reverse primer *pncAMT-2* (5' CGGTGTGCCGGAAGCCG 3'). The reverse primers varies only in one nucleotide in the *pncA* gene (a cytosine residue at position 169), and this substitution was enough for *pncAMB-2* and *pncAMT-2* specifically anneal to *M. bovis* or *M. tuberculosis*, respectively. PCR reactions with primers *pncATB-1.2* and *pncAMT-2* or *pncAMB-2* amplify specific 185 bp products in *M. tuberculosis* or *M. bovis*, respectively. After initial denaturation at 95°C for 10 min., DNA amplification was set with 30 cycles of 94°C for 1 min., 67°C for 1 min. and 72°C for 1 min., followed by a final extension step of 72°C for 10 minutes. Positive PCR controls were *M. bovis* AN5 (Instituto Biológico-SP) and *M. tuberculosis* H₃₇RV (ATCC 27294), and ultra-pure water was used as negative control. Amplification reactions were carried out in a Peltier Thermal Cycler-100 (MJ Research).

Analysis of the amplified products <2>

Analysis of the amplified products was performed by means of electrophoresis in 1.3 % agarosis gel with TBE 0.5 X running buffer (0.045 M TRIS-Borate and 1 mM of EDTA pH 8.0). Gel was stained with ethidium bromide, visualized with a UV transilluminator (300-320 nm) and photographed by a photo-documentation system (Kodak Digital Camera DC/120 Zoom).

RESULTS

Microbiological culture

From 52 bovine samples (38 lymph nodes, 11 lungs, 3 livers) with suggestive lesions of tuberculosis (caseous lesions), 30 (57.7%) allowed the growth of mycobacterium by means of microbiological culture, and 1 (sample 11) (0.52%) was contaminated with other microorganisms and 22 (42%) were negative. From thirty isolated colonies 100% were confirmed as *Mycobacterium* spp. by Ziehl-Nielsen staining. The results are presented in

PCR reactions detection threshold

PCR assays threshold detection for the artificially contaminated lung revealed that under conditions cited above, the reaction with primers NZ1 and NZ2 could detect up to 2.3 x 10¹ CFU/mL, the same analytical sensitivity obtained for the colonies suspension. With primers for *pncA* gene, detection threshold was 2.3 x 10³ CFU/mL either in the contaminated lung or colonies suspension.

DNA extracted from clinical samples

When PCR was applied in DNA extracted directly from the 52 clinical samples analyzed revealed that 6/52 (11.5%) were positive for mycobacteria from *M. tuberculosis* complex with primers NZ1 and NZ2. No sample 0/52 was positive for *pncA* gene (*M. bovis* species) reactions for the same samples. The identified 22 negative samples from microbiological culture were confirmed negative by PCR with primers NZ1 and NZ2 and *pncA*. The results are presented in Flowchart 1.

DNA extracted from isolated colonies

The 30 isolated colonies were submitted to boiling (100 °C/ 5 minutes) for DNA exposure and PCR methodology with primers NZ1 and NZ2, which classified 30 (100%) the colonies as belonging to *M. tuberculosis* complex. The same DNA samples were also submitted to PCR methodology with primers *pncATB-1.2* and *pncAMB-2* which confirmed 100% as *M. bovis* species with no signal observed with primers *pncATB-1.2* and *pncAMT-2* that identified for *M. tuberculosis*.

Statistical analysis

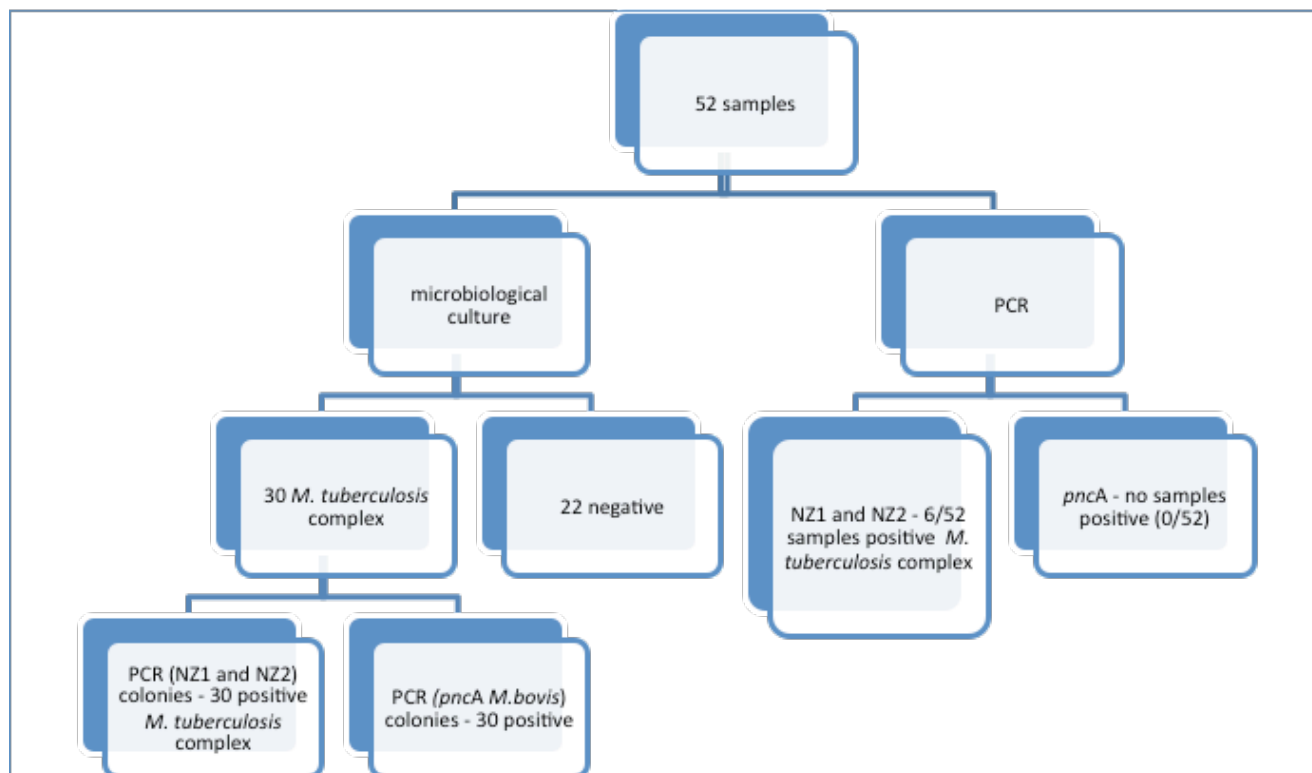
Concordance between microbiological culture and PCR with primers NZ1 and NZ2 (*Mycobacterium tuberculosis* complex) detection when applied to DNA extracted directly from clinical samples was calculated

Table 1. Isolated and PCR reaction to identify *M. tuberculosis* complex

Identification	Samples	Clinical Samples				Isolated Colonies		
		Culture (Baar)	Primer Nz (Nz1 And Nz2)	Primer: <i>pncamb-2</i> **	Primer: <i>pncamt-2</i> *	Primer Nz (Nz1 And Nz2)	Primer: <i>pncamb-2</i> **	Primer: <i>pncamt-2</i> *
1	Lymphonode	Positive	Positive	Negative	Negative	Positive	Positive	Negative
2	Lymphonode	Positive	Negative	Negative	Negative	Positive	Positive	Negative
3	Lymphonode	Positive	Positive	Negative	Negative	Positive	Positive	Negative
4	Lymphonode	Positive	Negative	Negative	Negative	Positive	Positive	Negative
5	Lymphonode	Positive	Positive	Negative	Negative	Positive	Positive	Negative
6	Lymphonode	Negative	Negative	Negative	Negative	-	-	-
7	Liver	Negative	Negative	Negative	Negative	-	-	-
8	Lung	Positive	Negative	Negative	Negative	Positive	Positive	Negative
9	Lymphonode	Negativo	Negative	Negative	Negative	-	-	-
10	Lymphonode	Positive	Negative	Negative	Negative	Positive	Positive	Negative
11	Lymphonode	Contaminated	Positive	Negative	Negative	-	-	-
12	Lymphonode	Positive	Negative	Negative	Negative	Positive	Positive	Negative
13	Lymphonode	Positive	Positive	Negative	Negative	Positive	Positive	Negative
14	Lymphonode	Negativo	Negative	Negative	Negative	-	-	-
15	Lymphonode	Negativo	Negative	Negative	Negative	-	-	-
16	Lymphonode	Positive	Negative	Negative	Negative	Positive	Positive	-
17	Lymphonode	Negativo	Negative	Negative	Negative	-	-	-
18	Lymphonode	Negativo	Negative	Negative	Negative	-	-	-
19	Lung	Positive	Negative	Negative	Negative	Positive	Positive	Negative
20	Liver	Positive	Negative	Negative	Negative	Positive	Positive	Negative
21	Lymphonode	Positive	Negative	Negative	Negative	Positive	Positive	Negative
22	Lymphonode	Positive	Negative	Negative	Negative	Positive	Positive	Negative
23	Lymphonode	Positive	Negative	Negative	Negative	Positive	Positive	Negative
24	Lymphonode	Negativo	Negative	Negative	Negative	-	-	-
25	Lymphonode	Negativo	Negative	Negative	Negative	-	-	-
26	Lung	Positive	Negative	Negative	Negative	Positive	Positive	Negative
27	Lung	Positive	Negative	Negative	Negative	Positive	Positive	Negative
28	Liver	Positive	Positive	Negative	Negative	Positive	Positive	Negative
29	Lymphonode	Positive	Negative	Negative	Negative	Positive	Positive	Negative
30	Lymphonode	Negativo	Negative	Negative	Negative	-	-	-
31	Lymphonode	Negativo	Negative	Negative	Negative	-	-	-
32	Lymphonode	Negativo	Negative	Negative	Negative	-	-	-
33	Lymphonode	Positive	Negative	Negative	Negative	Positive	Positive	Negative
34	Lung	Positive	Negative	Negative	Negative	Positive	Positive	Negative
35	Lung	Positive	Negative	Negative	Negative	Positive	Positive	Negative
36	Lung	Positive	Negative	Negative	Negative	Positive	Positive	Negative
37	Lung	Positive	Negative	Negative	Negative	Positive	Positive	Negative
38	Lymphonode	Positive	Negative	Negative	Negative	Positive	Positive	Negative
39	Lymphonode	Positive	Negative	Negative	Negative	Positive	Positive	Negative
40	Lymphonode	Positive	Negative	Negative	Negative	Positive	Positive	Negative
41	Lymphonode	Positive	Negative	Negative	Negative	Positive	Positive	Negative
42	Lymphonode	Negativo	Negative	Negative	Negative	-	-	-
43	Lymphonode	Positive	Negative	Negative	Negative	Positive	Positive	Negative
44	Lymphonode	Negativo	Negative	Negative	Negative	-	-	-
45	Lymphonode	Negativo	Negative	Negative	Negative	-	-	-
46	Lymphonode	Negativo	Negative	Negative	Negative	-	-	-
47	Lymphonode	Negativo	Negative	Negative	Negative	-	-	-
48	Lymphonode	Negativo	Negative	Negative	Negative	-	-	-
49	Lung	Positive	Negative	Negative	Negative	Positive	Positive	Negative
50	Lymphonode	Negativo	Negative	Negative	Negative	-	-	-
51	Lung	Negativo	Negative	Negative	Negative	-	-	-
52	Lung	Negativo	Negative	Negative	Negative	-	-	-

* primer *pncAMT-2*: specific primer to identify *M. tuberculosis*

**primer *pncAMB-2*: specific primer to identify *M. bovis*



Flowchart 1. Results obtained from microbiological culture and PCR of clinical samples and colonies

by MEDCALC with a 95% confidence interval¹⁴, and was classified as minor (Kappa = 0.175).

DISCUSSION

In the present study, from 52 bovine samples analyzed, 30 (57.7%) were positive by microbiological methodology for *Mycobacterium* spp. and all the isolates (100%) could be identified as belonging to *M. tuberculosis* complex with primers NZ1 and NZ2, and classified as *M. bovis* species with *pncA* PCR reactions.

Araujo et al.¹⁵ reported that among 72 bovine lymph node slaughterhouse samples, 17 were positive for mycobacterium, and 13 were confirmed by PCR with primers JB21 and JB22 as *M. bovis*. However, Shah et al.⁷ reported that out of twenty *M. tuberculosis* isolates, 12 (60%) amplified a specific fragment with JB21 and JB22 primers showing that this set of primers is not *M. bovis* specific. Still, they proved that *pncA* reaction could specifically differentiate all the isolates between *M. bovis* and *M. tuberculosis*. In concordance with these results, Nassar et al.¹⁶ reported that from 42 cultivated samples, 27 (64.3%) were positive by culture method, and all isolates

were confirmed by PCR to belong to *M. tuberculosis* complex with NZ1 and NZ2 primers and were identified as *M. bovis* with primers *pncAMB*-1.2.

The concordance between microbiological and PCR methodologies for *Mycobacterium tuberculosis* complex detection was minor ($k = 0.175$), what could be explained due to the different aspects present in the techniques. While microbiological culture depends on microorganism availability, the quality of the analyzed sample and the timing from collection and its processing, DNA detection by PCR do not depend on neither microorganism availability, nor the contamination of the sample with other microorganisms, or the timing for its processing. However, there are external factors such as the presence of inhibitors, low quantity of tuberculosis bacillus in the sample that could interfere with the PCR results^{17,18}. The low concordance between microbiological culture and PCR achieved in this study differs from the one described by Suffys et al.¹⁸ when utilizing primers that hybridize the IS6110 of the *M. tuberculosis* genome with clinical samples, and reported 67% of positivity rate, while the current work showed a positivity of 11.5% with primers NZ1 e NZ2. This difference can be due to

the fact that the IS 6110 are present in multiple copies (8 at 20) all through the genome, while the IS 1081 used in detection of *M. tuberculosis* complex presents only a couple (2 to 6) copies¹⁹. Anyway, both reactions did not present an analytical sensitivity low enough to substitute the microbiological culture.

In the current work, the growth of suggestive colonies of *Mycobacterium* spp. in selective culture media (Stonebrink e Petragnani) was observed in 30 samples, and they were all confirmed as *M. bovis* by means of PCR methodology with the primers *pncA*. The present work showed the non-applicability of PCR assay for detection of *M. tuberculosis* complex diagnosis in clinical samples using the primers NZ1 and NZ2 due to its lack of analytical sensitivity in the current conditions. However, the set of primers for *pncA* gene showed to be able to differentiate isolates between *M. tuberculosis* and *M. bovis* species, allowing a shorter period for this identification if compared with biochemical tests, since such confirmation is needed for epidemiological studies and for tracing preventive and control measures.

REFERENCES

1. Cousins DV, Bastida R, Cataldi A, Quse V, Redrobe S, Dow S, et al. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp.nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2003;53:1305-14.
2. Corner LA. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet Microbiol*. 1994;40:53-63.
3. Anualpec. 2004. Anuário da Pecuária Brasileira. FNP Editors, p. 1-386. [Acesso em 2009 abr. 1]. Disponível em: [http://www.fnp.com.br].
4. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília. Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose – PNCEBT. Manual Técnico. 2006:184.
5. Cedeño I, De Obaidía R, Sanjurjo O, Bayard V, Ortega-Barría E, Escobar C. Use of the polymerase chain reaction for diagnosing bovine tuberculosis in Panama. *Rev Sci Tech*. 2005;24(3):1067-75.
6. Niyaz Ahmed AS, Khan JR, Ganai NA. DNA amplification assay for rapid detection of bovine tubercle bacilli in semen. *Anim Reprod Sci*. 1999;57:15-21.
7. Shah DH, Verma R, Bakshi CS, Singh RK. A multiplex-PCR for the differentiation of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol Letter*. 2002;214:39-43.
8. Kantor IN. *Bacteriologia de la tuberculosis humana y animal*. OPAS/OMS. 1979;11:63.
9. Bier O. *Bacteriologia e Imunologia*. In: *Micobaterias*. São Paulo: Edições Melhoramentos; 1978. p. 585-610.
10. Wards BJ, Collins DM, Lisle GW. Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. *Vet Microbiol*. 1995;43:227-40.
11. Bermer-Melchior P, Drugeon HB. Inactivation of *Mycobacterium tuberculosis* for DNA typing analysis. *J Clin Microbiol*. 1999;37(7):2350-51.
12. Collins DM, Stephens DM. Identification of the insertion sequence, IS1081, in *Mycobacterium bovis*. *FEMS Microbiol Letters*. 1991;83:11-6.
13. De Los Monteros LEE, Galán JC, Gutiérrez SS, Marín JFG, Dominguez L, Rafael L, et al. Allele-specific PCR method based on *pncA* and *oxyR* for distinguishing *Mycobacterium bovis* from *Mycobacterium tuberculosis*: Intraspecific *M. bovis pncA* sequence polymorphism. *J Clin Microbiol*. 1998;36(1):239-42.
14. Thrusfield D. *Diagnostic testing*. In: *Vet Epidemiol*. London: The University Press; 1995. p. 266-85.
15. Araújo CP, Leite CQF, Prince KA, Jorge KSG, Osório ALAR. *Mycobacterium bovis* identification by molecular method from post-mortem inspected cattle obtained in abattoirs of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100(7):749-52.
16. Nassar AFC, Miyashiro M, Oliveira CG, Pacheco WA, Ogata RA. Isolation and identification of bovine tuberculosis in a Brazilian herd (São Paulo). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;102(5):639-42.
17. Brisson-Noël A, Aznar C, Chureau C, Nguyen S, Pierre C, Bartoli M, et al. Diagnosis of tuberculosis by DNA amplification in clinical practice evaluation. *The Lancet*. 1991;338:364-6.
18. Suffys P, Vanderborgh PR, Santos PB, Correa LAP, Bravin Y, Kritski AL. Inhibition of the polymerase chain reaction by sputum samples from tuberculosis patients after processing using a silica-guanidiniumthiocyanate DNA isolation procedure. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001;96(8):1137-9.
19. Zanini MS, Moreira EC, Lopes MTP, Oliveira RS, Leão SC, Fiovaranti RL. *Mycobacterium bovis*: polymerase chain reaction identification in bovine lymphonode biopses and genotyping in isolates from Southeast Brazil by spoligotyping and restriction fragment length polymorphism. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001;96(1):2089-813.

Isolation of *Staphylococcus* from minas frescal type cheese and detection of enterotoxin genes

Isolamento de *Staphylococcus* de queijo minas frescal e detecção de genes de enterotoxinas

RIALA6/1462

Juliana de Castro Beltrão da COSTA*, Elaine Ibrahim de FREITAS, Anderson Almeida de LEMOS, Carla de Oliveira ROSAS, Valéria de Mello MEDEIROS, Márcia Barbosa WARNKEN, Neide Hiromi Tokumaru MIYAZAKI^{in memoriam}, Victor Augustus MARIN

*Endereço para correspondência: Departamento de Microbiologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brasil. Tel/Fax: (21) 3865-6151 / 2290-0915. E-mail: juliana.costa@incqs.fiocruz.br

Recebido: 27.03.2011 - Aceito para publicação: 08.06.2012

RESUMO

Neste trabalho foi realizado o isolamento de *Staphylococcus* spp. de queijo minas frescal, e para esta finalidade foi padronizado um protocolo multiplex PCR (M-PCR) para efetuar a detecção de genes de enterotoxinas clássicas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*) de *Staphylococcus aureus*, usando-se o gene *femA* como controle positivo para cepas de *S. aureus*. Foi testada a detecção direta de bactérias de amostras de queijo minas frescal e do alimento artificialmente contaminado. Cento e onze colônias (104 coagulase-positivas e sete coagulase-negativas) foram selecionadas e analisadas por M-PCR e, dentre essas, 34 colônias (30.62%) foram positivas para pelo menos um dos cinco genes de enterotoxinas analisados. Os genes que codificam as enterotoxinas *sea* e *seb* foram os mais frequentemente detectados. O estudo de isolamento de estafilococos coagulase-positivos revelaram que 40% das amostras demonstraram contagens bacterianas acima do limite considerado como aceitável pela legislação brasileira.

Palavras chave. PCR, *Staphylococcus*, queijo.

ABSTRACT

This work aimed at isolating *Staphylococcus* spp. from minas frescal type cheese, and for this purpose a Multiplex PCR (M-PCR) was standardized for detecting the classical *Staphylococcus aureus* enterotoxin genes (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* and *see*), using the *femA* gene as a positive control for *S. aureus* strains. Bacterial detection directly from the minas frescal type cheese and from artificially contaminated food was tested. One hundred eleven colonies (104 coagulase-positive and seven coagulase-negative) were selected for performing M-PCR assay. Thirty-four colonies (30.62%) were positive for at least one of the five enterotoxin genes analyzed; enterotoxins *sea* and *seb* were the most frequently detected. The study on *Staphylococci* coagulase-positive samples revealed that 40% of the samples showed bacterial counts above the limit established by Brazilian legislation.

Keywords. PCR, *Staphylococcus*, cheese.

INTRODUCTION

Foodborne illnesses are defined as diseases, usually either infectious or toxic in nature, caused by agents that enter the body through the ingestion of contaminated food. Foodborne diseases are a widespread and growing public health problem, both in developed and developing countries. Indeed, food contamination creates an enormous social and economic burden on communities and their health systems¹.

The minas frescal type cheese is a fresh and soft white cheese produced by the enzymatic coagulation of pasteurized milk, with high pH, a minimum of 55% moisture content and a low percentage of salt (1.4-1.6%). The cheese is produced industrially by three different processes: the traditional one by the addition of a lactic acid bacteria, that by the addition of lactic acid-direct acidification, and that by the use of ultrafiltration, using the method developed by Maubois, Mocquot and Vassal² by direct coagulation of the liquid pre-cheese with the addition of rennet in its final commercial packaging³.

There are many enteropathogenic species that have been found in milk and cheese stored at low temperatures. Post-pasteurization contamination, during production, manipulation, from equipment, and inadequate cooling during transportation and storage can result in high levels of pathogenic microorganisms and enterotoxins in cheese^{4,5}. The contamination, linked to changes arising in only a few days, makes the cheese unacceptable or even unfit for consumption.

The *Staphylococcus aureus* count is used as an indicator of post-processing contamination of dairy products, aiding in the hygienic control of these products. Studies have shown that minas frescal cheese and other dairy products have been involved in several staphylococcal food intoxication outbreaks in Brazil and other countries^{5,6}. The Collegiate Directory Resolution n° 12 (published on January 2nd, 2001 by Brazil's public health agency, The National Health Surveillance Agency of Brazil (ANVISA)) establishes the Technical Regulation about Food Microbiological Standards and states that high humidity cheese, at $\pm 55\%$, including minas frescal type cheese and others, must be investigated for the following microorganisms groups: coliforms at 45 °C (the maximum permissible 5×10^2 CFU/g), coagulase-positive staphylococci (the maximum permissible 5×10^2 CFU/g), *Salmonella* spp. (absent in 25 g) and *Listeria monocytogenes* (absent in 25 g)⁷.

The intoxication caused by *S. aureus* is manifested soon after the ingestion of food contaminated with pre-formed enterotoxin. The amount of enterotoxin required to cause disease is not well established, but it is known that susceptibility depends on the individual, body weight and especially the health status of the affected person. To form enterotoxins in sufficient quantity to cause intoxication, 10^5 to 10^6 *S. aureus* cells are required per gram of food⁸. The growth of *S. aureus* and production of enterotoxins are affected by physical and chemical parameters such as temperature, pH, water activity, salt concentration and the availability of oxygen⁹.

Some species of coagulase-negative staphylococci (CoNS) can present a medical risk¹⁰. Staphylococci species used in cheese-making are novobiocin-resistant, coagulase-negative and are not usually identified at species level by routine laboratories. The high prevalence of CoNS and their pathogenic potential (existence of enterotoxigenic and multidrug-resistant strains) have not been clearly identified, but this is increasingly necessary for assessing the safety status of the CoNS utilized in fermented dairy foods¹¹. In a study by Veras et al.² identifying enterotoxin genes from isolates of CoNS and coagulase-positive staphylococci obtained from dairy products, CoNS were responsible for 16 outbreaks of food poisoning in Minas Gerais, Brazil and showed the ability to produce active toxin.

The staphylococcal enterotoxins are a group of proteins, with low molecular weight (26 to 30 KDalton) that are produced during all stages of bacterial growth in culture, but mainly during the middle and end of the exponential growth phase¹³. They were named with alphabetical characters according to the chronological order in which they were discovered⁹.

S. aureus produces a wide variety of toxins including staphylococcal enterotoxins (SEs; SEA to SEE, SEG to SEI, SER to SET) with demonstrated emetic activity, and staphylococcal-like (SE/) proteins, which are not emetic in a primate model (SE/L and SE/Q) or have yet to be tested (SE/J, SE/K, SE/M to SE/P, SE/U, SE/U2 and SE/V)¹⁴. SEs and SE/s have been traditionally subdivided into classical (SEA to SEE) and new (SEG to SE/U2) types. All have superantigenic activity and are encoded by accessory genetic elements, including plasmids, prophages, pathogenicity islands, genes located next to the staphylococcal cassette chromosome (SCC) implicated in methicillin resistance, or by vSa genomic islands (vSa refers to non-phage and non-

SCC genomic islands)¹⁴. SEA is the most common cause of staphylococcal food poisoning worldwide, but the involvement of other classical SEs has also been demonstrated. Of the new SE/SE/s, only SEH has clearly been associated with food poisoning. However, genes encoding novel SEs as well as SE/s with untested emetic activity are widely represented in *S. aureus*, and their role in pathogenesis may be underestimated¹⁴.

Bacterial detection methods based on PCR can be utilized to characterize strains that are isolated and purified by traditional cultivation methods. They aid in the conventional final stage methods such as the biochemical and serological confirmations. PCR can also be utilized to detect food bacteria by applying it directly to food products, pre-enrichment broth or in the selective process containing mixed cultivation. It can be applied after a short step of sample preparation involving bacterial concentration and rupture¹⁵.

The goal of this work was to quantify the presence of coagulase-positive staphylococcus in minas frescal cheese acquired from supermarkets in Rio de Janeiro and to use a Multiplex-PCR (M-PCR) protocol for the detection of genes that code for the staphylococcal enterotoxins *sea*, *seb*, *sec*, *sed* and *see* in coagulase-positive and coagulase-negative staphylococci (using the *femA* gene as a positive-control for *S. aureus*).

MATERIALS AND METHODS

Minas frescal type cheese sample gathering

Thirty samples of minas frescal type cheese, weighting at least 200 g each and obtained from 10 units of 3 different commercial brands, were purchased at supermarkets from the State of Rio de Janeiro, Brazil. All cheese was made with pasteurized milk, inspected by the Brazilian sanitization authority and kept under refrigeration in the supermarkets. Of those, 10 samples were commercialized in plastic containers, 10 in vacuum-sealed plastic containers (both types of samples were produced by lactic acid-direct acidification), and 10 in low density vacuum sealed polyethylene containers (cheese made by the ultrafiltration process). The temperature of the supermarket distribution freezers was analyzed, and the average temperature measured at the time of sample collection was 8 °C. The samples were transported on ice to the laboratory of the National Institute for Quality Control in Health (INCQS, Brazil) and were analyzed before their expiration date.

Count of coagulase-positive *Staphylococcus*

Staphylococci isolation and counts of the coagulase-positive *Staphylococcus* were conducted according to the American Public Health Association¹⁶ and Food and Drug Administration¹⁷. Twenty-five grams of each cheese were homogenized in 225 mL of Butterfield's phosphate buffer in a Stomacher (Seward Medical, Blend 400). The sample dilutions were plated on Baird Parker agar and incubated at 35 °C for 45-48 h.

For the counts performed in this study, only coagulase-positive *Staphylococcus* isolates were used, according to the Collegiate Directory Resolution n° 12⁷, and Baird-Parker agar (Oxoid) plates with the same dilution were selected, which presented 20 to 200 dark gray to black circular, smooth, humid colonies, surrounded or not by a transparent, double or opaque halo. During counting, two or more types of colonies were classified, listed and sent for identification separately, with verification of morphological characteristics using Gram staining and tests of catalase activity, coagulase production, thermonuclease production, lysostaphin sensitivity and anaerobic utilization of glucose and mannitol.

Table 1 shows counts for 24 samples, since 6 of them were not tested for the evidence of coagulase due to timing issues. Therefore these samples (samples 12, 13, 15, 23, 24 and 26) were excluded from the count of *Staphylococcus* coagulase-positive.

Table 1. Count of *Staphylococcus* coagulase-positive

Staphylococci coagulase-positive/g isolate from minas frescal cheese (CFU/g)	Number of samples with this count	%
<10 ²	10	33,34
> 10 ⁰ / 10 ²	2	6,67
> 5 x 10 ² / 10 ³	4	13,33
> 10 ³ / 10 ⁴	5	16,66
> 10 ⁵	3	10
Not tested	6	20
Total	30	100

Total number of 142 staphylococci coagulase-positive colonies isolated from 20 samples of minas frescal cheese

M-PCR to detect enterotoxin genes from isolates of minas frescal cheese

One hundred eleven colonies (104 coagulase-positive and seven CoNS) were selected for M-PCR in order to detect the genes that code for the A, B, C, D and

E enterotoxins and the *femA* gene. Those colonies were isolated from the minas frescal type cheese samples and randomly selected in a way that the different batches were analyzed: sample 2 (14 colonies analyzed), sample 3 (15 colonies analyzed), sample 5 (15 colonies analyzed), sample 11 (13 colonies analyzed), sample 21 (7 colonies analyzed), sample 22 (6 colonies analyzed), sample 25 (9 colonies analyzed), sample 27 (15 colonies analyzed), sample 28 (8 colonies analyzed) and sample 30 (9 colonies analyzed).

Reference strains

S. aureus ATCC 13565 (*sea*), ATCC 14458 (*seb*), ATCC 19095 (*sec*), ATCC 23235 (*sed*) and ATCC 27664 (*see*) strains were analyzed by M-PCR. All strains possess the *femA* gene, which encodes a precursor protein that plays a role in peptidoglycan biosynthesis in *S. aureus* and is also considered as a factor influencing the level of methicillin resistance^{12,18}. As an internal positive control for each reaction, we incorporated primers specifically designed to amplify *femA*, which have been reported by Mehrotra et al.¹⁹ to be specific for *S. aureus*.

Artificial food contamination

The protocol of artificial food contamination was designed in this study, based in the protocol designed by Wang et al.²⁰ e Mehrotra et al.¹⁹.

The *sea*, *seb*, *sec* and *sed* enterotoxin-producing reference strains were inoculated in 5 mL Nutrient Broth, and the *see* enterotoxin-producing strain was inoculated in 5 mL Brain Heart Infusion broth (BHI). The cultures were incubated for 16-24 h at 35 ± 2 °C with agitation. From these cultures, serial dilutions to 10^{-9} were made, using BHI as diluent. Next, two steps were performed:

1) For each of the 10^{-6} to 10^{-9} dilutions, aliquots of 0.3, 0.3 and 0.4 mL (total of 1 mL) were spread on the surface of 12 nutrient agar plates. The inoculums were spread with the help of a Drigalsky spatel. The plates were then incubated at 35 ± 2 °C for 48 h, in an inverted position. Plates of the same dilution were selected for colony counting, which presented from 30 to 300 circular, smooth, humid, light colored colonies. The count of viable cells of pure cultures inoculated on nutrient agar plates were on the order of 10^2 CFU/mL from the 10^{-6} dilution, 10^1 to 10^2 CFU/mL from the 10^{-7} dilution, and 1 to 10^1 CFU/mL from the 10^{-8} and 10^{-9} dilutions.

2) Ten Erlenmeyer flasks containing 220 mL of tryptic soy broth with 0.6% yeast extract (TSBYE)²⁰ and 25

grams of frescal minas cheese were used in this step for each reference strain. Two flasks were inoculated with 1 mL of the 10^{-6} dilution, two flasks with 10^{-7} dilution, two flasks with 10^{-8} dilution, and two flasks with 10^{-9} dilution of each reference strain, respectively. Two flasks were not inoculated.

The flasks were incubated for 16-24 h at 35 ± 2 °C with agitation (Wrist Action® Skaker. Model 75 – Burrell – Burrell Corporation Pittsburgh, P.A., USA). After this period, 100 µL aliquots were removed from each flask and added to tubes containing 10 mL of TSBYE broth. The tubes were incubated for 16-24 h at 35 ± 2 °C with agitation.

After the incubation, 100 µL aliquots were removed from each tube and added to tubes containing 10 mL of TSBYE broth. The tubes were incubated for 16-24 h at 35 ± 2 °C with agitation. At the end of the incubation, DNA was extracted from the cultures and M-PCR was performed.

Bacterial detection directly from the minas frescal type cheese

This procedure was originally designed in this study. It differs from the previously procedure explained, since this time, this procedure simulates the detection of the microorganisms directly from the minas frescal type cheese, without passing through any step of microbial growth.

Six Erlenmeyer flasks were prepared: 1 and 2: containing 220 mL of TSBYE broth, 25 g of minas frescal type cheese and 1 mL of each of the 24 h bacterial cultures of the *sea*, *seb*, *sec* and *sed* enterotoxin-producing reference strains inoculated previously in 5 mL Nutrient Broth, and the *see* enterotoxin-producing strain previously inoculated in 5 mL Brain Heart Infusion broth (BHI) (total 5 mL). 3 and 4 containing: 220 mL TSBYE broth and 25 g of minas frescal type cheese; and 5 and 6 containing 220 mL of TSBYE broth and 1 mL of the bacterial cultures of each of the reference strains (total 5 mL). Next, one procedure was performed:

1) Aliquots of 0.5 mL and of 1 mL were removed from flasks after 24 and 48 h of incubation, for subsequent DNA extraction and M-PCR.

RESULTS

Count of coagulase-positive *Staphylococcus*

Thirty samples of minas frescal type cheese were analyzed of three different brands. Ten cheese samples

Table 2. Primer sequences, gene location and amplicon size

Gene	Sequence (5'/ 3')	Gene location	Amplicon size (bp)*
<i>sea</i>	GGTTATCAATGTGCGGGTGG	349/368	102
	CGGCACTTTTTTCTCTTCGG	431/450	
<i>seb</i>	GTATGGTGGTGTAAGTACGAGC	666/685	164
	CCAATAAGTGACGAGTTAGG	810/829	
<i>sec</i>	AGATGAAGTAGTTGATGTGTATGG	432/514	451
	CACACTTTTAGAATCAACCG	863/882	
<i>sed</i>	CCAATAATAGGAGAAAATAAAAAG	492/514	278
	ATTGGTATTTTTTTTCGTTTC	750/769	
<i>see</i>	AGGTTTTTTTCACAGGTCATCC	237/257	209
	CTTTTTTTTCTTCGGTCAATC	425/445	
<i>femA</i>	AAAAAAGCACATAACAAGCG	1444/1463	132
	GATAAAGAAGAAACCAGCAG	1556/1575	

* bp = base pairs / Nucleotide sequences and location genes for *sea* were obtained from Betley & Mekalanos (1988), for *seb* from Jones & Khan (1986), for *sec* from Bohach & Schlievert (1987), for *sed* from Bayles & Iandolo (1989), for *see* from Couch, Soltis & Betley (1988) and for *femA* from Berger-Bachi et al.(1989).

(33.34%, numbered 6, 7, 8, 9, 10, 16, 17, 18, 19 and 20) showed counts of coagulase-positive *Staphylococcus* lower than 10² CFU/g, and were from vacuum sealed plastic containers. Six samples (20% of the total of samples) were not tested for counts of coagulase-positive *Staphylococcus* as explained above in the materials and methods.

The samples of minas frescal type cheese number 11 and 15 (6.67%) had coagulase-positive *Staphylococcus* counts of 5 x 10² CFU/g in accordance to the limits established by RDC 12⁷. However, 40% of the samples were in violation of the limit established by legislation, which, according to Jablonski et al.⁸, is enough for enterotoxin production. The results of count of *Staphylococcus* coagulase-positive in the minas frescal type cheese samples are showed in Table 2.

M-PCR to detect enterotoxin genes from isolates of minas frescal type Cheese

Of the 111 colonies that were isolated and selected for M-PCR for genes of the *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see* enterotoxins and *femA*, 104 were coagulase-positive and seven were CoNS.

Once hundred and eleven colonies isolated from cheese samples were analyzed by M-PCR, and 34 (30.62%) were positive for at least one of the five enterotoxin genes (Table 3).

From seven CoNS analyzed by M-PCR, four were negative for all genes analyzed, one was positive for *femA* and *sed*, and two were positive only for *sed*.

None of the strains contained the *sec* and *see* genes.

Table 3. *Staphylococcus* spp. enterotoxin genes from 111 isolated colonies and selected for Multiplex-PCR

Gene	Number of colonies	%
<i>femA</i>	39	35,14
<i>femA</i> + <i>sea</i> + <i>seb</i>	15	13,51
<i>Sea</i>	5	4,50
<i>sea</i> + <i>seb</i>	9	8,11
<i>Sed</i>	2	1,80
<i>femA</i> + <i>sed</i>	3	2,70
Neither	38	34,24
Total	111	100

Artificial Food Contamination

In the second stage of the artificial contamination, in which approximately 10 to 100 CFU/mL of each of the strains were inoculated to samples of minas frescal type cheese, and there were two incubation periods with TSBYE, the M-PCR was negative. Of the six target genes, only the enterotoxin D gene was amplified; the viable cell count was approximately 2.0 to 2.7 x 10² CFU/mL. Therefore, the sensitivity of M-PCR for this gene was from 10 to 100 cells.

DNA was extracted from cultures using a Qiagen kit and the protocol of Wang et al.¹⁹ The best method of extraction after artificial contamination was with the Qiagen kit, because it facilitated standardization.

Bacteria detection directly from the minas frescal type cheese

The amplification products of M-PCR for direct detection of bacteria on minas frescal type cheese were ineffective in the amplification of all target genes (*sea*,

seb, *sec*, *sed*, *see* and *femA*). These data showed that for minas frescal type cheese it is necessary to first isolate coagulase-positive *Staphylococcus* colonies and then proceed to DNA extraction and M-PCR.

DISCUSSION

From the 30 minas frescal type cheese samples analyzed, 12 (40%) showed *Staphylococcus* coagulase-positive counts above the maximum limits (5×10^2 CFU/g) allowed by ANVISA⁷. These counts are similar to those found by Carmo et al.²², Almeida Filho et al.⁴, Loguercio and Aleixo²³ and Araújo et al.⁵ Furthermore, 10% of the samples showed values that are near the zone of enterotoxin production that initiates staphylococcal food poisoning. Carvalho et al.³ evaluated the influence of three different cheese-making processes on the physicochemical characteristics and the microbiological quality of Brazilian minas frescal type cheese. For coagulase-positive staphylococcal strains, the cheeses produced by the traditional addition of a lactic culture represented the worst case, with 12.9% of the samples showing more than 10^3 CFU/g (the maximum acceptable limit established by the Brazilian regulations for the process of addition of a lactic acid culture⁷) followed by the cheeses made by direct acidification (9.7% above the acceptable limit of 5×10^2 CFU/g).

In Carvalho et al.³, only the cheeses produced by the use of ultrafiltration showed negative results, probably due to the closed system process with no handling after pasteurization. In our study, we found similar results; samples from vacuum-sealed plastic containers, which are also produced by the ultrafiltration process, were negative for staphylococcal contamination. The contamination of post-pasteurization, production, manipulation, and equipment, as well as inadequate temperature during the transportation and storage of cheese and the use of raw milk are all possible causes of the presence of staphylococcal contamination in the minas frescal type cheeses³.

Two protocols were utilized for the DNA extraction, one using a Qiagen Kit and the other according to Wang et al.²⁰ Both methods were efficient, but the chosen method was the Qiagen Kit because it facilitated standardization.

The results of the artificial contamination and the bacterial detection directly from the minas frescal

type cheese showed that it is necessary to isolate the coagulase-positive staphylococcal colonies before DNA extraction for this food matrix. In the Artificial Food Contamination experiments (Sensibility Test and Live Bacteria Detection), the M-PCRs were negative, and nonspecific amplicons were found in the bacteria detection directly from the minas frescal type cheese. In the artificial contamination and bacteria detection directly from the minas frescal type cheese, the five strains were inoculated together in the TSBYE broth. The M-PCR results were negative, and this could be due to growth interference among the strains.

This result is in disagreement with Ercolini et al.²⁴ who detected the enterotoxin SEG and SEH genes by PCR directly from artificially contaminated raw milk. They also tested samples (with PCR) of artificially contaminated raw milk that were incubated for 24 to 48 h for culture enrichment. The results showed that after 48 h enrichment, all target genes (*sec*, *seg*, *seh* and *sei*) were amplified. However, results similar to those of our study were found by McLauchlin et al.²⁵ for artificially contaminated samples of canned mushroom soup, cream, cottage cheese, mozzarella cheese, fat cheese and sliced ham. In that study, the detection of enterotoxin genes was weak or was not obtained in the four dairy products (different types of cheese and cream).

PCR based analytical methods for ascertaining the occurrence of pathogenic or toxigenic microorganisms in food are widely recognized as capable of decreasing detection time and increasing specificity and sensitivity²⁴. Unfortunately, large sample volumes (≥ 25 mL or g) compared with small amplification volumes (10–50 μ L), residual food components that inhibit enzymatic reactions (e.g., calcium ions and protein²⁶, low levels of contaminating pathogens, and the presence of competitive microbiota that may interfere with amplification and detection reactions, have been consistent stumbling blocks to the widespread use of nucleic acid amplification for pathogen detection in food²⁷). PCR has often been used for direct detection of *Staphylococcus aureus* in milk and cheeses^{28,29}, but none of these approaches are ideal, and in many cases, a technique optimized for one food system or microorganism is not readily adaptable to others^{30,31}.

The original protocol for M-PCR by Mehrotra et al.¹⁹ has several alterable parameters (i.e., annealing temperature, extension time, dNTP concentration, primers, MgCl₂ and polymerase concentration). In this

work, the annealing temperature was decreased by 5 °C to 52 °C for the amplification of the six bands. The same situation was reported by Nájera-Sánchez et al.³² who tested various annealing temperatures. In that work they observed that low annealing temperatures (48 °C to 50 °C) resulted in reduced sensitivity and specificity of the target gene because of competition between nonspecific components of the reaction.

Regarding the M-PCR for the detection of enterotoxins in the 111 isolates from minas frescal type cheese, 34 (30.62%) were positive for at least one of the five enterotoxin genes studied. These results are in accordance with Veras et al.¹², in which 15 coagulase-positive and 15 CoNS isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil were tested by PCR to detect enterotoxin genes. Veras et al.¹² found that among the 30 selected isolates, 21 harbored enterotoxin genes. Within this group, 38% amplified only *sea*, 29% amplified only *seb*, and 24% amplified both *sea* and *seb*. Genes for *sec* and *sed* (either alone or concomitantly) were detected with low frequency.

Borges et al.⁹ evaluated staphylococcal contamination and their enterotoxins in a coalho type cheese production line using an ATP bioluminescence assay. They used a VIDAS[®] Kit *Staph enterotoxin II* (BioMérieux SA, Marcy-l'Étoile, France) kit and mini VIDAS[®] equipment to detect enterotoxins in four samples of food, pasteurized milk, raw milk, curd and cheese. The staphylococcal enterotoxins were detected in 20% of the raw milk samples and therefore in pasteurized milk, curd and cheese.

Rall et al.³³ aimed to analyze the frequency of genes encoding the staphylococcal enterotoxins SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI and SEJ in *S. aureus* strains isolated from raw or pasteurized bovine milk. In the 57 strains studied, the *sea* gene, coding for enterotoxin A, was the most frequently found (16 strains, 41%), followed by *sec* (8 strains, 20.5%), *sed* (5 strains, 12.8%), *seb* (3 strains, 7.7%) and *see* (2 strains, 5.1%). Among the genes encoding the other enterotoxins, *seg* was the most frequently observed (11 strains, 28.2%), followed by *sei* (10 strains) and *seh* and *sej* (3 strains each). Rall et al.³³ showed that with the recent identification of new SEs, the perceived frequency of enterotoxigenic strains has increased, suggesting that the pathogenic potential of staphylococci may be higher than previously thought. Rall et al.³³, 39 (68.4%) strains were positive for the presence of at least one SE gene, but that number would

drop to 31 (52.5%) if only the classical enterotoxins (*sea* to *see*) were considered. Regardless, in our study, the M-PCR performance for five staphylococcal enterotoxins detections (A, B, C, D, E) provided rapid results and detected the potential risk of staphylococcal food poisoning.

In this work, the complementary test used for *Staphylococcus* colony identification was the M-PCR with *S. aureus* specific *femA* gene amplification. This gene encodes an essential factor for the resistance to methicillin and is universally present in all strains of *S. aureus*¹⁹. Interestingly, *femA* appears to be a unique feature of *S. aureus*; it is not found in other *Staphylococcus* species^{18,34}, but in this study, we found one coagulase-negative colony that was positive for the *femA* and *sed* genes. In Veras et al.¹², 15 CoNS were examined by PCR for the presence of the *femA* and *coa* genes. Isolates that amplified *coa* were considered to be coagulase-positive and there were three CoNS isolates in which the PCR detection of *femA* did occur.

Vannuffel et al.¹⁸ showed that homologous genes for *femA* are present in *S. aureus* and in certain isolates of CoNS strains as well. Indeed, a *femA* homologous gene was characterized in *S. epidermidis*, entailing the possibility of *femA* phylogenetic conservation in staphylococcal species. The genomic organization of all these *femA* genes appeared highly conserved, with alternation of homologous and variable regions. Homology of the nucleic acid sequence in that study ranged from 75.1% to 78.3% among the *S. aureus* and CoNS analyzed¹². In our study, the coagulase type of the isolates was determined only by biochemical, not molecular, methods (i.e. detection of the *coa* gene).

With respect to the detection of the *femA* gene, 57 (51%) of 111 colonies analyzed amplified this gene. The fact that 49% did not amplify *femA* may indicate that these 54 colonies are not *S. aureus*. Borges et al.⁹ detected twelve *Staphylococcus* species within the selected 68 isolates, nine being negative and three positive for coagulase. In cheese, six species were identified among 16 isolates, with the prevalence of 37.5% for *S. epidermidis*, 25% for *S. xylosum*, 18.8% for *S. aureus*, 6.2% for *S. cohnii*, 6.2% for *S. haemolyticus* and 6.2% for *S. lentus*. There was a high frequency (81.3%) of CoNS and a low frequency (18.7%) of coagulase-positive species in the samples. *S. aureus* was found in 12% of the cheeses analyzed.

From seven CoNS analyzed by M-PCR, four were negative for all genes analyzed, one was positive for *femA*

and *sed* and two were positive only for *sed*. Indeed, several studies have shown that some CoNS species possess the genes for SE and can produce functional toxin¹². In Veras et al.¹², five of the CoNS isolates were genotypically and phenotypically enterotoxigenic, and these isolates displayed the ability to produce active toxin capable of detection by immunological methods. The CoNS present in minas frescal type cheese have the potential to produce enterotoxins and because of this, it would be interesting to include these groups of microorganisms in the Collegiate Directory Resolution no. 12 for greater protection of consumers of this type of food.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support and the Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/Fiocruz) for operational support for this study.

REFERENCES

1. World Health Organization, 2007. Food Safety and Foodborne Illness. 2007. [acesso 2010 mar 14]. Disponível em: [http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/].
2. Maubois JL, Mocquot G. Application of membrane ultrafiltration to preparation of various types of cheeses. *J Dairy Sci*. 1975;58:1001-7.
3. Carvalho JDG, Viotto WH, Kuaye AY. The quality of Minas Frescal cheese produced by different technological processes. *Food Control*. 2007;18:262-7.
4. Almeida Filho ES, Nader Filho A. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo "frescal". *Rev Saúde Pública*. 2000;34:578-80.
5. Araújo VS, Pagliares V A, Queiroz M LP, Freitas-Almeida AC. Occurrence of *Staphylococcus* and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *J Appl Microbiol*. 2002;92:1172-7.
6. Ikeda T, Tamate N, Yamaguchi K, Nakino S-i. Mass outbreak of food poisoning disease caused by small amounts of staphylococcal enterotoxins A and H. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71(5):2793-5.
7. 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, DF, 10 jan 2001. Seção 1, n. 7-E, p. 45-53.
8. Jablonski LM, Bohach GA. *Staphylococcus aureus*. In: L. Beuchat, M. Doyle & T. Montville (Eds). *Fundamentals of Food Microbiology*. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2001. p. 410-34.
9. Borges ME, Arcuri EF, Pereira JL, Feitosa T, Kuaye AY. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em leite e produtos lácteos, suas enterotoxinas e genes associados: revisão. *Bol Centro Pesq Proc Alim*. jan/jun 2008;26:71-86. Disponível em: [http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs2/index.php/alimentos/article/view/11794/8312].
10. Samelis J, Mataxopoulos J, Vlasi M, 1998. Stability and safety of traditional greek salami: a microbiology ecology study. *Int J Food Microbiol*. 1998;44:69-82.
11. Irlinger F. Safety assessment of dairy microorganisms: Coagulase-negative staphylococci. *Int J Food Microbiol*. 2008;126:302-10.
12. Veras JF, do Carmo LS, Tong LC, Shupp JW, Cummings C, dos Santos DA, et al. A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. *Int J Infect Dis*. 2008;12:410-5.
13. Soriano JM, Font G, Moltó C, Mañes J. Enterotoxigenic staphylococci and their toxins in restaurant foods. *Trends Food Sci Technol*. 2002;13:60-7.
14. Argudín MÁ, Mendoza MC, Rodicio MR. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. *Toxins*. 2010;2:1751-73.
15. Rippens NP, Herman LMF. Molecular Methods for Identification and Detection of Bacterial Food Pathogens. *J AOAC Int*. 2002;85:984-95.
16. Lancette GA, Bennett RW. *Staphylococcus aureus*. In: Downes FP, Ito K, (Eds). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4. ed. Washington, DC: APHA; 2001. p. 387-400.
17. Bennett RW, Lancette GA. *Staphylococcus aureus*. In: Food and Drug Administration. *Bacteriological analytical manual* (8^a ed., rev. A). Arlington: AOAC/FDA; 1998. p. 12.01-12.05.
18. Vannuffel P, Heusterspreute M, Bouyer M, Vandercam B, Philippe M, Gala JL. Molecular characterization of *femA* from *Staphylococcus hominis* and *Staphylococcus saprophyticus*, and *femA*-based discrimination of staphylococcal species. *Res Microbiol*. 1999;150:129-41.
19. Mehrotra M, Wang G, Johnson WM. Multiplex PCR for Detection of Genes for *Staphylococcus aureus* Enterotoxins, Exfoliative Toxins, Toxic Shock Syndrome Toxin 1, and Methicillin Resistance. *J Clin Microbiol*. 2000;38:1032-35.
20. Wang RF, Cao WW, Cerniglia CE. A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods. *J Appl Microbiol*. 1997;83:727-36.
21. Sambrook J, Russel DW. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 3^a ed., vol. 3. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
22. Carmo LS, Dias RS, Linardi VR, Sena MJ, Santos DA, Faria ME, et al. Food Poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiol*. 2002;19:9-14.
23. Loguercio AP, Aleixo JAG. Microbiologia de queijo minas frescal produzido artesanalmente. *Cienc Rural*. 2001;31:1063-67.
24. Ercolini D, Blaiotta G, Fusco V, Coppola S. PCR-based detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in the early stages of raw milk cheese making. *J Appl Microbiol*. 2004;96:1090-8.
25. Mclauchlin J, Narayanan GL, Mithani V, O'Neill G. The detection of enterotoxins and Toxic Shock Syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by Polymerase Chain Reaction. *J Food Prot*. 2000;63:479-488.
26. Wilson IG. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol*. 1997;63:3741-51.

27. Bej AK, Mahbubani MH. Detection of foodborne microbial pathogens. In: Griffin H, Griffin A (Eds). PCR Technology: Current Innovations. Boca Raton: CRC Press; 1994. p. 341-65.
28. Kim C-H, Khan M, Morin DE, Hurley WL, Tripathy DN, Kehrli MJ, et al. Optimisation of the PC for detection of *Staphylococcus aureus* nuc gene in bovine milk. *J Dairy Sci*. 2001;84:74-83.
29. Tamarapu S, McKillip JL, Drake M. Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of *Staphylococcus aureus* in dairy products. *J Food Prot*. 2001;64:664-8.
30. Baruzzi F, Matarante A, Caputo L, Morea M. Development of a culture-independent polymerase chain reaction-based assay for the detection of Lactobacilli in stretched cheese. *J Rapid Methods Autom Microbiol*. 2005;13:177-192.
31. Cremonesi P, Perez G, Pisoni G, Moroni P, Morandi S, Luzzana M, et al. Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates in raw milk cheese. *Lett Appl Microbiol*. 2007;45:587-91.
32. Nájera-Sánchez G, Maldonado-Rodríguez R, Olvera PR, Garza LM. Development of two multiplex polymerase chain reactions for the detection of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* isolated from foods. *J Food Protect*. 2003;66:1055-62.
33. Rall VLM, Vieira FP, Rall R, Vieitis RL, Fernandes Jr A, Candeias JMG., et al. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw and pasteurized milk. *Vet Microbiol*. 2008;132:408-13.
34. Ünal S, Hoskins J, Flokowitsch JE, Wu CYE, Preston DA, Skatrud PL. Detection of methicillin-resistant staphylococci by using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1992;30:1685-91.

Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de queijos coalho

Profile of susceptibility of bacteria, isolated from curdle cheese

RIALA6/1463

Alaíse Gil GUIMARÃES^{1*}, Ryzia de Cassia Vieira CARDOSO², Priscila Florêncio AZEVÊDO¹, Roberta Barbosa de MENESES²

*Endereço para correspondência: 1Departamento de Análises Bromatológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Av. Barão de Jeremoabo, s/n, Campus Universitário de Ondina, CEP: 40170-115, Salvador, BA. Fone: (71) 3383-6920. E-mail: alaise@ufba.br

²Departamento de Ciência de Alimentos, Escola de Nutrição, UFBA

Recebido: 31.10.2011- Aceito para publicação: 29.06.2012

RESUMO

A susceptibilidade antimicrobiana de isolados de *Escherichia coli*, (36), *Staphylococcus* coagulase positiva (15) e *Salmonella* spp. (16) provenientes de queijos coalho comercializados na orla de Salvador (BA) foi avaliada pelo método de difusão. Os antibióticos testados foram ampicilina (AMP), amoxicilina/ácido clavulânico (AMC), cefalotina (CFL), cefotaxima (CTX), levofloxacina (LVX), ciprofloxacina (CIP), norfloxacina (NOR), clorafenicol (CLO), tetraciclina (TET), nitrofurantoína (NIT), gentamicina (GEN), sulfametoxazol-trimetropim (SUT), eritromicina (ERI) e oxacilina (OXA). Todos os isolados de *E. coli* apresentaram susceptibilidade aos antibióticos CIP, CTX, LVX, NOR, TET e SUT, enquanto 10 mostraram-se resistentes a AMP, GEN, AMC, CLO, NIT e CFL, sendo uma delas resistente a quatro antibióticos. Os isolados de *Salmonella* entérica subsp. *enterica*, sorovares: Hadar (7), Newport (6), Ohio (2) e Oranienburg (1) foram susceptíveis aos antibióticos CLO, CIP, LVX, CTX, SUT, GEN e NOR. S. Oranienburg mostrou-se multiresistente a quatro antibióticos. Para *Staphylococcus* coagulase positiva NIT, TET, CLO e SUT foram eficazes; no entanto, verificou-se resistência a GEN, OXA (13,3%) e a ERI (26,7%). Os resultados apontam que os antibióticos de uso comum em terapêutica humana e veterinária não foram eficazes contra os micro-organismos testados, tornando essencial a adoção de medidas para controlar o uso indiscriminado na terapêutica humana e animal e, conseqüentemente, reduzir o aparecimento de resistência.

Palavras-chave. susceptibilidade antimicrobiana, método de disco-difusão, queijos artesanais, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* coagulase positiva, *Salmonella* spp.

ABSTRACT

The susceptibility of *Escherichia coli* (36), *Staphylococcus* coagulase positive (15) and *Salmonella* spp. (16) isolated from curdle cheese commercialized on the coast of Salvador-BA, was assayed by the disk diffusion method. The antibiotics tested were ampicillin (AMP), amoxicillin/acid clavulanate (AMC), cephalothin (CFL), cefotaxime (CTX), levofloxacin (LVX), ciprofloxacin (CIP), norfloxacin (NOR), chloramphenicol (CLO), tetracycline (TET), nitrofurantoin (NIT), gentamicin (GEN), trimethoprim-sulfamethoxazole (SUT), erythromycin (ERI) and oxacillin (OXA). All strains of *E. coli* were susceptible to CIP, CTX, LVX, NOR, TET and SUT, while 10 strains were resistant to AMP, GEN, AMC, CLO, NIT and CFL, one of them being resistant to four antibiotics. The strains of *Salmonella* enteric subsp. enteric (7), Newport (6), Ohio (2) and Oranienburg (1) were sensitive to antibiotics CLO, CIP, LVX, CTX, SUT, GEN and NOR. *Salmonella* Oranienburg was found to be multiresistant to four antibiotics. For *Staphylococcus* coagulase positive NIT, TET, SUT and CLO were effective. However some of them were resistant to GEN, OXA (13.3%) and to ERI (26.7%). Results indicate that antibiotics used in human therapeutic and veterinarian were not effective against some studied microorganisms, making it essential the adoptions of measures to control the indiscriminate use in therapeutic in humans and animals, to reduce the resistance.

Keywords. susceptibility, disk diffusion method, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* coagulase positive, *Salmonella* spp.

INTRODUÇÃO

Entende-se por comida de rua os alimentos e bebidas vendidos em vias públicas, prontos para o consumo imediato ou posterior e que não requerem outras etapas de preparo, incluindo frutas. Os alimentos de rua asseguram o fornecimento de preparações típicas, preservando a cultura local e o atendimento a turistas. Em Salvador (BA), a comida de rua configura-se como parte da história e da cultura. Nas praias, de modo marcante, a venda da comida de rua constitui também uma realidade de trabalho para crianças e adolescentes e representa um problema de saúde pública, pois, salvo algumas exceções, os alimentos são preparados e vendidos sem as mínimas condições de higiene, podendo conter micro-organismos contaminantes e potencialmente patogênicos, colocando em risco a saúde de quem os consome^{1,2}.

Entre os alimentos comercializados por este grupo de vendedores, o queijo coalho é um dos mais apreciados, ainda que a maior parte desse produto tenha sua origem vinculada à fabricação artesanal, em numerosas unidades de produção caseira e propriedades rurais de pequeno porte. Por ser elaborado a partir de leite não pasteurizado e sem os devidos cuidados de higiene, o queijo coalho não apresenta segurança microbiológica e padronização da qualidade e considera-se que as condições de sua comercialização nas praias, exposto à radiação solar por longo tempo, agravam, ainda mais, a sua condição sanitária, potencializando riscos à saúde pública^{3,6}.

Nesta perspectiva, o comércio de alimentos em vias públicas tem recebido, atualmente, grande atenção das autoridades e organizações internacionais, que concentram esforços na análise dos impactos econômicos, sociais e sanitários dessa atividade⁷.

Em se tratando do comércio informal do leite e derivados, muitos micro-organismos têm sido evidenciados, entre eles *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus*, que indicam condições higiênico-sanitárias insatisfatórias e consistem em perigos para a saúde da população que os consome⁸.

Considerando a importância epidemiológica que representa a identificação de patógenos causadores de processos infecciosos no homem, em termos de clínica e terapêutica, o teste de susceptibilidade aos antimicrobianos (antibiograma) assume grande relevância para a saúde pública⁹.

De acordo com Katsunuma et al.¹⁰, Manges et al.¹¹, Ramchandani et al.¹² e Shiraki et al.¹³, a emergência da resistência aos antimicrobianos é mais um fator de preocupação para o estabelecimento e a manutenção de doenças na população. Trabalhos têm mostrado que cepas multirresistentes a drogas isoladas de humanos são clones de micro-organismos isolados de animais e vegetais que carregam genes para resistência aos principais antibióticos utilizados para o tratamento dos doentes^{14,15}. A utilização dos antimicrobianos gerou grande otimismo em relação à prevenção e ao tratamento dos processos infecciosos. Entretanto, o uso exagerado e nem sempre criterioso e racional dos antibióticos e quimioterápicos trouxe dificuldades, sendo a maior delas representada pela progressiva resistência bacteriana às drogas¹⁶.

Esta é uma situação preocupante, haja vista que, na produção animal, são utilizadas muitas drogas antimicrobianas e que exercem pressão de seleção sobre os micro-organismos. Ao consumir alimentos de origem animal ou vegetal, pode-se contrair estas cepas resistentes dificultando o tratamento¹⁴. Dessa maneira, a segurança dos alimentos constitui uma preocupação para os consumidores e para órgãos responsáveis pela saúde pública, uma vez que produtos disponíveis para comercialização podem representar um risco à saúde, se não forem seguidos, com rigor, cuidados higiênico-sanitários durante o processo de produção¹⁷.

Segundo Soares et al.¹⁸, o fenômeno da resistência inclui uma variedade de micro-organismos e de drogas, sendo um fenômeno global. Para a saúde pública, as consequências do fenômeno da resistência são gigantescas, posto que restringem as opções terapêuticas; além disso, registra-se que grandes companhias farmacêuticas têm limitado os investimentos na descoberta de novos fármacos.

Neste contexto, tendo em vista a posição relevante das bactérias na escala da etiologia das doenças infecciosas, a resistência bacteriana aos antibióticos merece destaque.

Com base nestes aspectos, o presente trabalho visou estudar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de isolados de *Escherichia coli*, *Staphylococcus* coagulase positiva e *Salmonella* spp. obtidos de amostras de queijo coalho comercializados na orla de Salvador (BA).

MATERIAL E MÉTODOS

Para a caracterização do perfil de susceptibilidade a diferentes antimicrobianos, foram utilizados isolados de *Escherichia coli*, *Staphylococcus* coagulase positiva e de *Salmonella* spp., provenientes de amostras de queijo coalho cruas e assadas, coletadas em praias da cidade de Salvador (BA), em estudo prévio¹⁹.

Os isolados estavam armazenados em tubos tipo *eppendorf*, em meio de cultura BHI (Brain heart infusion broth), sob temperatura de refrigeração (8 °C a 10 °C) por 30 dias, com repiques a cada 15 dias.

Sessenta e sete isolados foram submetidos aos testes de susceptibilidade, compreendendo 36 de *E. coli*, 16 de *Salmonella* spp. e 15 de *Staphylococcus* coagulase positiva. Os isolados foram ativados em meio de cultivo TSA (Trypticase Soy Agar), utilizando-se a técnica do esgotamento, e incubados a 35 °C por 24 horas. Após este período, foi realizada uma reativação, utilizando-se o mesmo meio de cultivo (TSA) e inoculando-se uma colônia isolada da placa anterior.

Em seguida, os isolados bacterianos foram submetidos à determinação do perfil qualitativo de resistência a antimicrobianos, por meio do método de difusão de discos de antibióticos²⁰, utilizando-se ágar Mueller-Hinton. O método consistiu em obter um inóculo bacteriano contendo 10⁸ UFC/mL, correspondente ao padrão 0,5 da Escala de MacFarland⁹. Dessa maneira, cada cepa testada foi inoculada em tubos contendo 5 mL de solução salina a 0,85%, com o uso de alça de platina, previamente flambada, em quantidade suficiente para a obtenção da turvação padrão 0,5 da referida escala. Com o auxílio de “swab” estéril, a cultura foi semeada em placas de Petri contendo ágar Mueller-Hinton até a obtenção de um esfregaço uniforme. Após a secagem do esfregaço, aplicou-se na superfície do meio de cultura, com o auxílio de uma pinça estéril, discos com os antibióticos escolhidos, de acordo com a recomendação da “Clinical and Laboratory Standards Institute”²¹, sendo, em seguida, as placas incubadas a 37 °C por 24 horas.

Para caracterização do perfil de suscetibilidade aos antibióticos dos isolados de *E. coli* e *Salmonella* spp., foram utilizados discos comerciais dos seguintes antibióticos: ampicilina 10 µg (AMP), cefalotina 30 µg (CFL), cefotaxima 30 µg (CTX), gentamicina 10 µg (GEN), tetraciclina 30 µg (TET), cloranfenicol 30 µg (CLO), sulfametoxazol/ trimetoprim 1,25/23,75 µg (SUT), ciprofloxacina 5 µg (CIP), amoxicilina/ácido

clavulânico 20/10 µg (AMC), nitrofurantoína 300 µg (NIT), levofloxacina 5 µg (LEV) e norfloxacina 10 µg (NOR). Para os isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva, foram utilizados discos comerciais dos seguintes antibióticos: oxacilina 1 µg (OXA), gentamicina 10 µg (GEN), tetraciclina 30 µg (TET), norfloxacina 10 µg (NOR), sulfametoxazol/trimetoprim 1,25/23,75 µg (SUT), cloranfenicol 30 µg (CLO), nitrofurantoína 300 µg (NIT) e eritromicina 15 µg (ERI).

A leitura dos resultados da susceptibilidade aos antimicrobianos foi realizada medindo-se (em milímetros) o tamanho dos halos de inibição do crescimento bacteriano com uma régua, sendo a cepa bacteriana classificada em resistente, intermediária ou sensível em função do diâmetro da zona de sensibilidade padrão estabelecida para cada antimicrobiano^{20,21}, em sistema de duplicata, em diferentes momentos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 registra os perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos encontrados para *E. coli*. Como se nota, todos os isolados de *E. coli* (36) apresentaram susceptibilidade aos antibióticos CIP, CTX, LVX, NOR, TET e SUT. Um total de 10 (27,78%) mostrou-se resistente a um ou mais dos seguintes antibióticos: AMP, GEN, AMC, CLO, NIT e CFL, sendo um deles resistente a quatro antibióticos (AMP, GEN, CLO e CFL).

E. coli isoladas de alimentos têm apresentado multirresistência antimicrobiana^{22,23}. Trabalho desenvolvido por Montelli e Sadatsune¹⁶ revelou que amostras de enterobactérias produtoras de betalactamase de espectro estendido, principalmente *Klebsiella pneumoniae* e *E. coli*, podem ser clinicamente resistentes à terapêutica com penicilinas, cefalosporinas (ceftriaxona, cefotaxima e ceftazidima) ou aztreonam, mesmo quando ocorrer “aparente” sensibilidade ao antibiograma à algumas destas drogas.

Costa et al.²⁴ avaliaram a presença, o perfil de patogenicidade e de susceptibilidade aos antimicrobianos de amostras de *E. coli* isoladas de produtos cárneos comercializados em estabelecimentos do município de Petrolina (PE). Os resultados demonstraram perfis semelhantes aos obtidos no presente estudo, com alta susceptibilidade dos isolados aos antibióticos ciprofloxacina, gentamicina, sulfazotrin, nitrofurantoína, ácido nalidixico, amicacina e ceftriaxona.

Tabela 1. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de isolados de *Escherichia coli* oriundos de amostras de queijo coalho coletadas em praias da cidade de Salvador (BA)

ANTIBIÓTICOS	SENSÍVEL		INTERMEDIÁRIO		RESISTENTE	
	Nº isolados	%	Nº isolados	%	Nº isolados	%
Ampicilina	15	41,7%	16	44,4%	05	13,9%
Gentamicina	35	97,2%	0	-	01	2,8%
Cloranfenicol	26	75,0%	04	11,1%	05	13,9%
Tetraciclina	36	100%	0	-	0	-
Ciprofloxacina	36	100%	0	-	0	-
Cefotaxima	36	100%	0	-	0	-
Norfloxacina	36	100%	0	-	0	-
Levofloxacina	36	100%	0	-	0	-
Cefalotina	17	50,0%	14	38,9%	04	11,1%
Nitrofurantoina	26	75,0%	07	19,4%	02	5,6%
Sulfametoxazole/ Trimetoprim	36	100%	0	-	0	-
Amoxicilina/Ácido clavulânico	34	94,4%	01	2,8%	01	2,8%

Tabela 2. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de isolados de *Salmonella* spp. oriundos de amostras de queijo coalho coletadas em praias da cidade de Salvador (BA)

ANTIBIÓTICOS	SENSÍVEL		INTERMEDIÁRIO		RESISTENTE	
	Nº isolados	%	Nº isolados	%	Nº isolados	%
Ampicilina	15	93,7%	0	-	01	6,2%
Gentamicina	16	100%	0	-	0	-
Cloranfenicol	16	100%	0	-	0	-
Tetraciclina	14	87,5%	0	-	02	12,5%
Ciprofloxacina	16	100%	0	-	0	-
Cefotaxima	16	100%	0	-	0	-
Norfloxacina	16	100%	0	-	0	-
Levofloxacina	16	100%	0	-	0	-
Cefalotina	15	93,7%	0	-	01	6,2%
Nitrofurantoina	04	25,0%	06	37,5%	06	37,5%
Sulfametoxazol/ Trimetoprim	16	100%	0	-	0	-
Amoxicilina/Ácido clavulânico	15	93,7%	0	-	01	6,2%

Para os isolados de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovares Hadar (7), sorovar Newport (6), Ohio (2) e Oranienburg (1), os antibióticos CLO, CIP, LVX, CTX, SUT, GEN e NOR, foram 100% eficazes. O NIT foi o que apresentou maior resistência frente às cepas, das quais 37,5% (6) mostraram-se resistentes e somente 25% (4) sensíveis. Os demais antibióticos tiveram eficácia entre 93,75% a 87,5%. *S. Oranienburg* mostrou-se multirresistente a quatro antibióticos (AMP, AMC, NIT e CFL). A Tabela 2 descreve os perfis de susceptibilidade encontrados para estes isolados.

Tavechio et al.²⁵ avaliaram o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de 131 cepas de *Salmonella Enteritidis* (SE) (92 de origem humana e 39 de não humana), verificando a ocorrência de isolados multirresistentes. Dos isolamentos de origem não humana, 23,1% foram resistentes a uma droga, 2,6% a duas e 2,6% a quatro, representando um grande problema

de saúde pública, visto o curto período de tempo que esse sorotipo prevalecia no Estado de São Paulo.

Em estudo referente a oito cepas de *Salmonella* spp. isoladas a partir de queijo tipo coalho comercializado, no período de janeiro a maio de 1997, em Recife (PE), os autores encontraram 12,5% delas resistentes à ampicilina e 25,0% à tetraciclina. Além destas, foram também relatadas 12,5% de resistência frente ao sulfazotrim (Sulfametoxazol/Trimetoprim) e 12,5% à amicacina²⁶. Os valores de resistência observados para os antibióticos ampicilina e tetraciclina representam o dobro dos achados no presente estudo. Para o sulfazotrim, diferente do encontrado pelos autores, não foram observadas cepas resistentes neste estudo. A amicacina não foi testada.

O desenvolvimento de resistência antimicrobiana em bactérias zoonóticas, como *Salmonella* spp., constitui um risco à saúde pública e animal, podendo comprometer

Tabela 3. Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos de isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva oriundos de amostras de queijo coalho coletadas em praias da cidade de Salvador (BA)

ANTIBIÓTICOS	SENSÍVEL		INTERMEDIÁRIO		RESISTENTE	
	Nº isolados	%	Nº isolados	%	Nº isolados	%
Gentamicina	13	86,7%	0	-	02	13,3%
Cloranfenicol	15	100%	0	-	0	-
Tetraciclina	15	100%	0	-	0	-
Eritromicina	11	73,3%	0	-	04	26,7%
Norfloxacina	14	93,3%	01	6,7%	0	-
Oxacilina	13	86,7%	0	-	02	13,3%
Nitrofurantoina	15	100%	0	-	0	-
Sulfametoxazol/ Trimetoprim	15	100%	0	-	0	-

o tratamento com antimicrobianos, no que se refere à dificuldade da escolha terapêutica em certas infecções, bem como a necessidade do uso de drogas mais onerosas. Portanto, as observações de resistência enfatizam a necessidade de um uso prudente e crítico dos mesmos, buscando a prevenção da emergência e da disseminação de micro-organismos resistentes²⁷.

Os resultados para os isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva mostraram que os antibióticos NIT, TET, CLO e SUT foram eficazes frente todas as cepas, todavia, algumas delas foram resistentes à GEN, OXA e ERI (Tabela 3).

O perfil de resistência desse micro-organismo ao antibiótico Oxacilina tem recebido destaque devido à importância do *S. aureus* Oxacilina Resistente (ORSA), que vem aumentando a partir da década de 1980, sendo considerado, atualmente, o maior problema clínico e epidemiológico em infecções hospitalares²⁸.

Considerado um patógeno tradicionalmente hospitalar, seu reservatório, modo de transmissão, fatores de risco e perfil de resistência aos antimicrobianos são bem conhecidos, com estabelecimento de medidas de prevenção baseadas nestes dados. No entanto, na década de 1990, observou-se um aumento na preocupação em relação à extensão pela qual estes micro-organismos estavam sendo disseminados para fora do ambiente hospitalar e, sobretudo, envolvendo pessoas sem fatores de risco²⁹.

Os dados do presente estudo apontam que alguns antibióticos, tais como gentamicina e eritromicina, de uso comum em terapêutica humana e veterinária, não foram eficazes contra algumas cepas de *E. coli*, *Staphylococcus* coagulase positiva e *Salmonella* spp. isoladas dos queijos coalhos analisados.

Pesquisa realizada por Rapini et al.³⁰, com o objetivo de avaliar o perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de queijo tipo coalho comercializados em praias nordestinas, frente

a oito antibióticos utilizados em medicina humana e veterinária (penicilina G 10 UI, gentamicina 10 µg, eritromicina 15 µg, tetraciclina 30 µg, sulfazotrim 25 µg, oxacilina 1 µg e cefalotina 30 µg) e vancomicina 30 µg) revelou elevada frequência de resistência das cepas testadas. Em comparação ao presente estudo, verifica-se semelhança nos perfis de susceptibilidade, principalmente à gentamicina e eritromicina, que revelaram os maiores índices de resistência (71,1% e 60%, respectivamente). De maneira semelhante, Freitas et al.³¹, em estudo que buscou avaliar a sensibilidade antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de carcaças de frango comercializadas em Recife, encontraram altos valores de resistência para a eritromicina, tendo este se mostrado o antibiótico menos eficaz, com 74,4% de cepas resistentes. Estes altos percentuais de resistência à eritromicina podem ser justificados pelo fato de que os macrolídeos apresentam um espectro de ação intermediário, agem inibindo a síntese proteica bacteriana e, assim, a resistência cromossômica desenvolve-se facilmente^{29,32}.

Costa, Lima e Rabelo³³, em estudo com 20 isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva oriundos de amostras de queijo “tipo coalho”, observaram que 60% deles foram resistentes a este agente, mostrando um percentual de resistência superior ao encontrado no presente estudo.

Bactérias resistentes a antibióticos preocupam, uma vez que, no trato gastrointestinal do homem, elas podem transferir genes de resistência antimicrobiana a outras bactérias da própria espécie ou de espécies não relacionadas, patogênicas ou não³⁰.

Ressalta-se, por fim, que a resistência antimicrobiana resulta em aumento de morbidade, mortalidade e custos à saúde, sendo consenso global que o uso irracional e abusivo de antibióticos, terapêutico ou profilaticamente, contribuiu para a ascensão desta resistência³⁴.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados evidenciaram índices relevantes de isolados bacterianos que se mostraram resistentes aos antimicrobianos testados, incluindo *E. coli* e *Salmonella* spp. resistentes a quatro diferentes antibióticos, ou seja, bactérias consideradas multirresistentes. Os isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva foram os que mais se apresentaram susceptíveis frente à maioria dos antimicrobianos testados.

Considerando o grande consumo do queijo de coalho, a contaminação microbiológica descrita na literatura e neste estudo, bem como a resistência identificada, salienta-se a preocupação na perspectiva da saúde pública, tendo em vista os riscos potenciais a que os consumidores estão expostos.

Por fim, embora os resultados do presente estudo não retratem especificidades da cadeia produtiva e expressem dados apenas do produto em pontos de comercialização, cabe sinalizar a importância de que medidas sejam adotadas para controle do uso indiscriminado de antibióticos no tratamento terapêutico de homens e animais, a fim de reduzir o aparecimento de bactérias resistentes. Outrossim, reforça-se a necessidade de investigações que possam elucidar o fenômeno da susceptibilidade aos antimicrobianos, ao longo da cadeia leiteira.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Enterobactérias da Fiocruz/RJ, pela tipagem das cepas de *Salmonella*. Ao CPNq, pelo apoio financeiro através do processo CNPq nº 478499/2007-8 e pela bolsa de Iniciação Científica.

REFERÊNCIAS

1. Catanozi MPLM, Morelhão GG, Iurcic KM. Avaliação microbiológica de lanches vendidos em carrinhos de ambulantes na cidade de Araraquara, SP. *Hig Alim*. 1999;13(6/67):116-20.
2. Dallari SG, Bravo ES, Ribeiro IA, Oliveira JC, Ferreira JA. Vigilância sanitária de alimentos de consumo imediato no município de São Paulo: a importância da informação para o planejamento. *Hig Alim*. 2000;14 (76):24-6.
3. Santos FA, Nogueira NAP, Cunha GMA. Aspectos microbiológicos do queijo tipo “coalho” comercializado em Fortaleza-CE. *Bol CEPPA*. 1995;13(1):31-6.
4. Mendes ES, Lima EC, Numeriano AKM, Coelho MIS. *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. e coliformes em queijos de “coalho” comercializados em Recife. *Hig Alim*. 1999;13(66/67):122-6.
5. Nassu RT, Moreira CG, Rocha RGA, Feitosa T, Borges MF, Macedo AAM. Diagnóstico das condições de processamento e qualidade microbiológica de produtos regionais derivados do leite produzidos no estado do Rio Grande do Norte. *Rev Inst Latic Cândido Tostes*. 2000;55: 121-6.
6. Borges MF, Feitosa T, Nassu RT, Muniz CR, Azevedo EHF, Figueiredo EAT. Microrganismos patogênicos e indicadores em queijo de coalho produzido no Estado do Ceará, Brasil. *Bol CPPA*. 2003;21(1):31-40.
7. Brito G, Cordeiro LN, Josino AS, Melo ML, Coutinho HDM. Avaliação da Qualidade Microbiológica de Hambúrgueres e Cachorros-quentes Comercializados por Vendedores Ambulantes no Município de Juazeiro do Norte, CE. *Rev Hig Alim*. 2003;17(110):90-4.
8. Forsythe SJ. *Microbiologia da Segurança Alimentar*. Porto Alegre (RS): Artmed; 2005.
9. Antunes GS. *Manual de Diagnóstico Bacteriológico*. 2ª ed. rev. e ampl. Porto Alegre (RS): Editora da Universidade/UFRGS; 1995.
10. Katsunuma Y, Hanazumi M, Fujisaki H, Minato H, Kataoka Y, Sawada T, et al. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis patterns of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* and enterococci isolates from the feces of livestock and livestock farmers in Japan. *J Gen Appl Microbiol*. 2008;54(1):39-50.
11. Manges AR, Johnson JR, Foxman B, O'Bryan TT, Fullerton KE, Riley LW. Widespread distribution of urinary tract infections caused by a multidrug-resistant *Escherichia coli* clonal group. *N Engl J Med*. 2001;345:1007-13.
12. Ramchandani M, Manges AR, Debroy C, Smith SP, Johnson J R, Riley LW. Possible animal origin of human-associated, multidrug-resistant uropathogenic *Escherichia coli*. *Clin Infect Dis*. 2005;40:251-7.
13. Shiraki Y, Shibata N, Doi Y, Arakawa Y. *Escherichia coli* producing CTX-M-2 beta-lactamase in cattle, Japan. *Emerg Infect Dis*. 2004;10(1):69-75.
14. Yang SJ, Park KY, Kim SH, No KM, Besser TE, Yoo HS, et al. Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium isolated from animals in Korea: comparison of phenotypic and genotypic resistance characterization. *Vet Microbiol*. 2002;86:295-301.
15. Kariuki S, Revathi G, Gakuya F, Yamo V, Muyodi J, Hart CA. Lack of clonal relationship between non-typhi *Salmonella* strain types from humans and those isolated from animals living in close contact. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2002;3:165-171.
16. Montelli AC, Sadatsune T. *Antibioticoterapia para o clínico*. Rio de Janeiro (RJ): Sociedade Brasileira de Microbiologia; 2001.
17. Volkman H, Iminianovsky U, Cavalheri NA, Meisen NM, Reiter MGR. Avaliação microbiológica de diferentes tipos de queijos produzidos em Rodeio, SC. XIX Congresso Nacional de Laticínios. 2002; Juiz de Fora, MG; p. 165-6.
18. Soares KP, Mendes LG, Amorim LN, Nascimento KM, Cunha FA, Sousa GC, et al. Perfil de sensibilidade de cepas de *Escherichia coli* isoladas de alimentos comercializados na cidade de Fortaleza. XLVI Congresso Brasileiro de Química; 2007, Natal, RN.
19. Meneses RB, Cardoso RCV, Guimarães AG, Góes JA, Silva AS, Argôlo SV. O comércio de queijo de coalho na orla de Salvador, Bahia: trabalho infantil e segurança de alimentos. *Rev Nutr*. 2012;12(3):381-392.
20. Bauer AW, Kirby EM. Antibiotic Susceptibility Testing by Standardized Single Disk Method. *Am J Clin Pathol*. 1966;45(4):493-6.

21. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing: Twentieth informational supplement. January 2010; Clinical And Laboratory Standards Institute, Wayne, PA CLSI document M100-S20, 30(1), replaces M100-S19,29(3).
22. Martins SCS; Lima J R, Almada, JS, Pereira, AIB. "Screening" de linhagens de *Escherichia coli* multiresistentes a antibióticos, em alimentos de origem animal do Estado do Ceará, Brasil. *Hig Alim*. 2003;17(104/105):71-6.
23. Valente AM. Efeito da irradiação sobre mexilhões [*Perna perna* (Linnaeus, 1758)]: Coliformes termotolerantes e *Enterococcus*; ação antimicrobiana e análise sensorial das amostras. [dissertação de mestrado]. Niterói (RJ): Universidade Federal Fluminense; 2004.
24. Costa FRL, Peixoto RM, Sá MCA, Krewer CC, Maboni F, Costa MM. Isolamento e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de amostras de *Escherichia coli* obtidas de carne comercializada no município de Petrolina, PE. [acesso 2009 out 18]. Disponível em: [http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R0179-2.pdf].
25. Tavechio AT, Fernandes AS, Neves BC, Dias AMG, Irino K. Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella* Enteritidis in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1996;38(5):315-22.
26. Sena MJ, Cerqueira MMOP, Leocadio Filho G, Dias RS. Salmonelas isoladas de queijo tipo "coalho": caracterização sorológica e resistência a agentes antimicrobianos – Recife (PE). *Rev Inst Adolfo Lutz*. 1999;58(1):13-7.
27. Peresi JTM, Almeida IAZC, Cardiga EA, Marques DF, Carnicel FA, Hoffmann, FL. Susceptibilidade antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp. isoladas de alimentos envolvidos em surtos de doenças bacterianas transmitidas por alimentos, ocorridos na região Noroeste do Estado de São Paulo, no período de abril de 1990 a dezembro de 2003. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2006;65(2):112-7.
28. Rodrigues EAC, Mendonça JS, Amarante JMB, Alves Filho MB, Grinbaun RS, Richtmann R. Infecções hospitalares: prevenção e controle. São Paulo (SP): Sarvier; 1997.
29. Boyce JM. Are the epidemiology and microbiology of methicilin resistant *Staphylococcus aureus* changing? *JAMA*. 1998;279(8):623-4.
30. Rapini LS, Teixeira JP, Martins NE, Cerqueira MMOP, Souza MR, Penna CFAM. Perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de queijo tipo coalho. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2004;56(1):130-3.
31. Freitas MF, Mota R A, Leão AEDS, Figueiredo ML, Fonte MM, Vieira RFC. Sensibilidade antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de carcaças de frango comercializadas em Recife. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2004;56(3):405-7.
32. Pina ES. Antibióticos e Quimioterápicos na Clínica Veterinária de Pequenos Animais. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. [acesso 2000 nov 19]. Disponível em [http://www.veterinariosnodiva.com.br/books/Farmacologia-uso-frequente-Veterinaria.pdf].
33. Costa FN, Lima RMS, Rabelo RN. Comportamento frente à ação de antimicrobianos de cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva, *Escherichia coli* e *Bacillus cereus* isoladas de derivados lácteos. *Hig Aliment*. 2002;16(92/93):80-3.
34. Del Fiol FS, Mattos Filho TR, Groppo FC. Resistência bacteriana. *Rev. Bras Med*. 2000;57(10):85-7.

Avaliação da qualidade do leite e seu processamento na produção de leite em pó associado a Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle

Quality evaluation of milk and its processing for producing milk powder in accordance with Hazard Analysis and Critical Control Points

RIALA6/1464

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

Marcelo Weyer das NEVES*, Nádia CARBONERA, Milton Luiz Pinho ESPÍRITO SANTO

*Endereço para correspondência: Laboratório de Controle de Qualidade de Alimentos, Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Campus Cidade, Rua Engenheiro Alfredo Huch, 475, Caixa Postal 474, CEP: 96201-900, Rio Grande, RS. Telefone: (53) 3233-8745. E-mail: marcelo@termasa.com.br

Recebido: 30.06.2010- Aceito para publicação: 29.06.2012

RESUMO

Neste trabalho foi realizado o isolamento de *Staphylococcus* spp. de queijo minas frescal, e para esta finalidade foi padronizado um protocolo multiplex PCR (M-PCR) para efetuar a detecção de genes de enterotoxinas clássicas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*) de *Staphylococcus aureus*, usando-se o gene *femA* como controle positivo para cepas de *S. aureus*. Foi testada a detecção direta de bactérias de amostras de queijo minas frescal e do alimento artificialmente contaminado. Cento e onze colônias (104 coagulase-positivas e sete coagulase-negativas) foram selecionadas e analisadas por M-PCR e, dentre essas, 34 colônias (30.62%) foram positivas para pelo menos um dos cinco genes de enterotoxinas analisados. Os genes que codificam as enterotoxinas *sea* e *seb* foram os mais frequentemente detectados. O estudo de isolamento de estafilococos coagulase-positivos revelaram que 40% das amostras demonstraram contagens bacterianas acima do limite considerado como aceitável pela legislação brasileira.

Palavras chave. PCR, *Staphylococcus*, queijo.

ABSTRACT

This work aimed at isolating *Staphylococcus* spp. from minas frescal type cheese, and for this purpose a Multiplex PCR (M-PCR) was standardized for detecting the classical *Staphylococcus aureus* enterotoxin genes (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* and *see*), using the *femA* gene as a positive control for *S. aureus* strains. Bacterial detection directly from the minas frescal type cheese and from artificially contaminated food was tested. One hundred eleven colonies (104 coagulase-positive and seven coagulase-negative) were selected for performing M-PCR assay. Thirty-four colonies (30.62%) were positive for at least one of the five enterotoxin genes analyzed; enterotoxins *sea* and *seb* were the most frequently detected. The study on *Staphylococci* coagulase-positive samples revealed that 40% of the samples showed bacterial counts above the limit established by Brazilian legislation.

Keywords. PCR, *Staphylococcus*, cheese.

INTRODUÇÃO

O leite bovino constitui a base da alimentação nos primeiros anos de vida e se caracteriza por ser um dos principais produtos agropecuários brasileiros, porém, são necessárias melhorias da qualidade nos processos para que problemas de segurança alimentar sejam evitados¹.

Um sistema de segurança alimentar em que uma organização na cadeia produtiva demonstre sua habilidade em controlar os perigos envolve as Boas Práticas de Fabricação (BPFs) ou Programas de Pré-Requisitos (PPRs) do sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) de acordo com os princípios estabelecidos pela Comissão do *Codex Alimentarius*².

A implantação de um sistema APPCC exige, além do comprometimento da direção do estabelecimento, capacitação de pessoal para a correta identificação dos perigos relacionados com as diversas operações que envolvem o processo produtivo. Esta ferramenta é reconhecida mundialmente para a prevenção de problemas relacionados com a segurança alimentar e muitos mercados valorizam e até mesmo exigem este sistema implementado como forma de assegurar riscos mínimos nos alimentos produzidos³⁻⁵.

Quando se realiza uma análise de riscos, é preciso considerar a severidade e a probabilidade de ocorrência dos perigos identificados. É preciso observar que, quanto maior a severidade do perigo e a probabilidade de ocorrência, maior será o grau de importância ou gravidade que o mesmo representa. Enquanto os perigos químicos são os mais temidos pelos consumidores e os físicos, os mais comumente identificados, os biológicos são os mais sérios do ponto de vista de saúde pública, por representarem a grande maioria das ocorrências de enfermidades transmitidas pelos alimentos e estão quase sempre associados à micro-organismos patogênicos^{4,6}.

A avaliação de micro-organismos indicadores, como os aeróbios viáveis, coliformes e estafilococos, facilita a identificação do risco associado à perda da qualidade e segurança alimentar da maioria dos alimentos processados e especialmente do leite em pó⁷.

Entre os micro-organismos importantes que podem contaminar o leite e seus derivados, destacam-se os pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, frequentemente usada como indicador de qualidade de produto acabado e das etapas de processamento. Com não menos importância, encontra-se *Staphylococcus* que, embora seja

micro-organismo termo-sensível, produz enterotoxinas termoestáveis que resistem a processos térmicos como a pasteurização e ultrapasteurização do leite⁸.

Na produção do leite em pó, uma pasteurização realizada imediatamente antes da evaporação reduz a presença de bactérias aeróbias viáveis. Tem-se comprovado que bactérias termofílicas que, ocasionalmente, contaminam evaporadores podem contaminar os pré-aquecedores, sendo a única operação em que ocorre a formação de biopelículas associadas à multiplicação e concentração de micro-organismos termofílicos contaminantes⁹. A pasteurização é uma operação importante e está sempre associada a Ponto Crítico de Controle – PCC, e qualquer ineficiência no seu monitoramento poderá prejudicar a segurança alimentar como um todo¹⁰.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade físico-química e microbiológica do leite cru e processado na forma de leite em pó associado ao sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

A fábrica de leite em pó utilizada para o desenvolvimento do presente trabalho está localizada em Cruz Alta (RS) e possui capacidade para processamento de 1 milhão de litros de leite/dia. A indústria coleta diariamente em entrepostos de cooperativas e em propriedades produtoras na região norte e noroeste do Rio Grande do Sul cerca de 340 mil litros.

Para o experimento, foram utilizados 30 litros de leite de bovinos/quinzena, durante os meses de novembro e dezembro, correspondendo a quatro ensaios analíticos. A cada amostragem correspondente a referida quinzena, realizou-se uma divisão de lotes amostrais equivalente a 3×10 litros de leite de maneira que a representar os resultados analíticos em triplicata.

Métodos

O leite cru refrigerado foi coletado em postos de resfriamento a 4 °C, instalados em propriedades rurais, e transportado através de caminhões tanques isotérmicos de forma a se manter estável a temperatura de conservação da matéria-prima¹¹. Durante o recebimento do leite na plataforma industrial, foram coletadas, portanto, 3 amostras com 10 L correspondentes aos lotes quinzenais, totalizando

12 amostras (120 L) recebidos para processamento. Amostras com 10 litros foram coletadas e homogeneizadas antes de serem encaminhadas para as referidas análises específicas relacionadas ao leite cru. Considerando a sequência operacional envolvida com o processamento do leite em pó, após o recebimento, o leite foi conduzido à filtração, resfriamento e a estocagem em silos verticais. Conforme uma programação de produção, o leite estocado foi conduzido ao pré-aquecimento, centrifugado e padronizado em função do teor de gordura. Posteriormente, o leite foi concentrado por meio de um pré-aquecedor e, em sequência, por meio de um evaporador de múltiplos estágios. A concentração do leite foi realizada em concentrador a vácuo, necessário para reduzir o ponto de ebulição e as alterações relacionadas com a desnaturação de proteínas e vitaminas. A seguir, o leite concentrado, foi homogeneizado e transferido para a câmara de secagem tipo *spray dry*.

O produto obtido com 3% de umidade foi peneirado, transportado até os silos de estocagem, embalado em atmosfera modificada com a inclusão de nitrogênio e estocado.

Avaliações físico-químicas

Com relação ao leite cru, foram executadas análises de lipídeos, densidade, proteínas e avaliação de lactose¹¹. A análise de lipídeos foi realizada pelo método Gerber, utilizando uma centrífuga SimplexII/SuperII, da ITR, Brasil, e butirômetros calibrados entre 0% e 8%⁸, ácido sulfúrico concentrado e álcool amílico na dissolução do extrato etéreo para posterior avaliação. O teste de alizarol foi realizado com diferentes concentrações alcoólicas: 74, 76 e 78 °GL¹¹. A determinação de pH foi realizada com pHmetro de bancada, modelo DM 22, da Digimed, Brasil, e eletrodo de vidro com sensor de temperatura. Para a determinação da densidade, foi utilizado um termolactodensímetro aferido a 15 °C, da Cap-lab, Brasil. A determinação de Extrato Seco Total (EST) foi realizada por meio do disco de Ackermann, da Gerber, sendo o Extrato Seco Desengordurado (ESD) calculado pela diferença entre o EST e o percentual de lipídeos presente na amostra. Para a análise crioscópica, foram utilizadas amostras com 2,5 mL de leite e crioscópio eletrônico digital de bancada modelo MK-540 Flex e MC 5400 da ITR¹¹.

Avaliações microbiológicas

Foram retiradas assepticamente duas amostras com 1 litro cada, totalizando 1 litro/lote para cada época

correspondente aos meses de novembro e dezembro para avaliação do leite cru e pasteurizado e, para o leite em pó, duas amostras com 1 kg cada, totalizando 1 kg/lote para as correspondentes épocas (novembro e dezembro). Conforme metodologia analítica, foram realizadas diluições sucessivas em solução de água peptonada 0,1%. As análises microbiológicas (realizadas em triplicata) do leite cru, pasteurizado e em pó corresponderam à enumeração de micro-organismos aeróbios viáveis, coliformes totais, a 45 °C e *Staphylococcus* coagulase positiva¹⁰. A enumeração de micro-organismos aeróbios viáveis foi realizada pelo método do plaqueamento em profundidade em Plate Count Agar – PCA (UFC/g ou mL). Para a determinação dos coliformes a 45 °C, foi utilizada a técnica do Número Mais Provável – NMP/g ou mL, indicada para a detecção de baixas concentrações de coliformes e por apresentar maior sensibilidade do que os métodos de plaqueamento comum. Como meio seletivo para a determinação de *Staphylococcus* coagulase positiva, foi utilizado o Ágar Baird – Parker Medium. O meio combina o telurito de potássio (0,01%), glicina (1,2%) e cloreto de lítio (0,5%) como agentes seletivos. A redução do telurito e a hidrólise da gema de ovo foram utilizadas como característica diferencial¹². A confirmação das colônias típicas foi avaliada por meio do teste de coagulase com plasma de coelho com EDTA, teste de termonuclease a 37 °C por 4 h e teste de catalase com peróxido de hidrogênio a 3%¹³.

Aplicação dos princípios do sistema APPCC

Para a avaliação do programa de controle de qualidade com base na APPCC, foi utilizada a sistemática de identificação dos perigos físicos, químicos e biológicos.

Para o desenvolvimento do programa, foram estabelecidos procedimentos que, segundo Furtini e Abreu⁶, são essenciais para a avaliação do sistema de controle, ou seja, convencimento do pessoal envolvido com o comprometimento para a execução do programa; avaliação das instalações industriais, equipamentos e sequências operacionais do processo. Foram avaliados os sete princípios envolvidos com o programa, definição do memorial descritivo de fabricação e suas fases operacionais, identificação dos Pontos Críticos de Controle (PCCs), determinação dos limites críticos, medidas preventivas e corretivas, procedimentos de vigilância e o estabelecimento dos registros para possíveis referências. O programa aplicado se baseou na Portaria n° 46 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)¹⁴.

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos do leite cru refrigerado a 4°C no momento do recebimento na indústria

Parâmetros	Períodos quinzenais			
	1º novembro	2º novembro	1º dezembro	2º dezembro
Lipídeos (%)	3,8 ± 0,45 ^a	3,8 ± 0,17 ^a	4,0 ± 0,21 ^a	3,9 ± 0,12 ^a
Extrato seco desengordurado (%)	8,4 ± 0,08 ^a	8,5 ± 0,15 ^a	8,5 ± 0,22 ^a	8,5 ± 0,14 ^a
Extrato seco total (%)	12,1 ± 0,17 ^a	12,3 ± 0,18 ^a	12,4 ± 0,12 ^a	12,4 ± 0,12 ^a
Densidade a 15 °C	1.029,6 ± 0,12 ^a	1.029,9 ± 0,5 ^a	1.029,8 ± 0,35 ^a	1.029,9 ± 0,32 ^a
Lactose (%)	4,9 ± 0,37 ^a	4,6 ± 0,32 ^{ab}	4,5 ± 0,22 ^b	4,5 ± 0,22 ^b
Proteínas (%)	2,9 ± 0,25 ^a	3,0 ± 0,35 ^a	3,1 ± 0,33 ^a	3,1 ± 0,39 ^a
Ponto crioscópico (°H)	-0,543 ± 0,12 ^a	-0,542 ± 0,18 ^a	-0,533 ± 0,25 ^a	-0,534 ± 0,18 ^a
pH	6,8 ± 0,08 ^a	6,8 ± 0,12 ^a	6,8 ± 0,16 ^a	6,8 ± 0,07 ^a
T (°C)	6,3 ± 0,06 ^a	5,8 ± 0,23 ^a	5,6 ± 0,33 ^a	5,9 ± 0,2 ^a
Estabilidade ao alizarol	77,7 ± 0,04 ^a	77,7 ± 0,13 ^a	77,5 ± 0,09 ^a	77,7 ± 0,07 ^a

Na mesma linha, médias identificadas com mesmas letras não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).

Análise estatística

Os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e a diferença de médias, segundo teste de Tukey, utilizando-se um nível de significância de 5%. Para a análise dos dados foi utilizado o Statistica 7,0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização físico-química do leite cru

A avaliação da qualidade do leite cru refrigerado a 4°C no momento do recebimento foi realizada utilizando ensaios analíticos físico-químicos, conforme apresentado na Tabela 1.

Não houve diferenças ($p > 0,05$) entre os valores médios das variáveis físicas e químicas, exceto para o teor de lactose (4,9% e 4,5%), que apresentou variações ($p < 0,05$) no segundo ensaio analítico. Scalco¹⁵, em estudos similares verificou que a média dos teores de lactose e lipídeos no leite integral foi 4,6% e 3,6%, respectivamente. Córdova¹⁶ encontrou teores de lactose entre 4,7% e 4,9%. Zanela et al.¹⁷ determinaram diferença significativa ($p < 0,05$) para os teores de lactose no leite cru entre sistemas de produção especializado (4,49% lactose) em que a silagem e pastagem são cultivadas de forma contínua durante o ano com relação aos sistemas semi-especializado, em que a silagem e pastagem não mantêm a qualidade e constância durante o ano (4,39% lactose) e não especializados, em que não cultivam silagem ou pastagem (4,32% lactose).

Observa-se que os teores de ESD ficaram abaixo da média (8,75%) dos resultados encontrados por Harris e Bachman¹⁸ e apresentaram um desvio padrão equivalente a 0,3, significando que existem amostras

com valores inferiores ao padrão preconizado pela IN n° 51 do MAPA¹⁹, ou seja, 8,4 g/100 g. Um leite com elevada Contagem de Células Somáticas (CCS) tem sua composição alterada e, entre os constituintes que sofrem esta alteração, estão os Sólidos Desengordurados (SD). Zanela et al.¹⁷ identificaram diferença no conteúdo destes componentes entre os sistemas de produção especializado (8,57% SD) com relação aos sistemas semiespecializados (8,42% SD) e não especializados (8,38% SD).

Quanto ao teor de proteínas, Scalco¹⁵ encontrou 3,6%, compreendendo 3,0% e 0,6% de caseína e albumina, respectivamente. Outros autores, como Córdova¹⁴, encontraram 2,9% e 3,7%, enquanto Harris e Bach¹⁶, 3,0 e 3,6%, superiores aos verificados no presente trabalho, entre 2,9 e 3,1% acima do mínimo preconizado pela IN n° 51¹⁹, 2,9%.

Quanto ao teor de lipídeos, a legislação determina um mínimo de 3,0%, sendo que os resultados encontrados ficaram entre 3,8% e 4,0%. Zanela et al.¹⁷ observaram diferenças entre sistemas de produção especializado (3,6%) e semiespecializado (3,48%) com relação ao sistema não especializado (3,83%), ou seja, conteúdo superior de lipídeos em sistemas de produção não especializados.

Resultados das análises microbiológicas

Considerando o programa APPCC, com base na aplicação das avaliações preventivas, considerou-se a operação de recebimento do leite cru sua pasteurização e o sistema de embalagem do produto acabado (leite em pó) como sendo pontos críticos de controle com influência na qualidade e segurança alimentar. Assim, as contagens de micro-organismos aeróbios viáveis estão relacionadas com o risco microbiológico. É preciso considerar a possível presença desses deterioradores como fator de risco para a

acidificação do leite após ordenha e resfriamento tornando-o impróprio para a produção do leite em pó.

As análises microbiológicas do leite cru, pasteurizado e em pó podem ser observadas nas Figuras 1A, B e C, respectivamente. A Figura 1A apresenta a contagem dos micro-organismos aeróbios viáveis nas fases consideradas como Pontos Críticos de Controle nas operações de recepção (leite cru), pasteurização (leite semiprocessado) e embalagem (leite em pó). Com relação a esses micro-organismos, no presente estudo, houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre estas operações. O tratamento térmico relacionado com a operação de

pasteurização reduziu a contagem de micro-organismos aeróbios viáveis do leite cru em mais de 6 ciclos logarítmicos. O valor inicial de $6,8 \text{ Log}_{10} \cdot \text{mL}^{-1}$ para o leite cru reduziu para $2,8 \text{ Log}_{10} \cdot \text{mL}^{-1}$ no leite pasteurizado (semiprocessado) e $0,7 \text{ Log}_{10} \cdot \text{g}^{-1}$ para o leite em pó. No produto final, os valores encontrados ($3,0 \times 10^4 \text{ UFC/g}$) apresentaram conformidade com o padrão pré-estabelecido pela Portaria n° 369¹⁸. Krey e Souza²¹ pesquisaram 20 lotes de leite em pó e encontraram resultados equivalentes a $9,1 \times 10^2 \text{ UFC/g}$ para estes micro-organismos deterioradores.

Relacionado aos mesmos pontos críticos de controle (Figura 1B), o resultado do NMP para coliformes

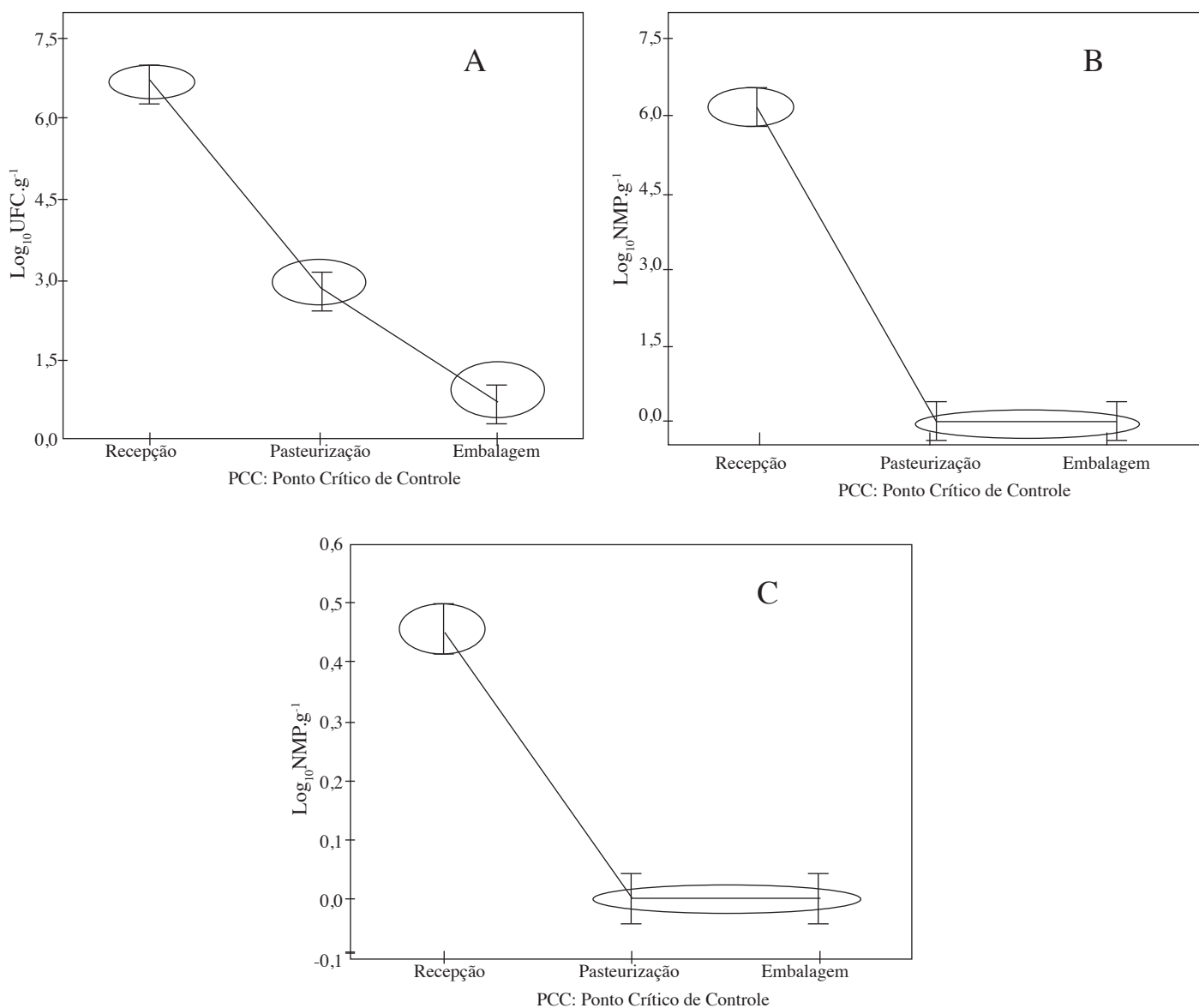


Figura 1. Contagem de micro-organismos aeróbios viáveis (A), avaliação de coliformes totais (B) e a 45°C (C) nas operações consideradas como Pontos Críticos de Controle relacionadas com a produção do leite em pó

totais apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as operações de recepção, pasteurização e embalagem. Entre esta última operação e a pasteurização, não houve diferenças significativas ($p > 0,05$).

Pelos resultados obtidos, a pasteurização foi eficiente na redução dos coliformes totais em 6 ciclos logarítmicos. Na operação de recepção, foram encontrados valores de $6,4 \text{ Log}_{10} \text{ NMP/mL}$ para estes micro-organismos com significativa redução posterior representada por uma não detecção destes micro-organismos termófilos para as operações de pasteurização e embalagem do leite em pó.

Garcia¹⁰, em um estudo relacionado com a Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle em uma indústria de laticínios, constatou que 15% das amostras coletadas na saída do pasteurizador apresentaram Número Mais Provável para coliformes totais acima do padrão preconizado pela IN nº 51 do MAPA¹⁹, 25% das amostras coletadas no tanque de estocagem do leite pasteurizado para posterior embalagem estavam acima dos padrões. No presente estudo, nenhuma das amostras coletadas na saída do pasteurizador indicou presença de coliformes.

A Figura 1C apresenta o resultado para o Número Mais Provável de coliformes a 45 °C. Os resultados mostraram existir diferenças significativas ($p < 0,05$) entre a recepção do leite cru e o restante das operações consideradas como Pontos Críticos de Controle (pasteurização do leite cru e embalagem do leite em pó), porém, os resultados não apresentaram diferenças ($p > 0,05$) entre as operações de pasteurização e a embalagem. Na operação de recepção, foram encontrados valores de $< 1 \text{ Log}_{10} \text{ NMP/mL}$ para estes micro-organismos com significativa redução posterior representada por uma não detecção destes micro-organismos termófilos para as operações de pasteurização e embalagem do leite em pó.

Silva et al.²² verificaram, em uma pesquisa com leite recém ordenhado e processado em 17 miniusinas que forneciam produtos para o Programa do Leite de Alagoas, que as amostras apresentaram elevada contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos, psicrotróficos, coliformes totais e a 45 °C. Os resultados indicaram uma contaminação após o processamento ou tratamento térmico comprovando o risco associado a esta operação.

Para a contagem de células somáticas, a Instrução Normativa nº 51¹⁹ determina o limite de $7,5 \times 10^5 \text{ CCS/mL}$ de leite cru. Enquanto que, no presente estudo, das 24 amostras analisadas, 6 apresentaram valores acima de $7,5$

$\times 10^5$ para a contagem de células somáticas, equivalente a 25%.

No presente estudo, não foram detectados *Staphylococcus* coagulase positiva em nenhuma etapa do processamento considerada como Ponto Crítico de Controle. Verifica-se também que a pasteurização foi eficiente para reduzir a contagem dos micro-organismos aeróbios viáveis e eliminar os coliformes, portanto, confirmando esta operação como simples Ponto de Controle – PC. A avaliação das operações entre a pasteurização e a embalagem mostrou não haver presença de micro-organismos aeróbios viáveis resultantes do processamento de produção do leite em pó. Assim que, com base nos perigos identificados e sua consequente avaliação (Quadro 1), teremos; identificação dos PCCs obtido pelo diagrama de fluxo decisório preconizado pela Portaria 46¹⁴, estabelecimento dos limites críticos, medidas preventivas e ações corretivas.

Silva e Gootenboer²³ sugeriram quatro Pontos Críticos de Controle ao estudarem um processo de produção de iogurte, sendo identificado como PCC₁ – recepção de leite cru, PCC₂ – mistura de ingredientes ao leite, PCC₃ – pasteurização e PCC₄ – fase de fermentação.

Stein²⁴, aplicando o sistema APPCC em um processo de industrialização de iogurte com polpa de morango sem conservantes, identificou 4 Pontos Críticos de Controle: PCC₁ – recepção do leite, PCC₂ – pasteurização, PCC₃ – fermentação e PCC₄ – recepção da polpa.

CONCLUSÃO

Com relação à produção do leite em pó, foram identificados três Pontos Críticos de Controle associados às operações de recebimento do leite cru, sua pasteurização e embalagem do leite em pó. A primeira operação considerada como crítica está associada a perigos químicos e biológicos, a segunda somente a perigos biológicos e a terceira a físicos.

Os resultados das análises microbiológicas relacionados com a determinação de micro-organismos aeróbios viáveis, coliformes totais, a 45 °C e *Staphylococcus* coagulase positiva demonstraram que o produto avaliado está de acordo com os padrões preconizados pela legislação vigente.

A caracterização físico-química do leite cru resfriado e disponibilizado para o processamento do leite

Quadro 1. Avaliação da análise de perigos e pontos críticos de controle na produção do leite em pó

Fases	Perigos	Medidas preventivas	Limites críticos	Vigilância	Medidas corretivas
Recebimento PCC1	Químicos e biológicos Antibióticos e resíduos de álcalis e ácidos	Avaliação da qualidade do leite cru Aplicação de BPF junto aos fornecedores Análise físico-química da matéria-prima	Padrões da IN 51 relacionados com a qualidade do leite cru	Acompanhamento sistemático por meio de análises laboratoriais	Rejeição ao leite cru Orientação aos fornecedores quanto às BPFs
	Biológicos Sobrevivência de micro-organismos indicadores de contaminação	Aplicação de BPFs Manutenção e aferição de equipamentos de controle Treinamento de pessoal	Temperatura do leite no pasteurizador (72-75 °C) Tempo de pasteurização (15-20') Temperatura do leite após pasteurização (2-5 °C)	Controle da temperatura e tempo de residência do leite no pasteurizador	Interromper a pasteurização e identificar as causas do desvio Capacitação de pessoal Calibração do equipamento
Embalagem PCC3	Físicos Presença de material estranho no interior da embalagem	Revisão periódica das peneiras e do detector de metais no sistema de embalagem	Ausência de matérias estranhas	Inspeção visual das peneiras Utilização de corpos de prova nos detectores de metais	Rejeição ao produto embalado Manutenção ou troca das peneiras e detectores de metais

em pó não apresentou diferenças ($p > 0,05$) em todos os parâmetros avaliados exceto para o teor de lactose.

REFERÊNCIAS

- Silveira IA, Carvalho EP, Teixeira D. Influência de micro-organismos psicotróficos sobre a qualidade do leite refrigerado. [acesso em 2009 jan 10]. Disponível em: [http://www.laticinio.net/].
- Implementation of ISO 22000 versus HACCP and FMEA in a Small Size Greek Factory Producing Smoked Trout: A Case Study. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2009;49(2):176-201.
- Hajdenwurcel JR. A experiência da indústria de laticínios na implantação do sistema APPCC – Estudo de caso. *Indústria de Laticínios*. 2002; 24-31.
- Senai/DN. Elementos de apoio para o Sistema APPCC. *Série Qualidade e Segurança Alimentar*. 2ª ed. Brasília: Senai Brasília; 2000.
- Molina A, Yamakil M, Berruga MI, Althaus RL, Molina MP. Management and sanitary practices in ewe dairy farms and bulk milk somatic cell count. *Span J Agric Res*. 2010;8(2):334-341.
- Furtini LLR, Abreu LR. Utilização de APPCC na indústria de alimentos. *Ciênc Agrotec*. 2006;30(2):358-63.
- Roque-Specht VE, Castro JEE, Neto MF. Avaliação de risco quantitativa como uma ferramenta para a caracterização da segurança microbiológica de alimento. *GEPROS*. 2007;2(4):37-48.
- Ferraz MA. Monitoramento de *Enterobacteriaceae* e *Staphylococcus* spp. na linha de produção de leite em pó de uma indústria de laticínios de Minas Gerais utilizando metodologias tradicional e rápida. [Dissertação de mestrado]. Belo Horizonte, MG: Universidade Federal de Minas Gerais; 2009.
- Westergaard V. Milk Powder Technology. *Evaporation and Spray Drying*. Niro Powder Technology; 2004.
- Garcia JA. Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle no processamento do leite pasteurizado em uma indústria de laticínios. [Dissertação de mestrado]. Florianópolis, SC: Universidade Federal de Santa Catarina; 1998.
- Brasil. Instrução Normativa nº 68, de 12 dezembro de 2006, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, p. 8, 14 dez 2006, Seção 1.
- Brasil. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, p. 14, 18 set 2003, Seção 1.
- Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA. *Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos*. São Paulo: Varela; 1997.
- Brasil. Portaria nº 46, de 10 de fevereiro de 1998, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Institui o sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle: APPCC a ser implantado nas indústrias de produtos de origem animal. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, p. 24, 16 mar 1998, Seção 1.
- Scalco AR. Proposição de um modelo de referência para gestão da qualidade na cadeia de produção de leite e derivados. [Tese de doutorado]. São Carlos, SP: Universidade Federal de São Carlos; 2004.
- Córdova MR. *Leche, su Producción higiénica y control sanitario*. 2ª ed. México; 1969.

17. Zanela MB, Fischer V, Ribeiro MER, Junior WS, Zanela C, Marques LT, et al. Qualidade do leite em sistemas de produção na região sul do Rio Grande do Sul. *Pesq Agropec Bras*. 2006;41(1):153-9.
18. Harris B Jr, Bachaman KC. Nutritional and management factors affecting solid-non-fat, acidity and freezing point of milk. Gainesville. Florida Cooperative Extension Service, DS25. *Inst Food Agric Science*. 1988.
19. Brasil. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, p. 13, 20 set. 2002, Seção 1.
20. Brasil. Portaria nº 369, de 4 de setembro de 1997, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, p. 19699, 08 set. 1997, Seção 1.
21. Krey T, Souza CFV. Avaliação da qualidade microbiológica e físico-química do leite em pó integral produzido numa indústria da região do Vale do Taquari (RS). *Interbio*. 2009;3(2):1-8.
22. Silva MCD, Silva JVL, Ramos ACS, Melo RO, Oliveira JO. Caracterização microbiológica e físico-química de leite pasteurizado destinado ao programa do leite no Estado de Alagoas. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2008;28(1):226-30.
23. Silva WO, Grootenboer CS. Sugestão de plano de análise de perigos e de pontos críticos de controle na produção de iogurte. *Pubvet*. 2008;2(33). Disponível em: [http://www.pubvet.com.br/artigos_det.asp?artigo=62].
24. Stein M. Controle da qualidade da industrialização do iogurte sem conservante com a aplicação da ferramenta APPCC. [Dissertação de mestrado]. Santa Maria, RS: Universidade Federal de Santa Maria; 2005.

Eficiência alimentar e qualidade proteica das sementes de baru e pequi procedentes do Cerrado brasileiro

Eficiência alimentar e qualidade proteica das sementes de *baru* e *pequi* procedentes do Cerrado brasileiro

RIALA6/1465

Amanda Goulart Oliveira SOUSA¹, Daniela Canuto FERNANDES¹, Maria Margareth Veloso NAVES^{*2}

*Endereço para correspondência: ²Laboratório de Nutrição Experimental, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Goiás (UFG). Rua 227, quadra 68, s/n, Setor Leste Universitário, CEP 74605-080, Goiânia, GO. Fone: (62) 3209-6270, ramal: 214. E-mail: mnaves@fanut.ufg.br

¹Departamento de Enfermagem, Nutrição e Fisioterapia, Pontifícia Universidade Católica de Goiás – PUC-GO, Goiânia, GO

Recebido: 10.02.2012- Aceito para publicação: 09.05.2012

RESUMO

Este trabalho avaliou a eficiência alimentar e a qualidade proteica das sementes de baru e pequi nativas do cerrado brasileiro. Os ratos Wistar machos, recém-desmamados (n = 24), distribuídos em quatro grupos, foram alimentados com diferentes dietas, contendo 10% de proteína: padrão (caseína, 7% de lipídios); controle (caseína, 15% de lipídios); baru (semente de baru, 15% de lipídios) e pequi (semente de pequi, 15% de lipídios). Determinaram-se os teores proteicos e lipídicos e estimou-se o teor de fibra alimentar total das dietas. A eficiência alimentar foi avaliada pelo Fator de Conversão Alimentar (FCA), e o valor proteico, por meio do PER (Protein Efficiency Ratio). O FCA variou de 2,8 (dieta padrão) a 10,5 (dieta de semente de pequi); e a dieta de semente de baru (FCA = 5,17) foi mais eficiente do que a dieta de semente de pequi. O valor de PER da semente de baru (2,11) foi superior ao da semente de pequi (1,0), e os valores de RPER (qualidade proteica relativa) dessas sementes foram, respectivamente, de 70% e 30%. A semente de baru possui melhor eficiência alimentar e qualidade proteica do que a semente de pequi, e sua proteína pode ser classificada como de qualidade intermediária a boa.

Palavras-chave. cerrado, qualidade proteica, baru, *Dipteryx alata* Vog., pequi, *Caryocar brasiliense* Camb.

ABSTRACT

This work evaluated the food efficiency and the protein quality of baru and pequi seeds from Brazilian savannah. Weaned male Wistar rats (n = 24) were distributed into four groups, and they were fed with the following diets containing 10% protein: standard (casein, 7% fat), control (casein, 15% fat); baru (baru seed, 15% fat) and pequi (pequi seed, 15% lipids). Protein and lipid contents were determined, and the total dietary fiber amount was estimated in the four diets. The food efficiency was estimated by the Food Conversion Ratio (FCR) and the protein value was determined by the PER (Protein Efficiency Ratio). The FCR ranged from 2.8 (reference group) to 10.5 (pequi seeds group), and the baru seed diet (FCR = 5.17) was more effective than the pequi seed-containing diet. The PER value of baru seed (2.11) was higher than that found in pequi seed (1.0), and the RPER (relative protein quality) values of these seeds were 70% and 30%, respectively. The baru seed showed better food efficiency and protein quality than the pequi seed, and its protein might be classified as from intermediate to good quality.

Keywords. cerrado, protein quality, baru, *Dipteryx alata* Vog, pequi, *Caryocar brasiliense* Camb.

INTRODUÇÃO

As proteínas de origem vegetal, como de leguminosas, cereais e sementes oleaginosas, são consideradas de qualidade inferior às proteínas de origem animal, em decorrência da menor digestibilidade e do perfil de aminoácidos indispensáveis, limitante em relação ao padrão de necessidades preconizado pela FAO¹ e WHO². Entretanto, as fontes proteicas vegetais são as principais fontes de proteína das populações de todo mundo. Além disso, em dietas ocidentais, recomenda-se o aumento do aporte de proteína vegetal, em detrimento da proteína animal, visando à redução do risco de doenças crônicas não transmissíveis³.

O Cerrado brasileiro constitui-se uma das mais ricas formações vegetais em diversidade de espécies frutíferas e é considerado o segundo maior bioma do Brasil, abrangendo os estados de Goiás, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, parte de Minas Gerais, Bahia e Distrito Federal⁴. Os frutos nativos em geral possuem considerável potencial agrícola e tecnológico, pois apresentam cores atraentes e sabores marcantes⁵. Dentre os frutos nativos do Cerrado, destacam-se o baru e o pequi, que possuem sementes comestíveis com elevados teores proteicos^{6,7}, mas que ainda são pouco consumidas, inclusive pela população local.

O fruto do barueiro (*Dipteryx alata* Vog.), o baru, possui em seu interior uma única semente comestível, popularmente denominada de “amêndoa de baru”, de coloração marrom a marrom-escuro, com 2 a 2,5 cm de comprimento e peso de, aproximadamente, 1,5 g⁸. Fernandes et al.⁶ observaram que amêndoa de baru, nativa da região sudeste do estado de Goiás, contém elevados teores de proteína (26 g/100 g), cuja qualidade proteica é de 75% em relação à proteína de referência, sendo, por isso, indicada como proteína complementar em uma dieta saudável.

O pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) é um fruto constituído por exocarpo e mesocarpo externo (partes desprezadas), mesocarpo interno (polpa de coloração amarelo-alaranjado) e endocarpo espinhoso, o qual contém uma semente comestível. A semente de pequi apresenta alto conteúdo de proteína (25 g/100 g), de acordo com Lima et al.⁹, porém deficiente no aminoácido lisina, sugerindo uma proteína de baixa qualidade¹⁰.

Todavia, estudos têm evidenciado uma grande variação nas características físicas e químicas dos frutos

de baru e de pequi, em decorrência da região de origem do fruto^{6,7,11}. Portanto, para uma melhor caracterização do valor nutricional, é recomendável o desenvolvimento de pesquisas com frutos oriundos de diferentes áreas do Cerrado.

Considerando a importância das proteínas vegetais para o aporte protéico e a saúde dos indivíduos, assim como a necessidade de mais estudos sobre o valor nutritivo de frutos nativos, o objetivo deste trabalho foi avaliar e comparar a eficiência alimentar e a qualidade proteica entre as sementes de baru e pequi, provenientes do Cerrado brasileiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção dos frutos, extração das sementes e preparo das amostras

Os frutos de baru foram adquiridos, na época da safra, nas regiões central, leste e sul do estado de Goiás. Os frutos de pequi foram provenientes de três regiões do bioma Cerrado (Goiás, Minas Gerais e Tocantins) e foram adquiridos na Central de Abastecimento de Goiás (Ceasa). Após a obtenção, os frutos de baru foram despulpados e as sementes de baru foram extraídas com auxílio de um equipamento do tipo guilhotina. Os frutos de pequi foram despulpados para obtenção dos pirênios, secos em estufa a 60 °C por 30 horas, e as sementes foram extraídas com auxílio de guilhotina adaptada¹². Após a extração, as sementes foram armazenadas sob refrigeração (-18 °C) até o processamento.

Para obtenção das farinhas, as sementes de baru e de pequi foram descongeladas sob refrigeração (5 °C por 12 horas) e torradas (formas usuais de consumo) em forno elétrico para inativação de possíveis fatores antinutricionais. A semente de baru foi torrada a 140 °C por 30 minutos⁶, e a semente de pequi, a 130 °C por 30 minutos¹². Posteriormente, as sementes foram moídas em multiprocessador do tipo doméstico e peneiradas até obtenção de uma farinha, usada na formulação das dietas do ensaio biológico.

Determinação dos teores de proteína, lipídios e estimativa da fibra alimentar total das farinhas e das dietas

As farinhas das sementes de pequi e de baru foram analisadas quanto ao teor de proteínas e lipídios para o cálculo de composição das dietas. As farinhas e

Tabela 1. Ingredientes e composição química das dietas utilizadas no ensaio biológico (g/100 g de dieta)

Componente	Dieta			
	Padrão	Controle	Semente de baru	Semente de pequi
<i>Ingrediente</i>				
Caseína	13,27	13,27	-	-
Semente de baru ¹	-	-	33,42	-
Semente de pequi ²	-	-	-	33,73
L-cistina	0,2	0,2	-	-
Óleo de soja ³	6,58	14,58	-	-
Celulose	5,00	5,00	0,52	4,26
Mistura salina	3,50	3,50	3,50	3,50
Mistura vitamínica	1,00	1,00	1,00	1,00
Bitartarato de colina	0,25	0,25	0,25	0,25
Amido de milho	70,20	62,20	61,31	57,26
<i>Composição</i>				
Proteína (g/100 g)	10,40	10,70	9,20	9,90
Lipídios (g/100 g)	6,70	14,90	14,40	17,20
Fibra alimentar total (g/100 g)	5,00	5,00	5,00	5,00

¹Semente de baru – teores de proteína e lipídios, respectivamente: $29,92 \pm 0,37$ g/100 g e $41,95 \pm 0,44$ g/100 g; teor de fibra alimentar total: 13,40 ± 0,30 g/100 g¹⁶.

²Semente de pequi – teores de proteína e lipídios, respectivamente: $29,65 \pm 0,55$ g/100 g e $50,00 \pm 0,66$ g/100 g; teor de fibra alimentar total: 2,20 ± 0,10 g/100 g⁹.

³Complementado para 7% na dieta padrão e 15% na dieta controle, para equivaler aos teores lipídicos das dietas experimentais.

as dietas foram submetidas à análise de lipídios totais, por meio de extração a frio, conforme técnica descrita por Bligh e Dyer¹³ e, posteriormente, determinados por gravimetria. A proteína total das farinhas e da dieta foi estimada a partir do nitrogênio total, segundo o método de micro-kjeldahl¹⁴, e conversão em proteína bruta utilizando-se o fator 6,25¹⁵.

O teor de fibra alimentar total das dietas foi estimado por meio dos valores relatados por Takemoto et al.¹⁶, para a semente de baru, e por Lima et al.⁹, para a semente de pequi (Tabela 1).

Formulação de dietas e ensaio biológico

Foram elaboradas as seguintes dietas, segundo formulação básica preconizada por AIN-93G¹⁷, com teor proteico ajustado para 10%: padrão (caseína, com 7% de lipídios); controle (caseína, com 15% de lipídios); baru (semente de baru, com 15% de lipídios); e pequi (semente de pequi, com 15% de lipídios) (Tabela 1). As farinhas das sementes não foram desengorduradas para a elaboração das dietas a fim de conservar suas características naturais. O óleo de soja foi adicionado nas dietas padrão e controle para complementar 7% e 15%, respectivamente, a fim de equivaler os teores lipídicos dessas dietas experimentais. A caseína, L-cistina, celulose, mistura salina, mistura vitamínica e bitartarato de colina foram adquiridos na Rhooster Indústria e Comércio Ltda. (São Paulo, SP).

Para a realização do ensaio biológico, foram utilizados ratos machos, albinos, da linhagem Wistar, recém-desmamados, com pesos entre 50 a 70 g, procedentes do Bioagri Laboratórios Ltda. (Planaltina-DF). Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos, contendo seis ratos cada, segundo delineamento por blocos casualizados. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais de aço galvanizado durante 31 dias (3 dias de aclimação e 28 dias de experimento), sob as seguintes condições ambientais padronizadas: ciclos claro e escuro de 12 h, temperatura média de 23 ± 2 °C e umidade média de 60%, com trocas de ar frequentes. A água destilada foi oferecida *ad libitum*. O consumo de dieta e o peso dos animais foram monitorados em dias alternados. Todos os procedimentos com animais foram realizados de acordo com o guia para cuidado e uso de animais de laboratório dos EUA¹⁸, e o protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Goiás (Protocolo n° 153/08).

Índices biológicos

A aceitação das dietas foi estimada pela porcentagem de dieta consumida (dieta ingerida × 100/dieta oferecida). A taxa de crescimento foi avaliada por meio do coeficiente angular da reta de regressão linear (período de experimento *versus* peso dos animais). O Fator de Conversão Alimentar (FCA) foi estimado conforme a

seguir: FCA = [quantidade de dieta consumida (g)/ganho de peso do animal (g)]¹⁹. O PER (Coeficiente de Eficiência Proteica) foi determinado conforme Pellet e Young²⁰: PER = [ganho de peso do grupo teste (g)/proteína ingerida pelo grupo teste (g)]. O RPER (Coeficiente de Eficiência Proteica Relativa) foi calculado segundo a fórmula: RPER = [(PER do grupo teste/PER do grupo padrão) × 100]. Além disso, foi estimado o PER corrigido, que corresponde ao PER das proteínas teste ajustado para o valor de 2,5 (valor padronizado de PER da caseína), de acordo com a seguinte fórmula²⁰: PER corrigido = [(PER do grupo teste/PER do grupo padrão) × 2,5].

Análise estatística

Os dados estão apresentados como média ± desvio-padrão. Os resultados do ensaio biológico foram submetidos à análise de variância e teste de comparação de médias (Tukey a 5% de probabilidade de erro). Foi feita análise de regressão linear do peso dos animais em relação ao tempo de experimento. Além disso, foi realizada análise de correlação entre os consumos de dieta e de proteína e o RPER das sementes de baru e de pequi, por meio do coeficiente de correlação de Pearson. Os cálculos foram feitos utilizando-se o programa STATISTICA versão 7.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA, 2004).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O consumo de dieta dos animais foi similar entre os grupos experimentais, e inferiores ao dos animais que receberam a caseína (Tabela 2). Os animais do grupo pequi consumiram quantidades inferiores de dieta e, conseqüentemente, de proteína, em relação aos demais

grupos (p < 0,05). A aceitação da dieta do grupo pequi foi de apenas 36%, o que contribuiu para o menor ganho de peso desse grupo. Em contrapartida, a aceitação da dieta com semente de baru foi de aproximadamente 60%, e as dietas com caseína, 70% (Tabela 2).

O menor consumo do grupo que recebeu dieta com a semente de pequi pode ser atribuído ao sabor forte dessa semente, que lembra o sabor marcante da polpa do fruto⁵. Além disso, a baixa aceitação da dieta pode também estar relacionada à modulação de apetite pelos animais, uma vez que os ratos reduzem a ingestão de dietas deficientes em aminoácidos indispensáveis, o que contribui para a redução da taxa de síntese proteica endógena e, por conseguinte, do ganho de peso^{21,22}. Após a ingestão de uma dieta desbalanceada em aminoácidos indispensáveis, há uma redução da concentração desses aminoácidos no córtex piriforme anterior dos ratos, com conseqüente rejeição da dieta pelo animal²³.

Em relação ao ganho de peso, observou-se que todos os grupos de animais apresentaram uma tendência linear positiva de evolução do peso corpóreo em função do tempo de experimento, sendo que os valores do coeficiente de determinação (R²) para todas as retas foram iguais ou superiores a 0,9 (Figura 1). A taxa de crescimento (coeficiente angular da reta de regressão linear) do grupo baru foi cerca de três vezes maior que a do grupo pequi, e inferior às dos grupos alimentados com caseína, conforme observado também no ganho de peso dos animais (Tabela 2).

O fator de conversão alimentar (FCA) variou de 2,8 a 10,5 (Tabela 3). O maior FCA foi observado para a dieta de semente de pequi, em comparação às dietas de controle e de semente de baru, o que indica que a semente de pequi foi menos eficiente em promover o crescimento dos animais. O FCA encontrado neste estudo para a

Tabela 2. Ganho de peso dos animais, consumo de dieta (total e percentual) e de proteína de ratos alimentados com diferentes dietas durante vinte oito dias de experimento¹

Dieta	Ganho de peso (g)	Consumo		
		dieta		proteína (g)
		total (g)	% ²	
Padrão	141,97 ± 21,77 ^a	441,05 ± 39,30 ^a	72,30 ± 6,44 ^a	45,83 ± 4,47 ^a
Controle	143,27 ± 6,49 ^a	407,02 ± 16,48 ^a	66,72 ± 2,70 ^a	43,43 ± 1,93 ^a
Semente de baru	67,65 ± 5,02 ^b	347,15 ± 18,48 ^b	57,01 ± 3,03 ^b	32,13 ± 1,71 ^b
Semente de pequi	22,10 ± 5,52 ^c	219,22 ± 29,01 ^c	35,94 ± 4,76 ^c	21,79 ± 3,16 ^c

¹Valores constituem médias ± desvios-padrão de seis animais. Em uma mesma coluna, médias com letras iguais não apresentam diferenças significativas a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

^{a,b,c} Em uma mesma coluna, valores seguidos da mesma letra não apresentam diferença significativa (Tukey, p < 0,05).

² Porcentagem de dieta ingerida em relação à quantidade oferecida.

dieta com semente de baru foi próximo ao constatado por Fernandes et al.⁶ (FCA= 5,8), que avaliou a qualidade proteica da semente de baru oriundo de apenas uma região do estado de Goiás durante 14 dias. No presente estudo, foi avaliado o valor proteico da semente de baru proveniente de várias regiões do Cerrado durante 28 dias. Apesar dessas diferenças, observou-se eficiência alimentar equivalente nos dois estudos para dietas com semente de baru.

O valor de PER determinado para a semente de baru foi inferior aos dos grupos padrão e controle ($p < 0,05$), sendo que a qualidade proteica relativa (RPER) dessa semente foi cerca de 70% (Tabela 3). A semente de baru pode ser considerada fonte de proteína de qualidade

intermediária à boa, uma vez que o PER corrigido dessa semente foi de 1,7. Se o PER fosse 2,0 (80% comparado ao padrão caseína - 2,5) poderia ser considerada uma proteína de boa qualidade, segundo Friedman²⁴. Esse resultado é compatível com o padrão de crescimento dos animais alimentados com a semente de baru (Figura 1). Ao contrário, a semente de pequi resultou em menor PER, o que confirma a deficiência de sua proteína em aminoácidos indispensáveis, como relatado na literatura¹⁰. Para as dietas experimentais, foi constatada uma correlação positiva entre o consumo total de dieta e o RPER ($r = 0,8414$) e entre o ganho de peso e o RPER ($r = 0,9129$).

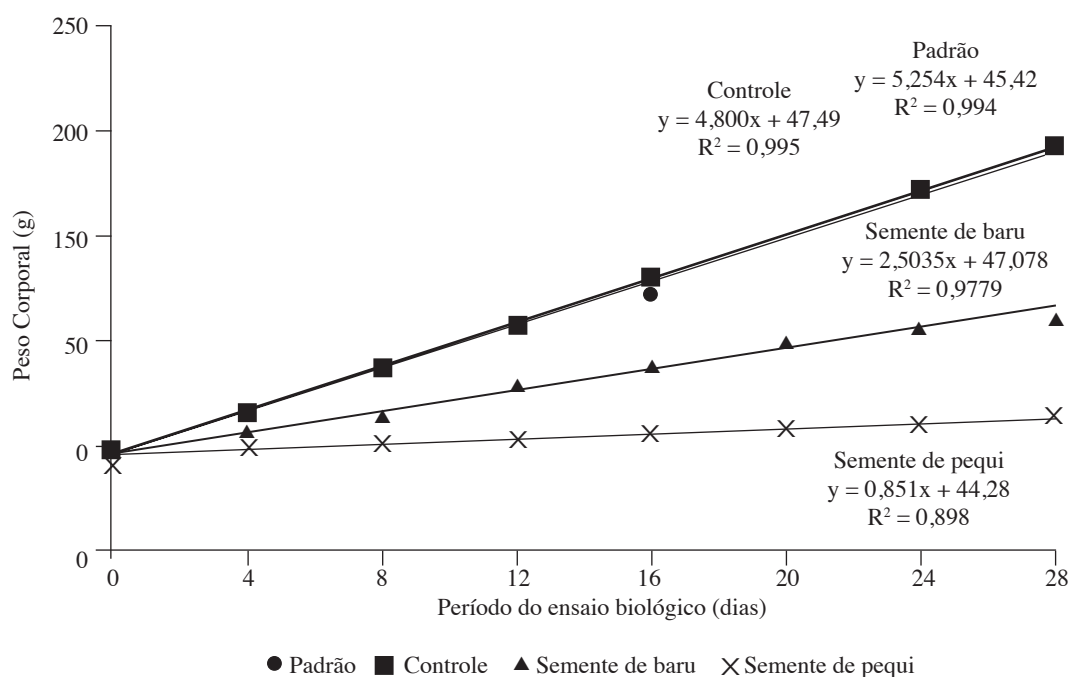


Figura 1. Evolução de peso de ratos tratados com diferentes dietas durante vinte dias de experimento

Tabela 3. Índices biológicos obtidos em ratos alimentados com diferentes dietas durante 28 dias

Índice ¹	Dieta ²			
	Padrão	Controle	Semente de baru	Semente de pequi
FCA	3,14 ± 0,29 ^c	2,85 ± 0,16 ^c	5,17 ± 0,50 ^b	10,47 ± 2,31 ^a
PER	3,30 ± 0,18 ^a	3,09 ± 0,26 ^a	2,11 ± 0,19 ^b	1,00 ± 0,19 ^c
RPER (%)	–	100 ^a	68,3 ± 6,0 ^b	32,4 ± 6,3 ^c
PER corrigido	2,5 ^a	–	1,71 ± 0,15 ^b	0,81 ± 0,16 ^c

¹FCA: Fator de Conversão Alimentar; PER: Coeficiente de Eficiência Protéica; RPER: Coeficiente de Eficiência Proteica Relativa.

²Dieta padrão: caseína com 7% de lipídios; Dieta controle: caseína com 15% de lipídios. Os valores constituem média ± desvio-padrão de seis animais.

^{a,b,c}Em uma mesma linha, valores seguidos da mesma letra não apresentam diferença significativa (Tukey, $p < 0,05$).

A semente de baru apresentou qualidade proteica similar à de fontes vegetais, como o feijão, das variedades Pérola e Diamante Negro (PER = 2,12 e 2,14, respectivamente)²⁵ e à semente de linhaça tratada termicamente (PER = 2,13)²⁶, e superior à do amendoim (PER = 1,59)²⁷. Quanto à qualidade relativa à caseína, a semente de baru apresentou RPER de 68%, valor semelhante ao relatado para a semente de linhaça, de 66%²⁶. Ressalta-se que o RPER da semente de baru do presente estudo (Tabela 3) foi próximo ao RNPR (74%) encontrado por Fernandes et al.⁶ Em estudo recente²⁸, que avaliou a qualidade protéica de sementes comestíveis e nozes brasileiras, por meio do método PDCAAS (Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Score), foi concluído que a semente de baru apresenta qualidade proteica intermediária, semelhante à do amendoim e da castanha-do-pará.

A semente de pequi apresentou baixa qualidade proteica (Tabela 3), comparável à proteína da farinha de trigo (PER = 0,98)²⁹, e inferior à da semente comestível *Terminalia catappa* (PER = 1,95), utilizada como fonte proteica na Nigéria³⁰. Não foram encontrados estudos na literatura sobre a qualidade proteica da semente de pequi avaliada pelo método PER. No entanto, Sousa et al.¹⁰ avaliaram a qualidade proteica da semente de pequi pelo método NPR (Net Protein Ratio) e observaram um valor proteico relativo (RNPR) de 54%, superior ao constatado neste estudo. O PER consiste em um método de avaliação da qualidade protéica que usa animais experimentais em crescimento, por um período de tempo mais longo que o NPR e, portanto, é considerado um método mais exigente em termos de qualidade proteica^{20,24}.

A qualidade proteica é determinada pela digestibilidade e perfil de aminoácidos da proteína de fontes alimentares^{1,2}. A digestibilidade proteica, por sua vez, depende da estrutura molecular da proteína e da presença de componentes não-proteicos, como taninos, fitatos e fibras alimentares¹. No presente estudo, a dieta de semente de pequi apresentou o maior teor de fibra, em comparação às demais dietas (Tabela 1), o que pode ter contribuído para a redução da digestibilidade da proteína desse alimento. Além disso, a baixa qualidade proteica da semente de pequi se deve, provavelmente, ao seu perfil de aminoácidos, limitado em lisina¹⁰, sendo inferior ao de nozes e amêndoas³¹.

CONCLUSÃO

A semente de baru possui melhor eficiência alimentar e qualidade proteica em relação à semente de pequi, podendo sua proteína ser classificada como de qualidade intermediária à boa. Por isso, o consumo da semente de baru é recomendado em uma alimentação saudável, ou como ingrediente de preparações, em substituição a outras sementes comestíveis, como o amendoim, e às nozes em geral, contribuindo assim para um aporte proteico adequado.

REFERÊNCIAS

1. FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation. Protein quality evaluation (FAO Food and Nutrition Paper nº 51). Rome: FAO; 1991.
2. WHO. World Health Organization. Report of a Joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation. Protein and amino acid requirements in human nutrition. Geneva: WHO; 2007.
3. WHO. World Health Organization. Report of a Joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Geneva: WHO; 2003.
4. Oliveira OS, Marquis RJ. The Cerrados of Brazil: ecology and natural history of a neotropical Savanna. Nova York: Columbia University Press, 2002.
5. Castro AM, Flavors of Cerrado. [Online]. Ministério das Relações Exteriores (Brasil), Brasília, DF (2009). [acesso 2009 out 30]. Disponível em: [http://www.dc.mre.gov.br/imagens-e-textos/revista-textos-do-brasil].
6. Fernandes DC, Freitas JB, Czeder LP, Naves MMV. Nutritional composition and protein value of the baru (*Dipteryx alata* Vog.) almond from the Brazilian Savanna. *J Sci Food Agric*. 2010;90(10):1650-5.
7. Vera R, Naves RV, Nascimento JL, Chaves LJC, Leandro WML, Souza ERB. Caracterização física de frutos do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) no estado de Goiás. *Pesqui Agropec Trop*. 2005;35(2):71-9.
8. Soares TN, Chaves LJ, Telles MPC, Diniz-Filho JAF. Landscape conservation genetics of *Dipteryx alata* ("baru" tree: Fabaceae) from Cerrado region of central Brazil. *Genetica*. 2008;132(1):9-19.
9. Lima A, Silva AMO, Trindade RA, Torres RP, Mancini-Filho J. Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). *Rev Bras Frutic*. 2007;29(3):695-8.
10. Sousa AGO, Fernandes DC, Alves AM, Freitas JB, Naves MMV. Nutritional quality and protein value of exotic almonds and nut from the Brazilian Savanna compared to peanut. *Food Res Int*. 2011;44(7):2319-25.
11. Correia GC, Naves RV, Rocha MR, Chaves LJ, Borges JD. Determinações físicas em frutos e sementes de baru (*Dipteryx alata* Vog.), cajuzinho (*Anacardium othonianum* Rizz.) e pequi (*Caryocar brasiliense* Camb). *Biosci J*. 2008;24:42-7.

12. Rabêlo AMS, Torres MCL, Geraldine RM, Silveira MFA. Extração, secagem e torrefação da amêndoa do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). *Cienc Tecnol Aliment*. 2008;28(4):868-71.
13. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*. 1959;37(8):911-7.
14. AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 15ª ed. Arlington (TX): AOAC; 1990.
15. FAO, Food and Agriculture and Organization of the United Nations. Amino-acid content of foods and biological data on proteins. Roma: FAO; 1970.
16. Takemoto E, Okada IA, Garbelotti ML, Tavares M, Aued-Pimentel S. Composição química da semente e do óleo de baru (*Dipteryx alata* Vog.) nativo do município de Pirenópolis, Estado de Goiás. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*. 2001;60(2):113-7.
17. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey JR GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*. 1993;123(11):1939-51.
18. NRC. Guide for the care and use of laboratory animals. National Research Council. Washington (DC): National Academy Press; 1996.
19. Martinez-Flores HE, Chang YK, Martinez-Bustos F, Sgarbieri V. Effect of high fiber products on blood lipids and lipoproteins in hamsters. *Nutr Res*. 2004;24(1):85-93.
20. Pellett PL, Young VR. Nutritional evaluation of protein foods. Tóquio: The United Nations University; 1980.
21. Bohé J, Low A, Wolfe RR, Rennie MJ. Human muscle protein synthesis is modulated by extracellular, not intramuscular amino acid availability: a dose response study. *J Physiol*. 2003;552:315-24.
22. Gomes MR, Pires ISO, Castro IA, Tirapegui J. Effect of protein restriction on plasma and tissue levels of insuline-like growth factor-1 (IGF-1) in adult rats. *Nutr Res*. 2003;23(9):1239-50.
23. Gietzen DW, Hao S, Anthony TG. Mechanisms of food intake repression in indispensable amino acid deficiency. *Annu Rev Nutr*. 2007;27:63-78.
24. Friedman M. Nutritional value of proteins from different food sources. A review. *J Agric Food Chem*. 1996;44(1):6-29.
25. Luján DLB, Leonel AJ, Bassinello PZ, Costa, NMB. Variedades de feijão e seus efeitos na qualidade proteica, na glicemia e nos lipídios sanguíneos em ratos. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2008;28(supl.):142-9.
26. Moraes EA, Carraro JCC, Dantas MIS, Costa NMB, Ribeiro SMR, Martino HSD. Qualidade proteica e eficiência alimentar de farinhas integrais de linhaça obtidas de sementes cruas e submetidas a tratamento térmico. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2010;69(4):531-6.
27. Singh B, Singh U. Peanut as a source of protein for human foods. *Plant Foods Hum Nutr*. 1991;41:165-77.
28. Freitas JB, Fernandes DC, Czeder LP, Lima JCR, Sousa AGO, Naves MMV. Edible seeds and nuts grown in Brazil as sources of protein for human nutrition. *Food Nutr Sci*. 2012. [acesso 2012 maio 4]. Disponível em: [<http://www.scirp.org/journal/fns>]. Doi: 10.4236/fns.2012.
29. Pires CV, Oliveira MGA, Rosa JC, Costa NMB. Qualidade nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes protéicas. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2006;26(1):179-87.
30. Ezeokkonkwo CA. The potential of *Terminalia catappa* (tropical almond) seed as a source of dietary protein. *J Food Qual*. 2002;27:207-19.
31. Freitas JB, Naves MMV. Composição química de nozes e sementes comestíveis e sua relação com a nutrição e saúde. *Rev Nutr*. 2010;23(2):269-79.

Geleia de cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.): desenvolvimento, caracterização microbiológica, sensorial, química e estudo da estabilidade

Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) jelly: development, microbiological, sensory, chemical characterization, and stability study

RIALA6/1466

Priscila Rossini Gomes SANTOS^{1*}, Leandro de Moraes CARDOSO¹, Sabrina de Freitas BEDETTI¹, Fabiana Rossi HAMACEK¹, Ana Vlândia Bandeira MOREIRA², Hércia Stampini Duarte MARTINO³, Helena Maria PINHEIRO-SANT'ANA¹

Endereço para correspondência: ¹Laboratório de Análise de Vitaminas, Departamento de Nutrição e Saúde, CCB II, Universidade Federal de Viçosa, Avenida PH Rolfs, s/n, Viçosa, Minas Gerais, CEP: 36571-000, Brasil. Tel: +55 (31) 3899-1684

²Laboratório de Análise de Alimentos, Departamento de Nutrição e Saúde, Universidade Federal de Viçosa

³Laboratório de Nutrição Experimental, Departamento de Nutrição e Saúde, Universidade Federal de Viçosa

Recebido: 03.02.2012- Aceito para publicação: 21.06.2012

RESUMO

Foram desenvolvidas geleias de cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.), nas quais caracterizaram-se parâmetros microbiológicos, sensoriais, químicos, e estabilidade durante o armazenamento. Quatro formulações de geleia foram elaboradas utilizando-se dois tipos de polpa (filtrada ou não filtrada) e duas proporções de polpa:sacarose:pectina (50:50:0,2 e 60:40:0,1). As quatro formulações foram submetidas à análise microbiológica e ao teste de aceitação sensorial. Selecionou-se uma formulação de geleia para determinar a composição centesimal e os parâmetros químicos (acidez titulável, sólidos solúveis, pH, ácido ascórbico e carotenoides), durante 120 dias. Não houve detecção de micro-organismos nas formulações. As formulações não apresentaram diferenças estatísticas na aceitação, com escores sensoriais entre 7,35 e 8,19 em todos os atributos avaliados. Após 120 dias de armazenamento, a formulação selecionada (G4: polpa filtrada:sacarose:pectina, proporções 60:40:0,1) apresentou significativas reduções em todos parâmetros químicos. Apesar disso, a formulação G4 manteve-se como fonte de vitamina C. Todas as formulações de geleia apresentaram-se seguras microbiologicamente e com boa aceitação sensorial. A formulação G4 apresentou bom valor nutricional, destacando-se como fonte de vitamina C. A produção, comercialização e consumo de geleia de cagaita são recomendados com o intuito de contribuir na geração de renda e melhoria do aporte nutricional, especialmente para indivíduos residentes na região do Cerrado.

Palavras-chave. fruto do cerrado, mapa de preferência interno, valor nutricional, cromatografia líquida de alta eficiência.

ABSTRACT

Cagaita Jellies (*Eugenia dysenterica* DC.) were developed and characterized as microbiological, sensory, chemical parameters and storage stability. Four jelly formulations were prepared using two types of pulp (filtered or unfiltered) and two amounts of pulp: sucrose: pectin (50:50:0.2 and 60:40:0.1). The four formulations were submitted to microbiological analysis and sensory acceptance test. One jelly formulation was selected to determine the proximate composition and chemical parameters (titratable acidity, soluble solids, pH, ascorbic acid, and carotenoids) for 120 days. There was no detection of microorganisms in the formulations. The formulations presented no differences in acceptability and sensory scores between 7.35 and 8.19 for all attributes. After 120 days of storage, the selected formulation (G4: pulp filtered: sucrose: pectin ratio 60:40:0.1) showed significant reductions in all chemical parameters. Nevertheless, G4 formulation remained as a source of vitamin C. All jelly formulations showed up microbiologically safe and good acceptability. The G4 formulation showed good nutritional value, stand out as a source of vitamin C. The production, marketing and consumption of cagaita jelly are recommended in order to contribute to income generation and improvement of nutrition, especially for individuals living in the Cerrado region.

Keywords. cerrado fruit, internal map of preference, nutritional value, high performance liquid chromatography.

INTRODUÇÃO

A heterogeneidade vegetal do Cerrado de Minas Gerais é em grande parte desconhecida, sendo utilizada de diversas formas por famílias pertencentes a esse bioma. Os frutos do Cerrado ocupam posição de destaque devido ao seu potencial econômico e contribuição na geração de renda, e, principalmente, devido ao seu aproveitamento alimentar¹. Esses frutos, ao serem utilizados na culinária, podem contribuir para a valorização da identidade cultural da população e interferir de forma importante na melhoria da alimentação e aporte nutricional.

Entre os frutos nativos do Cerrado, destaca-se a cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.). Este fruto apresenta formato globoso, levemente achatado, casca frágil de coloração amarelo-claro e polpa com sabor agradável, levemente ácida¹. Além do consumo *in natura*, a polpa da cagaita pode ser utilizada para fabricação de doces, sucos, licores e geleias². Entretanto, a produção do fruto é sazonal, e estes produtos não são disponíveis em todas as regiões do Brasil, o que justifica seu aproveitamento no desenvolvimento de produtos e posterior comercialização.

A geleia é o produto obtido pela cocção de frutas inteiras ou em pedaços, polpa ou suco de frutas, com adição de açúcar, água, e concentrado até consistência gelatinosa³. É comumente utilizada para acompanhar pão, bolo, biscoitos e artigos de confeitaria. O uso da tecnologia de alimentos para a fabricação de novos produtos, como a geleia, pode ser uma alternativa viável para o processamento, aproveitamento e consumo de frutos exóticos do Cerrado, proporcionando maior oferta e aumento da vida de prateleira, bem como contribuir para a agregação de valor ao fruto e geração de renda⁴.

Durante o processamento, pode ocorrer degradação de nutrientes lábeis e compostos biologicamente ativos, como as vitaminas e carotenóides, o que resulta em mudanças na composição nutricional dos alimentos e compromete a qualidade final do produto. Os principais fatores que contribuem para essas alterações são a temperatura, luz, oxigênio, umidade, pH, agentes oxidantes e redutores e presença de íons metálicos⁵.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver formulações de geleia de cagaita, caracterizá-las quanto aos parâmetros microbiológicos, sensoriais, químicos e avaliar a estabilidade do produto ao longo de 120 dias de armazenamento.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi conduzido nos Laboratórios de Análise Sensorial e Desenvolvimento de Novos Produtos, Higiene dos Alimentos, Análise de Alimentos e Análise de Vitaminas, localizados no Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

O projeto de pesquisa foi aprovado (Of. Ref. nº 0160/2010/Comitê de ética), sob o aspecto ético pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFV.

Equipamentos

Para elaboração das geleias, análise microbiológica, análises químicas, extração de carotenoides e vitamina C e preparo da fase móvel foram utilizados os seguintes equipamentos: processador doméstico de alimentos (Philips-Walita, R17625), balança semianalítica (Gehaka, BG 2000), pHmetro (Hexis, UB10), refratômetro digital de bancada (Instrutherm, RTP-45), banho-maria (Fanem, 102), estufa de cultura (Fanem, 002-CB), estufa (DeLeo), liofilizador (Liobras, LP510) extrator Soxhlet (Eletrothermo, 500WX), mufla (Quimis, 318), destilador de nitrogênio (Solab), bloco digestor (Gerhardt, Kjeldatherm), microtriturador (Marconi, MA 102), bomba de vácuo (Tecnal, TE-058), centrífuga (Excelsa Baby II, com cruzeta angular 4 x 100 mL, Fanem, 206-R), centrífuga microprocessada (Quimis, Q222EM), agitador magnético (Marconi, MAO93), evaporador rotativo (Biothec, BT351), estufa (Brasdonto, M4), estufa (Nova Ética), balança analítica (Gehaka, AG 200), espectrofotômetro (Thermo Scientific, Evolution 60S), sistema de filtração para fase móvel (All Glass), sistema de ultrapurificação de água (Millipore, Direct Q UV 3) e degaseificador ultrassônico (Odontobrás, T-14).

Para análise de carotenoides e vitamina C, utilizou-se sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Shimadzu, SCL 10AT VP), composto de bomba de alta pressão (Shimadzu, LC-10AT VP), injetor automático com alça de amostragem de 50 µL (Shimadzu, SIL-10AF) e detector de arranjos de diodos (DAD) (Shimadzu, SPD-M10A). O sistema CLAE foi controlado pelo *software Multi System, Class Vp 6.12*.

Reagentes e outros materiais

Para análise microbiológica foram utilizados os seguintes meios de cultura: ágar batata dextrose – PDA

(Merck, Brasil); ágar salmonella-shigella – SS (Merck, Brasil) e verde brilhante – BG (Merck, Brasil); caldo lauril sulfato triptose – LST (Vetec, Brasil); caldo selenito – Cistina (Merck, Brasil); caldo rappaport (Acumedia); e caldo lactosado (Merck, Brasil).

Para realização das análises químicas e preparo dos extratos de carotenóides e vitamina C foram utilizados os seguintes reagentes com grau analítico: fosfato de sódio monobásico anidro (NaH_2PO_4) (Synth, Brasil); éter de petróleo, acetona e sal etilenodiaminotetraacético (EDTA) (Proquímios, Brasil); cloreto de sódio e ácido metafosfórico (AMP) (Vetec, Brasil); sulfato de sódio anidro (Impex, Brasil); e ácido sulfúrico (H_2SO_4) (Mallinckrodt, USA).

Para análise de carotenóides e vitamina C, foram utilizados reagentes grau HPLC: acetona, acetato de etila, metanol e acetonitrila (Tedia, Brasil); ácido acético glacial (Vetec, Brasil). A água ultrapura foi produzida em sistema de ultrapurificação de água. Para a filtração das amostras, utilizou-se papel de filtro nº JP41 J. (Prolab, Brasil), seringas descartáveis esterilizadas de 3 mL (TKL, China), unidades filtrantes HV Millex, em polietileno, 0,45 μm de porosidade (Millipore, Brasil).

O ácido L-ascórbico foi adquirido da Sigma-Aldrich[®] (Alemanha). Os padrões de α -caroteno e β -caroteno foram isolados de extrato concentrado de cenoura; β -criptoxantina e licopeno foram isolados de extratos de tomate e mamão, respectivamente, por cromatografia de coluna aberta⁶.

Matéria-prima e obtenção de polpa

Foram utilizados frutos de cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) coletados em áreas de vegetação nativa com formação típica de Cerrado, na zona rural do município de Curvelo, Minas Gerais. A sacarose foi adquirida no comércio local e a pectina (CP Kelco, EUA), gentilmente, cedida pelo Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFV.

Os frutos de cagaita utilizados na elaboração das geleias foram adquiridos de pequenos produtores rurais nos meses de outubro e novembro de 2010. Para evitar possíveis injúrias durante o transporte, os frutos foram coletados com maturação incompleta (“de vez”) e transportados em sacos plásticos acondicionados em caixas de isopor. No Laboratório de Análise de Vitaminas, os frutos foram selecionados visualmente quanto ao grau de maturação e a ausência de manchas ou injúrias, sendo utilizados apenas frutos íntegros e com maturação completa (casca 100% amarela e textura macia).

Os frutos selecionados foram lavados em água corrente para eliminação de sujidades superficiais e secos em temperatura ambiente. Em seguida, os frutos foram despulpados manualmente e homogeneizados em processador doméstico de alimento (Philips-Walita, R17625). Posteriormente, a polpa foi dividida em dois lotes tratados conforme descrito a seguir: Lote 1 – acondicionamento em sacos plásticos, branqueamento sob imersão em água a 70 °C, por dois minutos, e armazenamento em temperatura de -18 °C (± 1 °C); Lote 2 – filtração manual da polpa em peneira plástica (9 cm de diâmetro, em tela de polietileno, malha 16), seguido de acondicionamento, branqueamento e armazenamento idênticos ao Lote 1.

Elaboração das geleias

Foram elaboradas quatro formulações de geleia de cagaita, utilizando polpa não filtrada (G1 e G2) e polpa filtrada (G3 e G4). As formulações G1 e G3 possuíam em sua composição 50% de polpa, 50% de sacarose e 0,2% de pectina, enquanto as formulações G2 e G4 continham 60% de polpa, 40% de sacarose e 0,1% de pectina. As concentrações de pectina foram calculadas levando-se em consideração a quantidade total de polpa e açúcar contida na formulação, baseado nos resultados de pré-testes efetuados, variando-se as concentrações de polpa, açúcar e pectina. Considerando a legislação brasileira, todas as formulações elaboradas foram classificadas como geleia do tipo extra, uma vez que apresentam porcentagem igual ou superior a 50% de polpa³.

O preparo das geleias foi realizado em panela de alumínio doméstica com capacidade de 2 litros. Inicialmente, adicionou-se sacarose às polpas filtrada e não filtrada de cagaita, sendo a mistura submetida à cocção em fogão doméstico, para dissolução dos açúcares, com agitação manual contínua, por aproximadamente 4 minutos, até concentração máxima dos sólidos solúveis de 42 °Brix. Após a dissolução do açúcar e concentração da mistura, adicionou-se pectina diluída em pequena quantidade de água morna, sendo a mistura mantida em fogo brando, com agitação manual contínua, por 2 minutos. A geleia foi envasada em frascos de vidro, previamente esterilizados (121 °C, por 15 minutos), sendo o oxigênio contido no interior dos frascos removido por meio da adição de nitrogênio. Em seguida, os frascos foram lacrados e armazenados à temperatura ambiente (em média, 19 °C), por 120 dias.

Análises microbiológicas

Realizou-se a análise de coliformes totais e coliformes termotolerantes, salmonelas, bolores e leveduras, em todas as formulações elaboradas, seguindo as recomendações resolução da Anvisa³.

As análises de coliformes totais e termotolerantes foram realizadas por meio da contagem do número mais provável (NMP)⁷. Para a contagem presuntiva de coliformes totais, 25 g de cada formulação de geleia foram homogeneizados em 225 mL de água peptonada 0,1%, em *Stomacher*[®] (Seward, UK) (diluição 10⁻¹). Diluições decimais 10⁻² e 10⁻³ foram preparadas com o mesmo diluente. Alíquotas de 1 mL de cada diluição foram inoculadas em três tubos com Caldo Lauril Sulfato com tubos de Durhan invertidos e incubados á 35 °C entre 24-48 horas.

Para a detecção de salmonela, foi utilizada a metodologia de Silva et al.⁷, com modificações. Realizou-se a etapa de pré-enriquecimento em que foram homogeneizados 25 g da geleia com 225 mL de caldo de pré-enriquecimento incubado a 35 °C por 24 horas. Posteriormente, foi realizado o enriquecimento em caldos seletivos sendo inoculado 1 mL do pré-enriquecimento em tubos com 10 mL dos caldos Selenito – Cistina e 0,1 mL no caldo Rappaport, sendo o primeiro incubado a 35 °C por 24 horas, e o segundo a 42 °C por 24 horas em banho-maria. Após o período de incubação, foi realizado o plaqueamento seletivo diferencial em placas contendo Agar Hektoen-Enteric (HE), agar xilose lisina desoxicolato (XLD), agar bismuto sulfito (BS) e incubado a 35 °C por 24 horas.

A análise de bolores e leveduras foi realizada seguindo as normas internacionais da American Public Health Association⁸. Pesou-se 25 g de geleia, e homogeneizou em 225 mL de água peptonada tamponada a 0,1%. A diluição obtida correspondeu à diluição 10⁻¹, a partir da qual foram obtidas as demais diluições decimais subsequentes, 10⁻² e 10⁻³. Posteriormente, 0,1 mL das diluições de cada amostra foram plaqueadas em placas de Petri, contendo meio PDA (potatodextrose-ágar) acidificado e incubados a 25 °C por 3 dias.

Análise sensorial

Por meio do teste de aceitabilidade, as quatro formulações foram avaliadas quanto ao sabor, cor, aroma, textura e impressão global. Cem julgadores não treinados, adultos, de ambos os sexos, foram abordados de forma aleatória em supermercado local. Participaram

da pesquisa somente os indivíduos que concordaram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

As amostras, codificadas com algarismos de três dígitos, foram apresentadas aos consumidores de forma monádica. Foram oferecidas 5 g de cada geleia, em copos descartáveis de 50 mL em temperatura ambiente, devidamente codificados, sendo servidas com biscoito tipo água e sal como alimento base e água mineral para limpeza da cavidade oral.

Cada julgador recebeu, juntamente com as amostras, uma ficha de resposta e lhe foi solicitado que marcasse, dentro de uma escala, o seu julgamento em relação a cor, sabor, aroma, textura e impressão global. Foi utilizada uma escala hedônica de 9 pontos, sendo atribuído nota 9 para o termo “gostei extremamente” e nota 1 para “desgostei extremamente”.

Análises químicas

Análises físico-químicas

A acidez titulável, sólidos solúveis e pH foram avaliados ao longo do período de armazenamento nos dias 15, 30, 60 e 120. A análise de acidez titulável da geleia foi realizada por meio da volumetria de neutralização, utilizando solução padrão de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 mol/L na presença de solução de fenolftaleína (C₂₀H₁₄O₄) a 1%. O teor de sólidos solúveis (°Brix) foi determinado pelo índice de refração, utilizando um refratômetro digital de bancada (Instrutherm, RTP-45). O pH foi obtido por medida direta em phmetro calibrado com soluções tampão de pH 4 e 7¹⁰.

Composição centesimal

Foram determinados os conteúdos de umidade, cinza, proteínas, lipídios, carboidratos e fibra alimentar total¹¹, logo após o preparo do produto (tempo zero). A umidade foi determinada por liofilização em temperatura de -25 a 25 °C por 72 horas. As cinzas foram determinadas em mufla a 550 °C. O teor de proteínas foi determinado utilizando-se o método de micro-Kjeldhal para nitrogênio total, utilizando-se o fator de 6,25 e fibra alimentar total utilizando-se o método gravimétrico não enzimático. Os lipídios foram determinados em extrator Soxhlet e os carboidratos calculados por diferença por meio da equação: 100 – % de umidade – % de lipídios – % de proteínas – % de fibra alimentar total – % de cinza. O valor energético total foi estimado considerando-

se os fatores de conversão de 4 kcal/g para proteína e carboidrato e 9 kcal/g para lipídios¹².

Vitamina C

Foi investigada a ocorrência e o conteúdo de vitamina C (na forma de ácido ascórbico-AA) nos tempos 0; 3; 6 e 24 horas; 15, 30, 45, 60, 90 e 120 dias.

Para extração e análise do AA, foram utilizadas as condições otimizadas por Campos et al.¹³ com modificações. Foram pesados, aproximadamente, 5 g de geleia, a qual foi homogeneizada, em microtritador, por 5 minutos, em 15 mL de solução extratora (ácido metafosfórico 3%, ácido acético 8%, ácido sulfúrico 0,3 N e EDTA 1mM) e filtrada a vácuo em funil de büchner, utilizando-se papel de filtro. Posteriormente, o volume do filtrado foi completado para 25 mL, com água ultrapura, centrifugado a 4.000 rpm (1789 g). Posteriormente, o extrato foi re-centrifugado a 14.000 rpm (21.913 g), por 5 minutos, e o sobrenadante mantido sob refrigeração (5 ± 1 °C) até o momento da análise (aproximadamente, 30 minutos).

Antes da injeção, o extrato foi filtrado utilizando-se unidades filtrantes com 0,45 µm, sendo injetados 50 µL na coluna cromatográfica para análise. As condições para análise de AA foram: coluna RP-18 Lichrosper 100, 250 x 4 mm, 5 µm, DAD com detecção a 245 nm; fase móvel composta de água ultrapura contendo 1 mM de fosfato monobásico de sódio, 1 mM de EDTA e pH ajustado para 3,0 com ácido fosfórico; fluxo da fase móvel de 1,0 mL/minuto; tempo de corrida de 5 minutos¹³.

Carotenoides

Foram investigados a ocorrência e o conteúdo de carotenoides (α-caroteno, β-caroteno, β-criptoxantina e licopeno) nos tempos 0; 3; 6 e 24 horas; 15, 30, 45, 60, 90 e 120 dias.

O processo de extração dos carotenoides foi adaptado a partir da metodologia proposta por Rodriguez-Amaya¹⁴. Cerca de 5 g da geleia foram homogeneizados em 30 mL de acetona (dividida em três volumes de 10 mL) por, aproximadamente, 5 minutos em microtritador. O extrato foi filtrado a vácuo em funil de büchner, utilizando-se papel de filtro. Em seguida, o filtrado foi transferido, em três frações, para um funil de separação contendo 25 mL de éter de petróleo, para a transferência dos pigmentos da acetona para o éter. Cada fração foi lavada três vezes com água destilada para retirar toda a acetona. Acrescentou-se sulfato de sódio

anidro ao extrato para retirar qualquer resíduo de água que, porventura, tivesse restado e que pudesse prejudicar a evaporação do material. Os pigmentos foram, então, redissolvidos em quantidade conhecida de éter de petróleo em balão volumétrico de 25 mL e armazenados em frascos de vidro âmbar, a -5 ± 2 °C, por, no máximo, 3 horas.

Para análise, uma alíquota de 1 mL do extrato foi evaporada sob fluxo de nitrogênio gás, sendo, em seguida, recuperada em 1 mL de acetona grau HPLC. O extrato foi filtrado em unidade filtrante com porosidade de 0,45 µm, sendo injetados 50 µL na coluna cromatográfica para análise.

A análise de carotenoides seguiu as condições cromatográficas desenvolvidas por Pinheiro-Sant'Ana et al.¹⁵, com modificações: sistema CLAE, DAD com detecção a 450 nm; coluna RP-18 Phenomenex Gemini, 250 x 4,6 mm, 5 µm, munida de coluna de guarda Phenomenex ODS (C18), 4 mm x 3 mm; DAD; fase móvel – metanol: acetato de etila: acetonitrila (80:10:10, v/v/v); fluxo da fase móvel: 2,0 mL/minuto; e tempo de corrida de, aproximadamente, 18 minutos.

O valor de vitamina A foi calculado segundo as recomendações do *Institute of Medicine*¹⁶ em que 1 Equivalente de Atividade de Retinol (RAE) equivale a: 1 µg de retinol, 12 µg de β-caroteno ou 24 µg de outros carotenóides provitamínicos.

Delineamento experimental e análise estatística dos dados

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado para as análises químicas, microbiológicas e de carotenoides e vitamina C com três repetições. Para a análise sensorial, utilizou-se o delineamento em blocos casualizados, sendo os blocos representados pelos julgadores.

Os resultados obtidos no teste de aceitação foram avaliados por meio da técnica de mapa de preferência interno, baseado no modelo de análise de componente principal e por análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. Os dados da análise de estabilidade foram avaliados por meio da Anova, seguida pela análise de regressão ao nível de 5% de significância. Todas as análises estatísticas foram conduzidas utilizando-se o software SAS (*Statistical Analysis System*)¹⁷, versão 9.2 (2004-2008), licenciado para a UFV.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização microbiológica

Nenhuma das quatro formulações de geleia de cagaita apresentou contagem dos micro-organismos pesquisados, enquadrando-se, assim, nos padrões microbiológicos estabelecidos pela legislação¹⁸. Esses resultados indicam eficiência das boas práticas de higiene durante os procedimentos realizados ao longo do processamento das geleias e efetividade do tratamento térmico empregado.

A ausência dos micro-organismos pesquisados deve-se também à composição química e características intrínsecas da geleia, que apresenta elevado conteúdo de açúcar, pH ácido (3,51) e teor elevado de sólidos solúveis (41,23 °Brix). Segundo Harrigan e Park¹⁹, em condições de pH ácido e sólidos solúveis elevados, não ocorre crescimento de bactérias causadoras de doenças de origem alimentar. Além disso, a presença do açúcar aumenta a pressão osmótica do meio e, conseqüentemente, diminui a atividade de água do alimento, bem como remove a camada de água que protege as moléculas de pectina, possibilitando a formação do gel pectina-açúcar, criando, assim, condições desfavoráveis para o crescimento de bactérias, leveduras e bolores²⁰.

Sabe-se ainda que bolores e leveduras apresentam baixa resistência térmica e raramente estão associados a processos de deterioração de produtos que sofreram tratamento térmico²¹.

Caracterização sensorial

Não houve diferença significativa entre as formulações de geleia quanto aos atributos de sabor, cor, aroma, textura e impressão global ($p > 0,05$) (Tabela 1). Os atributos sensoriais de todas as formulações apresentaram boa aceitação, com escores variando de 7,52 a 8,19, ou seja, entre os termos hedônicos “gostei moderadamente” e “gostei extremamente”.

Com os resultados obtidos no teste de aceitação quanto à impressão global, das quatro amostras de geleia

de cagaita foi realizada a análise do Mapa de Preferência Interno (Figura 1). Cada ponto do mapa representa as correlações entre os dados de aceitação de um consumidor e os dois primeiros componentes principais. Para obtenção deste, os dados foram organizados em uma matriz de amostras (em linhas) e consumidores (em colunas), e esta submetida à Análise de Componentes Principais. Este identifica a principal variação dentro dos dados de preferência e extrai a primeira dimensão de preferência (primeiro componente principal), representando o maior conjunto de variação na aceitação das amostras. As demais dimensões, ortogonais entre si, são extraídas até que todas as variações dos dados sejam explicadas²².

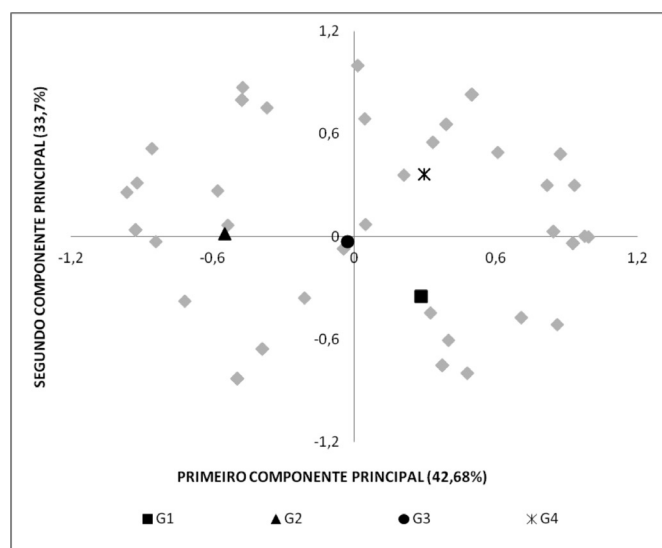


Figura 1. Correlações entre os dados de aceitação de cada consumidor e os dois primeiros componentes principais, e dispersão das amostras de geleia de cagaita em relação à aceitação. G1 – polpa não filtrada:sacarose:pectina (50:50:0,2); G2 – polpa não filtrada:sacarose:pectina (60:40:0,1); G3 – polpa filtrada:sacarose:pectina (50:50:0,2); G4 – polpa filtrada:sacarose:pectina (60:40:0,1)

Tabela 1. Atributos de cor, sabor, aroma, textura e impressão global de formulações de geleia de cagaita^{1,2}

Atributos	G1 ³	G2 ⁴	G3 ⁵	G4 ⁶
Cor	8,18 ^a ± 1,02	7,95 ^a ± 1,24	8,11 ^a ± 1,15	8,19 ^a ± 0,90
Sabor	7,78 ^a ± 1,39	7,6 ^a ± 1,43	7,94 ^a ± 1,14	7,99 ^a ± 0,98
Aroma	7,54 ^a ± 1,51	7,52 ^a ± 1,51	7,58 ^a ± 1,58	7,69 ^a ± 1,45
Textura	7,77 ^a ± 1,31	7,69 ^a ± 1,31	8,01 ^a ± 1,26	7,95 ^a ± 1,18
Avaliação Global	7,95 ^a ± 1,19	7,97 ^a ± 1,10	7,98 ^a ± 1,05	8,09 ^a ± 1,03

¹ Dados apresentados em média ± DP; ² Médias seguidas por letras iguais na linha não diferem estatisticamente pela análise de variância (ANOVA). ³ G1- polpa não filtrada:sacarose:pectina (50:50:0,2); ⁴ G2 - polpa não filtrada:sacarose:pectina (60:40:0,1); ⁵ G3- polpa filtrada:sacarose:pectina (50:50:0,2); ⁶ G4 - polpa filtrada:sacarose:pectina (60:40:0,1)

O primeiro componente principal explicou 33,70% e o segundo, 42,68%, totalizando, portanto, 76,38% da variância entre as amostras quanto à sua impressão global. A separação espacial das amostras de geleia sugere a existência de quatro grupos distintos de acordo com a aceitação das mesmas em relação à impressão global. Assim, pode-se sugerir que consumidores diferentes deram notas diferentes para as amostras, mas todas elas foram bem aceitas, visto que as quatro amostras ficaram bem distribuídas, não havendo uma mais aceita do que a outra, confirmando a análise de variância.

Uma vez que as formulações apresentaram mesma aceitação sensorial, selecionou-se a formulação G4 para a análise da composição centesimal e avaliação da estabilidade ao longo do armazenamento, por esta ser a única formulação a apresentar escore de impressão global entre os termos “gostei muito” e “gostei extremamente”.

Caracterização química

No tempo zero, a formulação G4 apresentou acidez titulável e pH acima do recomendado (Tabela 2). De acordo com Jackix²³, a acidez não deve exceder 0,8% e o pH 3,4, sendo que pH abaixo de 3,0 ocorre tendência a sinérese. Entretanto, o pH e a acidez titulável ligeiramente acima do recomendado não foram percebidas pelos julgadores, não interferindo dessa forma na qualidade final do produto. Essa formulação obteve uma boa aceitação sensorial, com médias entre os termos “gostei moderadamente” e “gostei muito”.

Tabela 2. Características químicas da geleia de cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.)

Variáveis em base úmida*	Média* ± DP
Acidez titulável (ácido cítrico/100 g)	1,28 ± 0,18
Sólidos solúveis (°Brix)	41,2 ± 0,05
pH	3,51 ± 0,02
Umidade (g/100 g)	35,21 ± 1,53
Cinza (g/100 g)	0,33 ± 0,01
Proteínas (g/100 g)	0,65 ± 0,03
Lipídios (g/100 g)	0,53 ± 0,03
Carboidratos (g/100 g)	61,76 ± 1,20
Fibra alimentar total (g/100 g)	1,56 ± 0,30
Valor energético total (kcal/100 g)	254,10 ± 1,26
Ácido ascórbico (mg/100 g)	31,22 ± 3,72
Ácido β – caroteno (mg/100 g)	0,403 ± 0,04
Ácido β – criptoxantina (mg/100 g)	0,143 ± 0,02
Valor de vitamina A (RAE/100 g)	39,57 ± 4,17

DP = desvio padrão; *média de 3 repetições

Outros autores também encontraram valores de pH diferentes desse valor ótimo. Caetano et al.²⁴ obtiveram pH variando de 3,42 a 3,48 em geleia de acerola e Lago et al.²⁵ verificaram pH de 3,41 em geleia de jambolão.

O teor de sólidos solúveis está de acordo com o encontrado por Mota²⁶, em estudo com geleia de amora-preta, cultivar Caingangue, em que se observaram sólidos solúveis de 47,15 °Brix.

A geleia de cagaita apresentou elevado teor de carboidratos e umidade e conteúdo reduzido de proteínas, lipídios, fibras e cinza. O teor de umidade está de acordo com o estabelecido pela legislação, que recomenda umidade de 35% para geleia do tipo extra. Zambiasi et al.²⁷ encontraram faixas de valores semelhantes em geleias *light* de morango nos teores de umidade, proteínas, carboidratos e valor energético total. O teor de cinza foi similar ao observado por Barcia et al.²⁸ em geleias de jambolão.

O teor de AA da geleia determinado no tempo zero, foi similar ao encontrado por Silva²⁹, em geleia de laranja (36,48 mg/100 g) e o valor de vitamina A foi inferior ao observado em geleia de acerola (121 RAE/100 g)³⁰.

Para determinar o valor nutritivo de um alimento, é importante associá-lo a fontes alimentares, considerando a porção usualmente consumida e às *Dietary Reference Intake (RDA/AI)*. Os alimentos podem ser classificados como “fontes” de um nutriente quando suprem de 5% a 10% das *Dietary Reference Intake (DRI)*, como “boas fontes” quando suprem de 10 a 20% da *DRI* e como “fontes excelentes”, quando atendem mais de 20% da *DRI*³¹.

Considerando que a porção de geleia de cagaita corresponde a 20 g³² observa-se que o de consumo uma porção pode suprir 8,32% da *RDA* de vitamina C³³ e 1,26% da *RDA* de vitamina A³⁴, para adultos, sendo assim considerado fonte de vitamina C.

Estabilidade da geleia de cagaita

Na Figura 2, observam-se os resultados das análises químicas da geleia de cagaita ao longo do armazenamento. Todos os parâmetros avaliados apresentaram variações significativas, comparando o tempo 0 (zero) com o tempo 120 dias ($p < 0,05$).

Houve redução gradual do conteúdo de sólidos solúveis ao longo do armazenamento. A redução dos teores de sólidos solúveis em todos os meses também foi observada por Mota²⁶ em formulações de geleia de amora

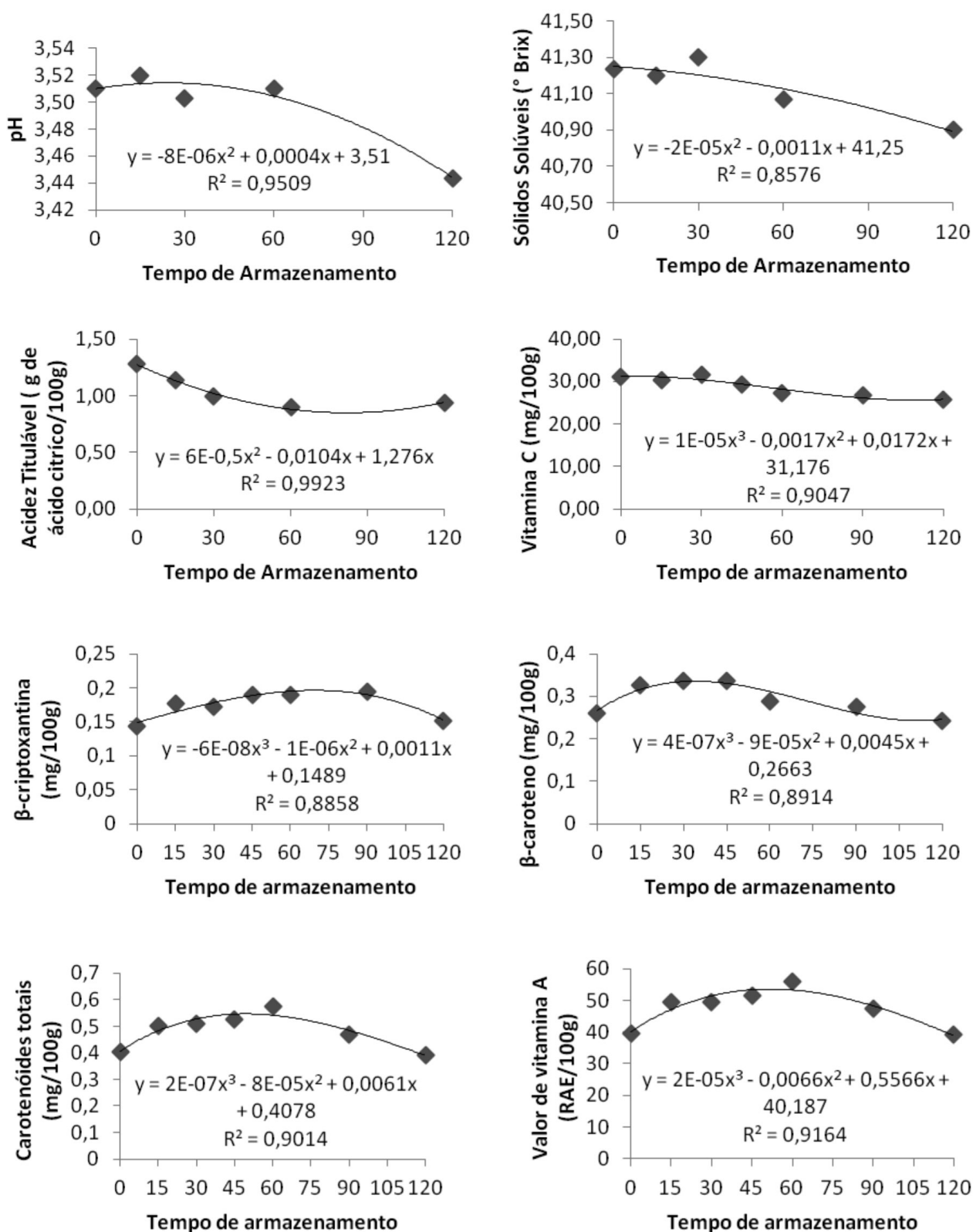


Figura 2. Valores médios e equação de regressão do pH, sólidos solúveis, acidez titulável, vitamina C, β-criptoxantina, β-caroteno, carotenóides totais e valor de vitamina A em geleia de cagaita, ao longo de 120 dias

preta. Sabe-se que os sólidos solúveis são constituídos por compostos solúveis em água, representados por substâncias como açúcares, ácidos orgânicos, vitamina C e pectina³⁵. Dessa forma, a diminuição dos sólidos solúveis observada no presente estudo pode estar associada à redução do conteúdo de ácidos orgânicos e vitamina C, gerando outros compostos por meio da degradação/conversão, os quais podem apresentar menor solubilidade em água.

Constatou-se redução no teor de acidez titulável da geleia de cagaita, sendo os dados ajustados ao modelo matemático polinomial de segundo grau. Verificou-se que a redução ocorreu em todos os meses avaliados. Ao final de 120 dias, encontrou-se uma redução de 26,6% da acidez.

Após 120 dias de armazenamento, o teor de AA sofreu redução gradual de 17,9% em relação ao conteúdo inicial. No entanto, essa redução não comprometeu o valor nutricional do produto, uma vez que a porção corresponde a 6,8% da RDA para vitamina C, fazendo com que a geleia continue sendo classificada como um alimento fonte desse nutriente após os 120 dias de armazenamento.

A redução dos níveis de AA já era esperada devido à oxidação do mesmo por ação da presença de luz e temperatura ambiente, uma vez que a geleia não teve contato com o oxigênio, visto que estava em frasco lacrado em ambiente de nitrogênio. Possivelmente, o pH ácido da geleia de cagaita pode auxiliar na estabilidade do AA. Contudo, a perda foi menor do que a encontrada em outros estudos. Ferreira et al.³⁶ encontraram redução em torno de 50% do conteúdo de ácido ascórbico em todas as formulações de geleia mista de melancia e tamarindo no período de 60 dias. Assis et al.³⁷ observaram diminuição de 32,53% no teor de AA em geleia de caju durante 120 dias de armazenamento.

Quanto aos carotenóides, após 120 dias, observou-se redução significativa do conteúdo de β - caroteno e vitamina A, (-2,5% e -1,3%, respectivamente). O branqueamento da polpa de cagaita contribuiu para a retenção de carotenóides, uma vez que ele inativa enzimas com o propósito primário de aumentar a estabilidade na estocagem de alimentos em que a atividade enzimática continua mesmo depois do processamento³⁸. A escassez de dados sobre o conteúdo de carotenóides em alimentos processados dificulta a comparação dos dados encontrados, ratificando a necessidade de estudos relacionados à perda de nutrientes durante o preparo e armazenamento dos alimentos.

CONCLUSÃO

As formulações de geleia de cagaita analisadas apresentaram ausência dos micro-organismos pesquisados, sendo consideradas seguras sob ponto de vista microbiológico.

Todas as formulações de geleia apresentaram boa aceitação sensorial, com escores entre “gostei moderadamente” e “gostei extremamente”. Não houve diferença estatística entre a aceitação sensorial das formulações.

A formulação G4 apresentou bom valor nutricional, destacando-se como fonte de vitamina C. O produto apresentou boa estabilidade química, sendo observadas reduções significativas, porém pequenas, nos parâmetros físico-químicos ao longo de 120 dias.

A geleia de cagaita mostrou-se uma importante ferramenta para agregar valor ao fruto e contribuir para a geração de renda e melhoria do aporte nutricional, especialmente de famílias residentes em área de Cerrado. Dessa forma, após estudo ampliado da vida de prateleira, recomenda-se a produção, comercialização e consumo deste produto.

REFERÊNCIAS

1. Cardoso LM, Martino HSD, Moreira AVB, Ribeiro SMR, Pinheiro-Sant'Ana HM. Cagaita (*Eugenia Dysenterica* DC.) of the Cerrado of Minas Gerais, Brazil: physical and chemical characterization, carotenoids and vitamins. *Food Res Int*. 2011;44(7):2151-4.
2. Vieira RF, Agostini-Costa T, Silva, D. B, Ferreira FR, Sano, SM. Frutas nativas da Região Centro-Oeste do Brasil. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia; 2006.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução Normativa nº 15, de 4 de maio de 1978. Aprova o Regulamento técnico para fabricação de geleia de frutas. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 24 jul. 1978. Seção 410ª, n. 12, p. 11-4.
4. Damiani C. Caracterização e agregação de valor aos frutos do cerrado: Araçá (*Psidium guineensis* Sw.) e Marolo (*Annona Crassiflora* Mart.). [Tese de doutorado]. Lavras, MG: Universidade Federal de Lavras; 2009.
5. Correia LFM, Faraoni AS, Pinheiro-Sant'Ana HM. Efeitos do processamento industrial de alimentos sobre a estabilidade de vitaminas. *Rev Alim Nutr*. 2008;19(1):83-95.
6. Rodriguez-Amaya DB. Critical review of provitamin A determination in plant foods. *J Microb Anal*. 1989;5(1):191-225.
7. Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. São Paulo: Livraria Varela; 1997.
8. American Public Health Association. APHA Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington; 1992.

9. Stone H, Sidel JL. *Sensory Evaluation Practices*. 2. ed. Los Angeles: Redwood City; 1993.
10. Association of Official Analytic Communities – AOAC. *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 16. ed. Washington, D.C.; 1998.
11. Instituto Adolfo Lutz. *Normas analíticas*. São Paulo; 2005.
12. Merrill AL, Watt BK. *Energy value of foods: basis and derivation*. Washington: United States Department of Agriculture; 1973.
13. Campos FM, Della Licia CM, Pinheiro-Sant'Ana HM. Optimization of methodology to analyze ascorbic and dehydroascorbic acid in vegetables. *Rev Quim Nova*. 2009;32(1):87-91.
14. Rodriguez-Amaya DB, Raymundo LC, Lee T, Simpson KL, Chichester CO. Carotenoids pigment changes in ripening Momordica charantia. *Ann Botany*. 1976;40:615-24.
15. Pinheiro-Sant'Ana HM, Stringheta PC, Brandão SCC, Azeredo RMC. Carotenoid retention and vitamin A value in carrot (*Daucus carota* L.) prepared by food service. *Rev Food Chem*. 1998;61(1-2):145-51.
16. Institute of Medicine – IOM. *Dietary Reference Intakes (DRIs): Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc*. Washington: National Academy; 2001.
17. *Statistical Analysis System – SAS. Versión 9.1*. Cary, North Carolina: The SAS Institute; 2004-2008.
18. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões Microbiológicos para Alimentos. Dispõe sobre os princípios gerais para o estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 10 jan 2001. Seção 1, n.º 7-E, p. 45-53.
19. Harrigan WF, Park RWA. *Making safe food: a management guide for microbiological quality*. Londres: Academic Press; 1991.
20. Gava AJ. *Princípios da Tecnologia de Alimentos*. São Paulo: Nobel; 2004.
21. Torezan GAP, Pezoa Garcia NH. Produção de geleia de manga através de processo contínuo de fabricação, rica em sólidos da fruta e sem adição de açúcares. Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de alimentos, agosto de 2000; Fortaleza: Livro de resumos XVII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. p. 11.136.
22. Minin VPRM. *Análise sensorial: estudos com consumidores*. Viçosa, MG: UFV; 2006.
23. Jackik MH. *Doces, geleias e frutas em caldas: teórico e prático*. São Paulo, SP: Ícone; 1988.
24. Caetano PKC, Daiuto ER, Vietes RL. Caracterização físico-química e avaliação energética de geleia elaborada em diferentes tipos de tachos com polpa e suco de acerola. *Rev Energ Agric*. 2011;26(2):103-18.
25. Lago ES, Gomes E, Silva R. Produção de geleia de jambolão (*Syzygium cumini* Lamarck): processamento, parâmetros físico-químicos e avaliação sensorial. *Rev Ciênc Tecnol Alim*. 2006;26(4):847-52.
26. Mota RV. Caracterização física e química de geleia de amora-preta. *Rev Ciênc Tecnol Alim*. 2006;26(3):539-43.
27. Zambiasi RC, Chim JF, Bruscatto M. Avaliação das características e estabilidade de geleias light de morango. *Rev Alim Nutr*. 2006;17(2):165-70.
28. Barcia MT, Medina AL, Zambiasi RC. Características físico-químicas e sensoriais de geleias de jambolão. *Bol CEPPA*. 2010;28(1):25-36.
29. Silva L. Efeito de diferentes processamentos sobre o teor de ácido ascórbico em suco de laranja utilizado na elaboração de bolo, pudim e geleia. *Rev Ciênc Tecnol Alim*. 2006;26(3):678-82.
30. Maciel et al. Características sensoriais e físico-químicas de geleias mistas de manga e acerola. *Bol CEPPA*. 2009;27(2):247-56.
31. Philippi ST. *Pirâmide dos alimentos: fundamentos básicos da nutrição*. São Paulo, SP: Manole; 2008.
32. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 359, de 23 de Dezembro de 2003. Aprova o Regulamento Técnico de Porções de Alimentos Embalados para Fins de Rotulagem Nutricional. *Diário Oficial [da] União da República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 26 dez 2003.
33. U. S. Institute of Medicine, *Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids*. National Academy Press: Washington, D.C.; 2000.
34. U. S. Institute of Medicine, *Dietary Reference Intakes (DRIs): Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc*. National Academy Press: Washington, D.C.; 2001.
35. Faraoni AS. Efeito do tratamento térmico, do congelamento e da embalagem sobre o armazenamento da polpa de manga orgânica (*Mangifera indica* L.) CV. “Ubá”. [dissertação de mestrado]. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa; 2006.
36. Ferreira RMA, Aroucha EMM, Sousa AED, Melo DRM, Filho FSTP. Processamento e conservação de geleia mista de melancia e tamarindo. *Rev Verd Agroecol Desenvolv Sustent*. 2010;5(3):59-62.
37. Assis MMM, Maia GA, Teixeira EA, Figueredo RW, Monteiro JCS. Processamento e estabilidade de geleia de caju. *Rev Ciênc Agron*. 2007;38(1):46-51.
38. Nascimento P. Avaliação da retenção de carotenoides de abóbora, mandioca e batata-doce [dissertação de mestrado]. São Paulo, SP: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; 2006.

Caracterização físico-química e microbiológica da linhaça dourada e marrom (*Linum Usitatissimum* L.)

Golden and brown flaxseed (*Linum Usitatissimum* L.) physicochemical and microbiological characterization

RIALA6/1467

Daiana NOVELLO^{1*}, Marise Aparecida Rodrigues POLLONIO²

*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

²Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP.

Recebido: 25.01.2012- Aceito para publicação: 17.05.2012

RESUMO

Este trabalho avaliou a composição físico-química e a qualidade microbiológica do óleo e da semente de linhaça dourada e marrom, comercializados no Brasil, determinando-se a composição centesimal, perfil de ácidos graxos, avaliação microbiológica e estabilidade à oxidação lipídica no óleo de linhaça dourada e marrom. Não houve diferença nos nutrientes da composição centesimal entre o óleo de linhaça dourada e marrom. Teores mais elevados no total de ácidos graxos saturados (SFA) foram verificados no óleo de linhaça marrom. O teor total de ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs), em ambas as amostras, não mostrou diferença significativa. A quantidade total de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) e a relação PUFAs/SFA foram superiores no óleo de linhaça dourada. A semente de linhaça marrom apresentou maiores quantidades de umidade, lipídios, proteínas e calorias do que a variedade dourada. O total de SFA foi superior na semente de linhaça marrom, não havendo diferenças estatísticas entre o teor de MUFAs e PUFAs. A menor relação PUFAs/SFA foi observada na semente de linhaça marrom. As qualidades microbiológicas foram satisfatórias e em conformidade com os parâmetros de segurança. Os óleos avaliados mostraram baixas concentrações de malonaldeído. A linhaça dourada demonstrou melhor perfil nutricional, principalmente pela sua composição em ácidos graxos.

Palavras-chave. linhaça, ácidos graxos, ingrediente funcional.

ABSTRACT

This study evaluated the physicochemical and microbiological characteristics of oil and seed from golden and brown flaxseed, marketed in Brazil. The proximate composition, fatty acid profile, microbiological quality and stability to lipid oxidation in oils samples from golden and brown flaxseed were determined. No difference in the nutrient composition was found in oil samples from golden and brown flaxseed. The total saturated fatty acids (SFA) contents were higher in oil from brown flaxseed. As for the total monounsaturated fatty acids (MUFAs) contents in both samples, no significant difference was detected. The total polyunsaturated fatty acids (PUFAs) contents and the PUFA/SFA ratio were higher in golden flaxseed oil. The moisture, lipids, proteins and calories amounts in brown flaxseed seed were higher than those found in the golden variety. The total SFA was higher in seed from brown flaxseed, and no statistical differences were found between MUFAs and PUFAs contents. The lower PUFAs/SFA ratio was observed in seed from brown flaxseed. The microbiological quality was satisfactory, and being in accordance with the security parameters. The analyzed oils showed low concentrations of malonaldehyde. The golden flaxseed showed a better nutritional profile, mainly due to its fatty acid composition.

Keywords. flaxseed, fatty acids, functional ingredient.

INTRODUÇÃO

A linhaça é uma cultura antiga que tem sido utilizada em alimentos, fibras e tecidos. Cerca de 200 espécies de *Linum* (linho ou linhaça) são conhecidas¹. Na América do Norte, o termo preferido para linhaça é o linho (usado mais para tecidos), enquanto os europeus usam o termo linho oleaginoso comestível². Seu nome botânico é *Linum Usitatissimum* e pertence à família *Linaceae*^{2,3}, sendo muito utilizada no consumo humano e animal.

Os benefícios fisiológicos da linhaça são, geralmente, atribuídos à presença de altas quantidades de ácido graxo α -linolênico (C18:3, ω -3), lignanas, fibras ou goma⁴ e vitamina E, os quais estão intimamente relacionados à redução do risco de doenças crônicas não transmissíveis⁵.

As sementes de linhaça apresentam duas variedades – marrom e dourada. Ela é determinada pela quantidade de pigmento exterior contido nas sementes e, quanto maior o teor de pigmento na casca, mais escura será a semente. São ricas em lipídios, proteínas e fibras alimentares; entretanto, sua composição pode variar de acordo com a genética, ambiente, processamento e métodos de análise^{3,6}.

A variedade de linhaça marrom é cultivada em regiões de clima quente e úmido, como o Brasil, e a dourada, em regiões frias, como o norte dos Estados Unidos e o Canadá. No cultivo da linhaça marrom, são utilizados agrotóxicos, o que não ocorre com a variedade dourada⁷.

Em relação à diferença na composição físico-química e teor de ácidos graxos das variedades de linhaça dourada e marrom, Trucom³ afirma que as mesmas são idênticas; entretanto, outras pesquisas mostraram resultados diferentes^{8,9,10,11}. Diante disso, há a necessidade constante da avaliação da composição físico-química de um maior número de amostras de linhaça marrom, dourada e derivados, principalmente da linhaça comercializada no Brasil, onde há ainda raros estudos.

Quanto à questão microbiológica, na Instrução Normativa nº 60, de 10 de dezembro de 2009, que regulamenta os Padrões de Identidade e Qualidade para a Produção de Sementes de várias espécies, entre elas a *Linum usitatissimum* L., há ausência de informações sobre os aspectos microbiológicos deste alimento¹².

A oxidação lipídica dos alimentos é favorecida pela presença de oxigênio, calor, luz (foto-oxidação), traços de

metais ou catalisadores¹³; além disso, ácidos graxos poli-insaturados e diversos lipídios podem sofrer oxidação durante a preparação e armazenamento da linhaça e produtos derivados. Esta oxidação produz numerosos compostos (hidroperóxidos, aldeídos, cetonas etc.) e acredita-se que alguns destes possam ter propriedades mutagênicas, cancerígenas e citotóxicas ao organismo¹⁴.

A oxidação lipídica, geralmente, leva ao aparecimento do ranço, uma das principais razões da deterioração da qualidade dos produtos alimentícios, o que pode danificar as propriedades sensoriais, já que a gordura contribui para o sabor, textura e sensação geral de lubrificação do produto¹⁵.

A taxa de oxidação aumenta com o número de ligações duplas dos PUFA, elevando a probabilidade de afetar o sabor e o aroma dos alimentos. A oxidação química dos ácidos graxos insaturados (oleico, linoleico e linolênico) formam peróxidos com os radicais livres, que podem reagir e provocar danos nas proteínas, enzimas, outros lipídios e vitaminas. Quanto maior a quantidade de ácidos graxos insaturados e o grau de insaturação destes ácidos, maior a susceptibilidade ao ranço e, conseqüentemente, menor será o tempo de estocagem do produto¹⁶.

Contudo, são escassos os dados conhecidos sobre as mudanças da composição de ácidos graxos e os parâmetros de oxidação lipídica em produtos como a linhaça e derivados^{17,18}, necessitando-se de novas pesquisas.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a composição físico-química e microbiológica da semente e óleo de linhaça dourada e marrom distribuídas no Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Matéria-prima

Semente de linhaça dourada e marrom

Aproximadamente 7 kg de semente de linhaça dourada e marrom, provenientes de embalagens individuais de 200 g, foram homogeneizadas manualmente. Ambas as variedades, da mesma marca selecionada e comercializada no país, foram adquiridas por meio de fornecedores especializados da cidade de Campinas (SP) durante os meses de janeiro a junho de 2009, observando-se um prazo de validade superior a doze meses como critério de obtenção.

Para a preparação da farinha de linhaça dourada e marrom utilizada nas análises físico-químicas e microbiológicas, as sementes foram moídas em porções de aproximadamente 50 gramas por 15 segundos em liquidificador (*Waring Commercial*, USA) na velocidade máxima. Após a moagem, a farinha de linhaça foi acondicionada em sacos plásticos utilizados em embalagens a vácuo, firmemente selados com fita adesiva e guardados em filme plástico escuro para prevenção da oxidação lipídica até sua utilização, sendo no máximo 48 horas após a moagem.

Óleo de linhaça dourada e marrom

Os óleos de linhaça dourada e marrom, da mesma marca selecionada e comercializada no país, foram obtidos por meio de fornecedores especializados da cidade de Campinas (SP) durante os meses de janeiro a junho de 2009, sempre observando-se um prazo de validade mínimo de oito meses (estabelecido pelo fabricante). Foram utilizadas para a amostragem sete embalagens de vidro na cor âmbar, contendo 250 mL de óleo linhaça cada uma.

Avaliação da composição centesimal

Determinação da umidade

Foi realizada de acordo com a Association of Official Analytical Chemists¹⁹ em triplicata, que consiste em secagem a 105 °C até peso constante.

Determinação de proteínas

Avaliaram-se as amostras por meio da análise do nitrogênio total, em triplicata, pelo método Kjeldahl determinado ao nível semimicro¹⁹. **Utilizou-se o** fator de conversão de nitrogênio para proteína de 6,25.

Determinação de lipídios

O teor de lipídios foi verificado em triplicata, pelo método de Bligh e Dyer²⁰.

Determinação de cinzas

A porcentagem de cinzas foi determinada em mufla a 550 °C, em triplicata, conforme metodologia de AOAC¹⁹.

Determinação de carboidratos

A determinação de carboidratos foi realizada por meio de cálculo teórico (por diferença) nos resultados das triplicatas, conforme fórmula a seguir:

- % Carboidratos = 100 – (% umidade + % proteína + % lipídios + % cinzas)

Determinação de fibras

Foram realizadas análises de fibra bruta da linhaça dourada e marrom, conforme metodologia do Instituto Adolfo Lutz²¹.

Determinação do valor calórico

O total de calorias (kcal) foi calculado em relação a 100 g da amostra utilizando os valores Atwater (ou calor de combustão) para gordura (9 kcal/g), proteína (4,02 kcal/g) e carboidratos (3,87 kcal/g)²².

Determinação do perfil de ácidos graxos

Esta análise foi realizada no Laboratório de Óleos e Gorduras do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Unicamp.

Para o preparo dos ésteres metílicos, as amostras de farinha de linhaça dourada e marrom passaram inicialmente por processo de extração de lipídios segundo Bligh e Dyer²⁰. O óleo de linhaça dourada e marrom, bem como os lipídios extraídos da farinha de linhaça dourada e marrom, foram saponificados e esterificados, em triplicata, conforme metodologia proposta por Hartmann e Lago²³.

O perfil de ácidos graxos foi determinado por cromatografia gasosa de alta resolução²⁴, sendo avaliados: SFA, MUFA e PUFA, individualmente. Foi utilizado um cromatógrafo Gasoso Capilar (Agilent, 6850 Series GC System, U.S.A.), contendo coluna capilar: DB-23 Agilent (50% cyanopropyl – methylpolysiloxane), dimensões 60 m, Ø int: 0,25 mm, 0,25 µm filme.

As condições de operação do cromatógrafo foram: fluxo da coluna de 1,00 mL/min, velocidade linear de 24 cm/seg.; temperatura do detector de 280 °C; temperatura do injetor de 250 °C, temperatura do forno de 110 °C – 5 minutos, 110 – 215 °C (5 °C/min), 215 °C – 24 minutos; o gás de arraste utilizado foi o hélio, sendo injetada uma alíquota de 1 µL das amostras no aparelho.

A identificação dos ácidos graxos foi realizada pela comparação dos tempos de retenção dos picos da amostra com os tempos de retenção dos picos dos padrões. Os resultados obtidos foram em % de área e convertidos a g/100 g, utilizando o fator de conversão indicado para óleos e gorduras (0,956)²⁵. O cálculo utilizado para conversão da % de área em g/100 g de alimento avaliado encontra-se a seguir:

$$AGi = \% \text{ área} \times L \times F / 100$$

Onde:

AGi = ácido graxo individual, expresso em g/100 g de amostra;

% área = porcentagem de área dos picos obtidos nos cromatogramas;

L = teor de lipídio da amostra em g/100 g;

F = Fator de conversão do alimento.

Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A extensão da oxidação lipídica foi determinada no óleo de linhaça dourada e marrom, através da quantidade (mg/kg) de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, de acordo com Tarladgis et al.²⁶, em triplicata.

Avaliação microbiológica

Foram realizadas avaliações microbiológicas nas amostras de farinha e óleo de linhaça dourada e marrom estocadas à temperatura ambiente (20 °C). Os coliformes foram enumerados pela técnica do Número Mais Provável (NMP). A contagem total de microrganismos mesófilos aeróbios (UFC/g), microrganismos aeróbios psicrotróficos (UFC/g), coliformes totais (35 °C) e coliformes termotolerantes (45 °C) foram realizadas de acordo com Downes e Ito²⁷. A farinha de linhaça dourada e marrom foi analisada pela técnica *pour plate*, com inoculação por plaqueamento em profundidade. As amostras de óleo foram emulsionadas com Tween 80 (90 mL do diluente com 1% de Tween 80 e 10 g de amostra) para, posteriormente, serem avaliadas pela técnica de inoculação por superfície²⁷.

Análise estatística

Os resultados estatísticos foram avaliados por meio da análise de variância (Anova), com o teste t de *student* para comparação de médias em nível de 5% de significância. Todos os cálculos foram realizados pelo *software Statgraphics® Plus, versão 5.1*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação da composição centesimal

Na Tabela 1, pode-se verificar a composição centesimal da semente e do óleo de linhaça dourada e marrom.

Houve diferença na composição centesimal das amostras de semente de linhaça dourada e marrom, com maiores teores ($p < 0,05$) de umidade, lipídios, proteínas e calorias na linhaça marrom. A linhaça dourada apresentou maiores valores de cinzas e carboidratos. Não houve diferença em relação à fibra bruta das duas amostras.

Na Tabela 2, é possível observar que os valores dos nutrientes da composição centesimal da semente de linhaça variam muito na literatura.

Em estudos de Morris⁹, a linhaça dourada apresentou valores superiores aos encontrados neste trabalho. Oomah et al.⁸ também relataram valores diferentes, principalmente quanto ao baixo teor de carboidratos.

A quantidade de lipídios na linhaça pode variar de 34-47 g/100 g e esta diferença é variável de acordo com a origem, localização, cultivo e condições ambientais^{2,5,28}.

Madhusudhan¹⁰ verificou maiores teores de umidade, lipídios e cinzas e menores de proteínas em

Tabela 1. Composição centesimal das sementes e dos óleos de linhaças dourada e marrom

Avaliação	Semente de linhaça dourada		Semente de linhaça marrom		Óleo de linhaça dourada		Óleo de linhaça marrom	
	Média ± SD	EPM	Média ± SD	EPM	Média ± SD	EPM	Média ± SD	EPM
Umidade (g/100 g)	4,30 ± 0,03 ^b	0,02	5,05 ± 0,01 ^a	0,01	0,06 ± 0,00 ^a	0,00	0,06 ± 0,00 ^a	0,00
Cinzas (g/100 g)	3,77 ± 0,05 ^a	0,03	2,67 ± 0,02 ^b	0,04	0,02 ± 0,01 ^a	0,01	0,02 ± 0,00 ^a	0,00
Lipídios (g/100 g)	35,62 ± 0,09 ^b	0,07	36,91 ± 0,04 ^a	0,03	99,92 ± 0,28 ^a	0,20	99,92 ± 0,14 ^a	0,10
Proteínas (g/100 g)	23,14 ± 0,13 ^b	0,09	27,14 ± 0,82 ^a	0,58	-	-	-	-
Carboidratos (g/100 g)	33,17 ± 0,04 ^a	0,03	28,23 ± 0,85 ^b	0,60	-	-	-	-
Fibra bruta (g/100 g)	16,88 ± 0,95 ^a	0,67	17,10 ± 0,41 ^a	0,21	-	-	-	-
Calorias - (kcal/100 g)	542,05 ± 0,13 ^b	0,09	550,53 ± 0,42 ^a	0,30	899,28 ± 2,54 ^a	1,80	899,28 ± 1,27 ^a	0,90

*Letras diferentes na linha indicam diferença significativa pelo teste t de *student* ($p < 0,05$); SD: desvio-padrão da média; EPM: erro-padrão da média; carboidratos: calculados por diferença

Tabela 2. Composição centesimal das sementes de linhaças dourada e marrom

Referência	Umidade (g/100 g)	Proteína (g/100 g)	Lipídios (g/100 g)	Carboidratos (g/100 g)	Cinzas (g/100 g)	kcal (kcal/100 g)
Linhaça dourada						
Oomah et al. ⁸	-	19,02	43,61	7,99	-	-
Morris ⁹	7,00	29,20	43,60	-	-	-
Mueller et al. ¹¹	7,30	23,30	44,00	29,40	3,38	-
Linhaça marrom						
Oomah et al. ⁸	-	19,53	40,33	8,19	-	-
Morris ⁹	-	20,00	41,00	29,00	-	450,00
Madhusudhan ¹⁰	8,00	20,00	41,00	-	4,00	-
Mueller et al. ¹¹	7,40	23,40	45,20	27,80	3,50	-

amostras de linhaça marrom, quando comparado à presente pesquisa. Já Morris⁹, avaliando variedades de linhaça marrom canadense, observou, também, menores resultados de proteínas e calorias e maiores de lipídios, porém semelhantes em carboidratos.

No trabalho de Oomah et al.⁸, que avaliaram variedades de linhaça marrom provenientes do Canadá, foram observados além de menores teores de proteínas e maiores de lipídios, como os demais autores, valores bem inferiores de carboidratos, quando correlacionados a atual pesquisa.

Mueller et al.¹¹ compararam em seus estudos linhaças dourada e marrom e não observaram nenhuma diferença estatística entre os dois produtos, o que discorda da presente pesquisa.

Conforme Oomah e Mazza²⁹, os teores de proteína na linhaça também podem ser distintos entre países e cultivares, cujas diferenças podem ser atribuídas à genética e ao ambiente. Outro ponto que pode ter influência sobre a composição físico-química dos alimentos é o método de extração dos compostos para realização das análises. Estes fatores, portanto, podem explicar a grande variação nos resultados verificados entre a literatura e o presente trabalho, tanto na variedade de linhaça dourada como na marrom, necessitando, assim, de constantes avaliações.

Na Tabela 1, é possível verificar, também, que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as amostras de óleo de linhaças dourada e marrom, em relação aos nutrientes da composição centesimal. Conforme explica Choo et al.¹³, a água contribui para a hidrólise do óleo durante a manipulação e o processamento de várias etapas que geram ácidos graxos livres e glicerol; assim, é desejável haver baixa umidade nos óleos, o que foi constatado na avaliação.

Perfil de ácidos graxos

O perfil de ácidos graxos da semente e do óleo de linhaças dourada e marrom pode ser verificado na Tabela 3.

Na avaliação da sementes de linhaças dourada e marrom, os ácidos palmítico e esteárico foram aqueles encontrados em maior quantidade. A porcentagem total de ácidos graxos saturados foi menor na linhaça dourada (10,66%) e maior na marrom (12,65%).

Ressalta-se que, segundo Grundy³⁰, o ácido palmítico aumenta a lipoproteína de baixa densidade (LDL-colesterol), sendo considerado hipercolesterolêmico na dieta, aumentando o risco de doenças como obesidade e resistência à insulina. Porém, apesar de a linhaça conter um teor relativamente alto deste ácido graxo, o consumo diário pelos indivíduos é de pequena quantidade e não chega a ser preocupante, pois ela possui também outros nutrientes considerados essenciais ao organismo.

Já o ácido esteárico, presente também na linhaça, pode ser considerado neutro nos seus efeitos sobre as lipoproteínas³¹.

Os ácidos mirístico, palmítico, esteárico, araquídico e o total de saturados foram superiores ($p < 0,05$) na linhaça marrom. Os demais ácidos graxos saturados não apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$). A semente de linhaça dourada, por apresentar menor teor de ácidos graxos saturados, pode ser considerada de melhor qualidade nutricional para o consumo humano. Apesar dessa diferença entre as duas variedades, a linhaça, em geral, pode ser considerada um alimento naturalmente pobre em gorduras saturadas¹⁰.

O ácido oleico foi verificado em maior teor, dentre os MUFAs, obtendo-se uma porcentagem total destes ácidos graxos de 26,08% e 24,62%, respectivamente, para as linhaças dourada e marrom. O ácido graxo erúcido foi superior na linhaça marrom, não havendo diferença

Tabela 3. Perfil de ácidos graxos das sementes e dos óleos de linhaça dourada e marrom (g/100 g de produto)

Ácidos graxos	Semente de linhaça dourada		Semente de linhaça marrom		Óleo de linhaça dourada		Óleo de linhaça marrom	
	Média ± SD	EPM	Média ± SD	EPM	Média ± SD	EPM	Média ± SD	EPM
SFA								
Ac. láurico (C12:0)	0,01 ± 0,00 ^a	0,00	0,01 ± 0,00 ^a	0,00	0,02 ± 0,00 ^b	0,00	0,03 ± 0,00 ^a	0,00
Ac. mirístico (C14:0)	0,03 ± 0,00 ^b	0,00	0,04 ± 0,04 ^a	0,04	0,05 ± 0,00 ^a	0,00	0,06 ± 0,05 ^a	0,06
Ac. pentadecanoico (C15:0)	0,01 ± 0,00 ^a	0,00	0,01 ± 0,02 ^a	0,00	0,02 ± 0,00 ^a	0,00	0,02 ± 0,00 ^a	0,00
Ac. palmítico (C16:0)	1,93 ± 0,01 ^b	0,07	2,31 ± 0,05 ^a	0,10	5,49 ± 0,00 ^b	0,00	6,05 ± 0,10 ^a	0,10
Ac. margárico (C17:0)	0,02 ± 0,00 ^a	0,00	0,02 ± 0,00 ^a	0,00	0,06 ± 0,00 ^a	0,00	0,07 ± 0,00 ^a	0,00
Ac. esteárico (C18:0)	1,44 ± 0,07 ^b	0,05	1,84 ± 0,04 ^a	0,03	3,86 ± 0,00 ^b	0,00	5,03 ± 0,10 ^a	0,07
Ac. araquídico (C20:0)	0,06 ± 0,00 ^b	0,00	0,07 ± 0,00 ^a	0,00	0,19 ± 0,00 ^a	0,00	0,19 ± 0,00 ^a	0,00
Ac. behênico (C22:0)	0,06 ± 0,00 ^a	0,00	0,06 ± 0,00 ^a	0,00	0,17 ± 0,00 ^a	0,00	0,18 ± 0,00 ^a	0,00
Ac. lignocérico (C24:0)	0,05 ± 0,00 ^a	0,00	0,05 ± 0,00 ^a	0,00	0,11 ± 0,00 ^a	0,00	0,11 ± 0,00 ^a	0,00
Total	3,61 ± 0,04 ^b	0,03	4,40 ± 0,10 ^a	0,07	9,97 ± 0,06 ^b	0,04	11,74 ± 0,06 ^a	0,04
Porcentagem total (%)	10,66		12,65		10,48		12,36	
MUFAs								
Ac. palmitoleico (C16:1 ω-7)	0,05 ± 0,00 ^a	0,00	0,05 ± 0,01 ^a	0,00	0,09 ± 0,00 ^a	0,00	0,09 ± 0,01 ^a	0,01
Ac. margaroleico (C17:1 ω-7)	0,02 ± 0,00 ^a	0,00	0,02 ± 0,00 ^a	0,00	0,04 ± 0,00 ^a	0,00	0,04 ± 0,00 ^a	0,00
Ac. oleico (C18:1 ω-9)	8,70 ± 0,31 ^a	0,22	8,43 ± 0,07 ^a	0,05	21,31 ± 0,00 ^a	0,00	20,73 ± 0,14 ^a	0,10
Ac. gadoleico (C20:1 ω-9)	0,06 ± 0,00 ^a	0,00	0,06 ± 0,00 ^a	0,00	0,17 ± 0,00 ^a	0,00	0,12 ± 0,01 ^b	0,00
Ac. erúcico (C22:1 ω-9)	0,00 ^b	0,00	0,02 ± 0,00 ^a	0,00	0,00 ^b	0,00	0,01 ± 0,00 ^a	0,00
Total	8,83 ± 0,31 ^a	0,22	8,57 ± 0,06 ^a	0,04	21,61 ± 0,05 ^a	0,03	20,99 ± 0,16 ^a	0,11
Porcentagem total (%)	26,08		24,62		22,71		22,10	
PUFAs								
Ac. linoleico (C18:2 ω-6)	5,14 ± 0,05 ^a	0,03	5,23 ± 0,03 ^a	0,02	17,41 ± 0,01 ^a	0,00	16,01 ± 0,15 ^b	0,61
Ac. α-linolênico (C18:3 ω-3)	16,28 ± 0,00 ^a	0,00	16,61 ± 0,12 ^a	0,08	46,15 ± 0,00 ^a	0,00	46,24 ± 1,29 ^a	0,91
Total	21,42 ± 0,05 ^a	0,00	21,84 ± 0,08 ^a	0,06	63,56 ± 0,01 ^a	0,01	62,25 ± 0,06 ^b	0,02
Porcentagem total (%)	63,26		62,75		66,80		65,54	
Porcentagem total ω-6 (%)	15,18		15,02		18,30		16,86	
Porcentagem total ω-3 (%)	48,08		47,73		48,51		48,68	
Ácidos graxos trans								
Ac. linolelaídico (C18:2 trans t9, t12)	0,02 ± 0,00 ^a	0,00	0,02 ± 0,00 ^a	0,00	0,05 ± 0,00 ^a	0,00	0,05 ± 0,00 ^a	0,00
Ac. trans linolênico (C18:3 trans)	0,08 ± 0,00 ^a	0,00	0,08 ± 0,00 ^a	0,00	0,19 ± 0,00 ^a	0,00	0,19 ± 0,00 ^a	0,00
Total	0,10 ± 0,00 ^a	0,00	0,10 ± 0,00 ^a	0,00	0,24 ± 0,00 ^a	0,00	0,24 ± 0,00 ^a	0,00
Relações								
Relação ω-6/ω-3	0,32 ± 0,00 ^a	0,00	0,31 ± 0,00 ^a	0,00	0,38 ± 0,00 ^a	0,00	0,35 ± 0,03 ^a	0,02
Relação PUFAs/SFA	5,93 ± 0,08 ^a	0,06	4,97 ± 0,23 ^b	0,16	6,38 ± 0,04 ^a	0,03	5,30 ± 0,17 ^b	0,12

*Letras diferentes na linha indicam diferença significativa pelo teste t de *student* ($p < 0,05$); SD: Desvio padrão da média; EPM: Erro padrão da média; MUFAs: monoinsaturados; PUFAs: poli-insaturados; SFA: saturados; Ac.: ácido. Obs.: aproximadamente 2 g de ácidos graxos (do total de lipídios) da semente não foram identificados na análise; aproximadamente 5 g de ácidos graxos (do total de lipídios) do óleo não foram identificados na análise.

significativa entre os demais ($p > 0,05$). Os dois produtos apresentaram semelhantes teores totais de MUFAs e são avaliados por Madhusudhan¹⁰ como um alimento que fornece quantidades moderadas destes ácidos graxos. Sendo assim, ambas as variedades possuem boas características nutricionais.

De acordo com estes resultados, verificou-se um benefício no consumo da linhaça e derivados, uma vez

que o ácido oleico, em geral, tem sido considerado neutro para o risco de hipercolesterolemia. Porém, alguns autores relatam que este ácido graxo pode ter efeito hipocolesterolêmico, baixando a concentração sérica de colesterol total³¹.

O ácido α-linolênico apresentou-se em maior quantidade, seguido pelo ácido linoleico, na avaliação dos PUFAs. A porcentagem total de PUFAs foi de

63,26% na linhaça dourada e 62,75% na marrom. A porcentagem total de ácidos graxos ω -3 e ω -6 da linhaça dourada resultou em 48,08% e 15,18%, respectivamente, sendo 47,73% e 15,02%, respectivamente, na variedade marrom. Não houve diferença significativa entre os ácidos linoleico, α -linolênico e total de PUFA's.

Como verificado, a linhaça é um alimento rico em ácidos graxos ω -3. Estudos têm demonstrado que a ingestão de ácidos graxos de cadeia longa ω -3, bem como o consumo de α -linolênico podem reduzir o risco de doenças cardíacas^{2,3,9,10}. Portanto, uma alimentação com linhaça pode trazer resultados positivos para a saúde pública, ajudando a aumentar o nível deste ácido graxo na dieta.

Não foi verificada diferença estatística entre os ácidos graxos *trans* nas duas variedades de semente. Apesar de os produtos apresentarem teores de ácidos graxos *trans*, estes valores podem ser considerados muito pequenos, devido à baixa recomendação na ingestão diária da linhaça (24 g/dia)³. Também a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa)³² informa que produtos contendo menos que 0,2 g por porção podem ser declarados na rotulagem como “zero” ou “não contém” ácidos graxos *trans*.

Estes dados trazem informações importantes aos consumidores, uma vez que a maioria dos estudos epidemiológicos relacionam a ingestão dietética de ácidos graxos *trans* com aumento da morbidade e mortalidade por insuficiência coronária e desenvolvimento da aterosclerose^{30,31}.

Devido à maior quantidade de ácidos graxos saturados da semente de linhaça marrom, verificou-se, na Tabela 3, uma menor relação PUFA's/SFA, sendo que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na relação ω -6/ ω -3 entre os produtos.

Pela elevada quantidade de ácido graxo α -linolênico, presente em ambas as variedades de semente de linhaça, observou-se uma relação ω -6/ ω -3 muito baixa. Segundo Madhusudhan¹⁰, a relação ω -6/ ω -3 da linhaça é de 0,3:1, resultados que confirmam os encontrados na atual pesquisa. Quando se compara esta relação da linhaça com outras fontes importantes, tais como milho (58:1), soja (7:1) e canola (2:1)³³, a mesma fornece menores teores de ácidos graxos ω -6.

Acredita-se que, na sociedade ocidental atual, a proporção de ω -6/ ω -3 pode ser tão elevada quanto 20-30:1^{5,10,34}, sendo geralmente atribuída à multiplicidade de óleos vegetais atualmente disponíveis e consumidos, os

quais são ricos em ácidos graxos ω -6³³. Esta proporção se encontra muito distante da recomendação atual para a relação ω -6/ ω -3 (4:1 a 10:1)³⁴. Assim, a suplementação da dieta com semente de linhaça proporciona uma boa fonte de ácido graxo ω -3 (α -linolênico), baixos níveis de ácido linoleico, bem como uma baixa relação ω -6/ ω -3.

Ressalta-se que o nível aceitável de ingestão de ácido graxo α -linolênico é de 1,6 g/dia para homens e 1,1 g/dia para mulheres³⁴. Assim, para se obter estas recomendações adequadas, seria necessário um consumo diário de aproximadamente 10 g de semente de linhaça dourada ou marrom para homens e 7 g para mulheres.

Avaliando-se os óleos de linhaças dourada e marrom, em relação aos ácidos graxos saturados, o ácido palmítico foi encontrado em maior quantidade, seguido do esteárico, concordando com estudos de Oomah e Mazza⁶ com óleo de linhaça marrom. A porcentagem total de ácidos graxos saturados foi de 10,48% para o óleo de linhaça dourada, concordando com estudos de Morris⁹, sendo 12,36% para o óleo de linhaça marrom.

Não houve diferença estatística entre as amostras de óleo de linhaça dourada e marrom entre os ácidos mirístico, pentadecanóico, margárico, araquídico, behênico e lignocérico. Valores maiores ($p < 0,05$) de ácidos graxos láurico, palmítico, esteárico e, conseqüentemente, no total de saturados foram observados no óleo de linhaça marrom. Assim, este óleo apresentou-se menos propício ao consumo humano que o óleo de linhaça dourada, uma vez que ofereceu uma maior quantidade de gorduras saturadas, consideradas prejudiciais ao organismo, principalmente o ácido palmítico, correlacionado à hipercolesterolemia^{5,15,16,30,31}.

O ácido graxo oleico obteve maior teor, dentre os MUFA's, em ambos os óleos, com porcentagem total de MUFA's de 22,71% no óleo de linhaça dourada e 22,10%, no óleo de linhaça marrom, dados que corroboram com pesquisas de Morris⁹. A maioria dos MUFA's mostrou valores que não diferiram significativamente entre as amostras. Porém, o ácido graxo gadoleico foi superior no óleo de linhaça dourada e o ácido graxo erúcido foi maior no óleo de linhaça marrom. Entretanto, não houve diferença ($p > 0,05$) entre o teor total de MUFA's de ambas as amostras. Neste quesito, ambos os óleos são igualmente benéficos para o consumo.

Dentre os PUFA's, o ácido α -linolênico foi verificado em maior quantidade, seguido pelo ácido linoleico, tanto nos óleos de linhaça dourada como marrom. Oomah e Mazza⁶, pesquisando o óleo de linhaça

marrom da variedade *Norman*, também encontraram valores semelhantes de ácido graxo C18:2, ω -6. Ressalta-se que a porcentagem total de PUFA, ω -3 e ω -6 no óleo de linhaça dourada foi de 66,80%, 48,51% e 18,30%, enquanto, no óleo de linhaça marrom, obteve-se 65,54%, 48,68% e 16,86%, respectivamente, corroborando com resultados de Morris⁹.

Constatou-se, também, que o teor de ácido linoleico, o total de PUFA e a relação PUFA/SFA foram superiores no óleo de linhaça dourada, sendo que a quantidade de ácido graxo α -linolênico não diferiu entre os produtos ($p > 0,05$). O óleo de linhaça dourada mostrou melhor qualidade para a ingestão humana, uma vez que este perfil, principalmente os ácidos graxos ω -3, é considerado como preventivo de várias patologias^{1,2,9,10}.

Conforme a DRI³⁴, um consumo diário de aproximadamente 4 g de óleos de linhaças dourada e marrom para homens e 3 g para mulheres seria adequado para atingir as recomendações nutricionais do ácido graxo C18:3, ω -3.

O teor de ácidos graxos *trans* e a relação ω -6/ ω -3 das amostras de óleo de linhaça dourada e marrom não mostraram diferença significativa, sendo o ácido *trans* linolênico encontrado em maior quantidade nos óleos, representando fontes igualmente benéficas para aquisição dos consumidores nesta avaliação.

Green e Marshall³⁵, analisando o óleo das variedades de linhaças dourada e marrom, observaram diferenças consideráveis entre os ácidos graxos, sendo 3,80% a 9,20% de ácido palmítico, 1,30% a 6,20% de ácido esteárico, 13,30% a 25,20% de ácido oleico, 10,40% a 20,90% de ácido linoleico e 45,50% a 63,10% de α -linolênico. Assim, verificou-se que as análises do atual trabalho estão conforme as variações relatadas pelos autores, sendo que o principal motivo destas diferenças pode ser explicado pela heterogeneidade genética dos produtos.

Avaliações microbiológicas

Na Tabela 4, podem ser observadas as avaliações microbiológicas da semente e óleo de linhaça dourada e marrom.

Na Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001³⁶, que define critérios para os padrões microbiológicos sanitários em alimentos, existem apenas limites para coliformes a 45 °C/g, o qual melhor se enquadra para a semente de linhaça por definir parâmetros microbiológicos para sementes comestíveis cruas. Sendo assim, todas as avaliações microbiológicas encontram-se dentro dos limites aceitáveis para as amostras de semente de linhaça dourada e marrom, sugerindo condições higiênicas satisfatórias dos produtos. Estes resultados concordam com aqueles obtidos por Moraes et al.³⁷, que avaliaram amostras de semente de linhaça dourada e marrom quanto à presença de coliformes a 45 °C.

Ressalta-se que, também, não existe uma legislação específica para a contagem total de microrganismos, tanto para o óleo como para a semente de linhaça. Entretanto, Riedel³⁸ afirma que alimentos que mostram contagens entre 10⁵ e 10⁶ UFC/g são considerados como altamente contaminados e, conseqüentemente, impróprios para o consumo. Baseando-se nisso, nenhuma das amostras avaliadas representa um risco potencial para os consumidores.

Apesar das contagens microbianas observadas estarem dentro dos limites para ingestão, deve-se observar a importância de boas práticas na manipulação e conservação desses produtos como ingredientes alimentícios, pois serão aplicados em formulações ou consumidos diretamente. Os fatores ambientais, tais como: umidade relativa, qualidade microbiológica da água e temperatura, assim como aqueles relacionados com o produto elaborado (pH, atividade de água e acidez), também desempenham um papel fundamental na qualidade microbiológica do produto final³⁹, podendo comprometer a vida de prateleira dos alimentos industrializados.

Tabela 4. Avaliação microbiológica das sementes e dos óleos de linhaça dourada e marrom

Determinação	Semente de linhaça dourada	Semente de linhaça marrom	Óleo de linhaça dourada	Óleo de linhaça marrom
Psicrotróficos (UFC/g)/Log (UFC/g)	1,21 × 10 ⁴ /4,08	2,75 × 10 ⁴ /4,44	<1	<1
Mesófilos (UFC/g)/Log (UFC/g)	7,71 × 10 ³ /3,89	9,85 × 10 ³ /3,99	<1	<1
NMP coliformes totais/g (35 °C)	4	15	<3	<3
NMP coliformes termotolerantes/g (45 °C)	<3	<3	<3	<3

*UFC: Unidade formadora de colônia; NMP: número mais provável; Log: logaritmo.

Teores de TBARS no óleos de linhaças dourada e marrom

Na Figura 1, verifica-se os teores de TBARS do óleos de linhaças dourada e marrom.

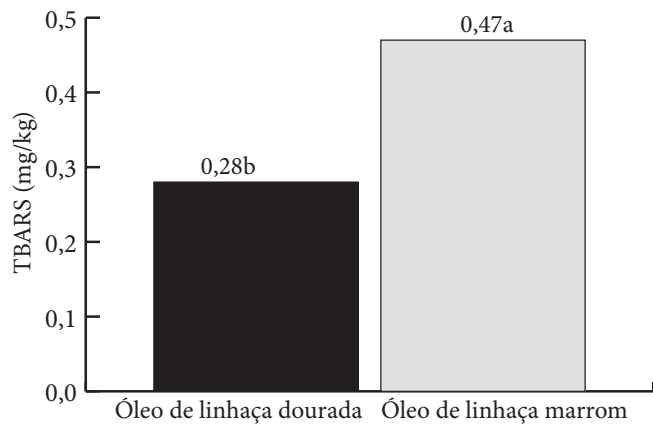


Figura 1. Teor de TBARS do óleo de linhaça dourada e marrom

*Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste t de *student* ($p < 0,05$).

O óleo de linhaça dourada apresentou menor resultado ($p < 0,05$) de TBARS, comparado ao óleo de linhaça marrom. Entretanto, as duas amostras podem ser consideradas com valores baixos de oxidação lipídica, conforme a legislação atual (máximo de 0,8 g/100 g)⁴⁰. Estes resultados podem ser explicados, uma vez que a linhaça tem sido apontada como uma alternativa natural contra os efeitos oxidativos dos radicais livres, por possuir compostos com potencial antioxidante^{2,3,10,18}.

Ressalta-se que o alto teor de α -linolênico no óleo de linhaça é altamente suscetível à oxidação, levando à rápida deterioração da qualidade do produto. A oxidação destes óleos pode ser acelerada pela exposição à luz (foto-oxidação), presença de oxigênio e fotossensibilizadores que podem produzir hidroperóxidos de ácidos graxos insaturados e ésteres¹³.

Entretanto, para aumentar a vida útil de um produto, a tecnologia de alimentos visa ao emprego de algumas técnicas específicas, como mudanças de temperatura, atividade de água, valor do pH, potencial de oxidorredução, destruição dos microorganismos e emprego de embalagens apropriadas⁴¹. Destaca-se que, mesmo após a extração a frio, para evitar a rápida ocorrência do ranço, o óleo de linhaça é, muitas vezes, complementado com vitamina E e armazenado em frascos de vidro escuro, sendo que não é indicado para fritura^{3,5,13}. Assim, devido aos baixos teores de TBARS, os produtos analisados revelam boa procedência tecnológica.

CONCLUSÃO

A semente de linhaça dourada mostrou melhor qualidade nutricional, uma vez que proporcionou menor conteúdo total de ácidos graxos saturados. Tanto a linhaça dourada como a marrom apresentaram semelhantes benefícios para o consumo, uma vez considerados os teores totais de MUFAs, PUFAs, ácidos graxos *trans* e relação ω -6/ ω -3.

Os óleos de linhaça dourada e marrom apresentaram composição centesimal similares. Entretanto, na avaliação do perfil de ácidos graxos, o óleo de linhaça dourada mostrou-se mais favorável ao consumo humano, oferecendo menor quantidade de ácidos graxos saturados e maior teor total de PUFAs. Ambos os óleos foram considerados igualmente benéficos para o consumo humano, em relação à quantidade total de MUFAs, ácidos graxos *trans* e relação ω -6/ ω -3.

Na avaliação geral das relações dos ácidos graxos do óleos e das sementes de linhaças dourada e marrom, verificou-se a predominância do ácido graxo α -linolênico, obtendo-se uma baixa relação ω -6/ ω -3 e alta relação PUFAs/SFA.

Os teores de ácidos graxos *trans* foram baixos, tanto no óleo quanto na semente de linhaça dourada e marrom.

Diante do exposto, a linhaça e seus derivados mostraram potencial para o uso como alimentos e/ou ingredientes funcionais em produtos alimentícios, com destaque à linhaça dourada devido ao seu melhor perfil de ácidos graxos.

REFERÊNCIAS

1. Carter JF. Potential of flaxseed and flaxseed oil in baked goods and other products in human nutrition. *Cer Foods World*. 1993;38(10):753-9.
2. Morris DH, Vaisey-Genser M. Flaxseed. *Enc Food Sci Nutr*. 2003;10(2):2525-31.
3. Trucom C. A importância da linhaça na saúde. São Paulo, SP: Alaúde; 2006.
4. Oomah BD, Der TJ, Godfrey DV. Thermal characteristics of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) proteins. *Food Chem*. 2006;98(4):733-41.
5. Daun JK, Barthelet VJ, Chornick TL, Duguid S. Structure, composition, and variety development of flaxseed. In: Thompson LU, Cunnane SC. (Eds.). *Flaxseed in Human Nutrition*. 2. ed. Champaign: AOCS Press; 2003. p. 1-40.
6. Oomah BD, Mazza G. Effect of dehulling on chemical composition and the physical properties of flaxseed. *LWT*. 1997;30(2):135-40.

7. Lima JR. Caracterização físico-química e sensorial de hambúrguer vegetal elaborado à base de caju. *Ciênc Agrot*. 2008;32(1):191-5.
8. Oomah BD, Mazza G, Kenaschuk EO. Flavonoid content of flaxseed. Influence of cultivar and environment. *Euphytica*. 1996;90(1):163-7.
9. Morris DH. Flax – A Health and Nutrition Primer. 4. ed. Winnipeg: Flax Council of Canada; 2007.
10. Madhusudhan B. Potential benefits of flaxseed in health and disease: a perspective. *Agric Consp Sci*. 2009;74(2):67-72.
11. Mueller K, Eisner P, Yoshie-Stark Y, Nakada R, Kirchhoff E. Functional properties and chemical composition of fractionated brown and yellow linseed meal (*Linum usitatissimum* L.). *J Food Eng*. 2010;98(4):453-60.
12. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 60, de 10 de dezembro de 2009. Estabelece os Padrões de Identidade e Qualidade para a Produção de Sementes das Espécies: *Brassica napus* L. var. *oleifera* (canola); *secale cereale* L. (centeio) e *hordeum vulgare* L. (cevada); *pisum sativum* L. s.l. (ervilha); *sesamum indicum* L. (gergelim); *corchorus capsularis* L. e *c. olitorius* L. (juta); *linum usitatissimum* L. (linho); e *nicotiana tabacum* L. (tabaco). [acesso 2011 out 12] Disponível em: [http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?jsessionid=3807195571783092859c484aa85e1a3d85b5ae066f0a4cfff65f7943fbbb363a.e3uQbh0LahaSe34Pbh0 Kbx0Mahn0?operacao=visualizar&id=21236].
13. Choo WS, Birch J, Dufour JP. Physicochemical and quality characteristics of cold-pressed flaxseed oils. *J Food Comp Anal*. 2007;20(3-4):202-11.
14. Hotchkiss JH, Parker RS. Toxic compounds produced during cooking and meat processing. *Adv Meat Res*. 1990;6(1):105-34.
15. Webb EC, O'neil HA. The animal fat paradox and meat quality. *Meat Sci*. 2008;80(1):28-36.
16. Bobbio FO, Bobbio PA. Introdução à química de alimentos. 3ª ed. São Paulo, SP: Varela, 2003.
17. Cunnane SC, Hamadeh MJ, Liede AC, Thompson LU, Wolever TM, Jenkins DJ. Nutritional attributes of traditional flaxseed in healthy young adults. *Am J Clin Nutr*. 1995;61(1):62-8.
18. Galvão EL, Silva DCF, Silva JO, Moreira AVB, Sousa EMBD. Avaliação do potencial antioxidante e extração subcrítica do óleo de linhaça. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2008;28(3):551-7.
19. AOAC. Analysis of Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists. 13. ed. Washington, DC: AOAC; 1980.
20. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*. 1959;37(8):911-7.
21. Instituto Adolfo Lutz. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 4ª ed. Brasília, DF: Anvisa; 2005.
22. Atwater WO, Woods CD. The chemical composition of American food materials. *Farmers' Bulletin*, n. 28. Washington, DC: Department of Agriculture; 1896.
23. Hartman L, Lago RCA. Rapid preparation of fatty acid methyl ester from lipids. *Lab Pract*. 1973;22(6):475-6.
24. AOCS. American Oil Chemist's Society. Official methods and recommended practices of the American oil chemist's society. 5ª ed. Champaign: AOAC Press; 2004.
25. McCance RA, Widdowson's EM. McCance and Widdowson's: The composition of foods. 6ª ed. Cambridge: The Royal Society of Chemistry; 2004.
26. Tarladgis BG. A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods. *J Am Oil Chem Soc*. 1960;37(1):44-8.
27. Downes FP, Ito K. APHA. American Public Health Association. Compendium of Methods Microbiological Examination of Foods. 4. ed. Washington, DC: American Public Health Association; 2001.
28. Fitzpatrick K. North America Flax Facts Important Questions & Answers For Improved Health and Nutrition. 2. ed. Revised May 2006. [acesso 2011 nov 29]. Disponível em: [http://www.ameriflax.com/UserFiles/Image/Flax_Facts_II.pdf].
29. Oomah BD, Mazza G. Flaxseed proteins - A review. *Food Chem*. 1993;48(1):109-14.
30. Grundy SM. Influence of stearic acid on cholesterol metabolism relative to other long-chain fatty acids. *Am J Clin Nutr*. 1994;60(6 suppl):986S-90S.
31. Hegsted DM, McGandy RB, Myers ML, Stare FJ. Quantitative effects of dietary fat on serum cholesterol in man. *Am J Clin Nutr*. 1965;17(5):281-95.
32. Brasil. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados. [acesso 2011 out 03]. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/rdc/36_0_03rdc.htm].
33. Vaisey-Genser M, Morris D. Flaxseed: Health, Nutrition and Functionality. Winnipeg: Flax Council of Canada; 1997.
34. DRI. Dietary Reference Intakes. Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids (Macronutrients). 2005. [acesso 2011 nov 23]. Disponível em: [http://search.nap.edu/nap/cgi/de.cgi?term=fiber].
35. Green AG, Marshall DR. Variation for oil quantity and quality in linseed (*Linum usitatissimum*). *Aus J Agric Res*. 1981;32(1):599-607.
36. Brasil. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº12, de 02 de janeiro de 2001. Dispõe sobre o regulamento técnico de padrões microbiológicos em alimentos. [acesso 2011 mai 14]. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br].
37. Moraes VAD. Linhaça - alimento seguro? Fundação Ezequiel Dias, Instituto Octávio Magalhães, Divisão de Vigilância Sanitária. [acesso 2011 out 30]. Disponível em: [http://www.hbatoools.com.br/.../VANESSA_MORAIS_CPF_27594726634ENVIO_862009_16-40-46.doc].
38. Riedel G. Controle sanitário dos alimentos. 2. ed. São Paulo, SP: Atheneu; 1992.
39. Nascimento MGF, Oliveira CZF, Nascimento ER. Hambúrguer: evolução comercial e padrões microbiológicos. *Bol CEPPA*. 2005;23(1):59-74.
40. Brasil. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Óleos e Gorduras vegetais. [acesso 2012 mai 10]. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br].
41. Baruffaldi R, Oliveira MN. Fundamentos de tecnologia de alimentos; v. 3. São Paulo, SP: Atheneu; 1998.

Chemical composition and functional properties of chocolate cakes formulated with yacon tube roots (*Smallanthus sonchifolius*)

Caracterização e propriedades funcionais de bolos de chocolate formulados com raízes tuberosas de yacon (*Smallanthus sonchifolius*)

RIALA6/1468

Vivianne Montarroyos PADILHA^{1*}, Silvana Magalhães SALGADO¹, Priscilla Moura ROLIM², Alda Verônica Souza LIVERA¹, Samara Alvachian Cardoso ANDRADE³, Nonete Barbosa GUERRA¹, Ruth Cavalcanti GUILHERME¹

*Endereço para correspondência: ¹Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife, PE, CEP: 50670-901. Tel.: (81) 2126-8470 (Ramal 229). E-mail: vivianne.padilha@ufpe.br

²Departamento de Nutrição, Universidade Federal do Rio Grande do Norte

³Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Pernambuco

Recebido: 15.09.2011 - Aceito para publicação: 21.05.2012

ABSTRACT

This present work aimed at developing a cake using yacon flour (20% and 40%), for replacing partially the wheat flour. The products were characterized on the nutritional composition, glycemic index, glycemic charge and *in vitro* prebiotic effect. The physicochemical analyses showed a high fiber concentration in the experimental cakes, in compliance with the legislation in force, being 7.49g% for the cake A (yacon 20%) and 10.75g% for the cake B (yacon 40%). Low concentrations of available carbohydrates of 11.22g% and 9.35g% were found in both cake A and B, respectively. Glicemic index lower than 55 and glycemic charge lower than 10 were detected. The prebiotic effect was observed by keeping the lactic bacteria above 10⁶ UFC/g of substrate. On that account, cakes containing high fiber concentrations were achieved. Regardless of the added amounts of yacon flour to the experimental cakes, they were classified as of low glycemic index and glycemic charges products, besides their *in vitro* prebiotic effect.

Keywords. yacon flour, cake, prebiotic effect, glycemic index, glycemic charge.

RESUMO

No presente trabalho, foram desenvolvidos bolos adicionando-se farinha de yacon [20% (bolo A) e 40% (bolo B)], em substituição parcial a farinha de trigo. Os produtos foram avaliados quanto às características de composição nutricional, índice glicêmico, carga glicêmica e efeito prebiótico *in vitro*. As análises físico-químicas mostraram concentração elevada de fibra nos bolos experimentais, de acordo com a legislação vigente, cujos valores foram de 7,49g% para o bolo A e 10,75g% para o bolo B. Ambos os bolos A e bolo B demonstraram baixa concentração de carboidratos disponíveis, respectivamente, de 11,22g% e 9,35g%. O índice glicêmico foi inferior a 55 e a carga glicêmica inferior a 10. O efeito prebiótico foi observado pela manutenção das bactérias lácteas acima de 10⁶ UFC/g de substrato. Neste estudo, foram obtidos bolos com alto teor de fibras. Independentemente da quantidade de farinha de yacon adicionada aos bolos experimentais, estes foram classificados como de baixos índice e carga glicêmicos, e de efeito prebiótico *in vitro*.

Palavras chave. farinha de yacon, bolo, efeito prebiótico, índice glicêmico, carga glicêmica.

INTRODUCTION

Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) is a spare tube roots plant, fusiform, containing a fleshy, sweet and clear pulp, even reaching 20 cm of length, presenting an external brown color and an internal cream-like staining. Its roots are eaten raw and still under the shape of a juice, syrup or dehydrated. They own a sweet flavor due to its fructan, inulin/ fructooligosaccharide content. – FOS¹.

Despite fructans perform functional properties as fiber fractions do, according to FAO/WHO recent report, these fructans are not classified as fibers, for being spare carbohydrates of vegetables². Fructans, upon reaching intact the large intestine, are fermented by probiotic cultures, mainly of the gender *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. As an aftermath, a series of compounds, including short chain fatty acids (AGCC) mainly acetate, propionate and butyrate, which are absorbed and used by human epithelial cells, nurturing the salt and water uptake, the growth of epithelial cells and the intestinal movement³.

Fructooligosaccharide fructans, known as “non-conventional”, present a relatively low fat value (1-2 Kcal/g) that might influence upon the glycemic response⁴.

There is in the literature, yacon application (extracts, flour) on several food products, among them chocolate cakes light developed by Padilha et al.⁵, bread made without fat by Rolim et al.⁶, jelly of yacon, guava and acerola no added sugar produced by Prati et al.⁷ and yacon juice produced by Lago et al.⁸. Among these, the cake is not considered a basic food, it is highly accepted by the population as a whole, on presenting a soft and porous texture, plus a sweet flavor. Notwithstanding, its intake is limited for diabetic and overweight individuals⁹.

Before the exposed results, it was agreed to develop formulations on chocolate cakes with yacon

flour, aiming to assess the nutritional characteristics and the effects concerning the glycemic response and the prebiotic potential.

MATERIAL AND METHODS

Yacon flour processing and cake preparation

The *in natura* yacon roots were washed and immersed in a sodium hypochloride solution at 200 ppm by 15 minutes. After, they were peeled on running water and cut by sharp-edged blades. The blades were immersed in a calcium chloride solution, containing 1,0 g . 100 g⁻¹ during 30 minutes. Then the blades were deposited on polyethylene trays and dried in an oven with forced ventilation at 55 °C for 24 hours. Subsequently, yacon was triturated in a dry mill rotor to obtain a product with characteristics of flour, which was packed in polyethylene bags, sealed and stored under refrigeration.

The cakes were prepared using the ingredients of the Table 1. The formulations showed different amounts of sugar, milk reconstituted powder and yacon meal. The sugar content reduced in the formulation as increased the amount of flour added yacon, because yacon fructooligosaccharides present a third of the sweetening power of sucrose³³. The mass of the cakes was prepared in mixer Kitchen Aid model K555, Hz 50-60. The margarine and the sugar were homogenated for 2 minutes at speed 2. After that, the other ingredients were added and homogenated for 3 minutes. At room temperature, the eggs were blended for 3 minutes at speed 1. Finally, the egg whites were added to the dough manually. The samples were baked in an oven at a temperature of 180 °C, for 30 minutes.

Table 1. Proportions of ingredients in the cakes formulation

Ingredients	Formulations		
	Standard sample P (%)	Experimental sample A (%)	Experimental sample B (%)
Eggs	98 g	98 g	98 g
Margarine (80% of lipids)	100 g	100 g	100 g
Milk reconstituted powder	100 mL	90 mL	80 mL
Crystal sugar	100 g	70 g	40 g
Cocoa powder	6 g	6 g	6 g
Chocolate	36 g	36 g	36 g
Wheat flour	100 g	80 g	60 g
Yacon powder	-	20 g	40 g
Baking power	16 g	16 g	16 g
Salt	3 g	3 g	3 g

Microbiological analysis on yacon flour

In order to check the yacon flour innocuity, coliform analysis were carried out at 45 °C, *Bacillus cereus* e *Salmonella* spp.¹⁰.

Yacon flour and cake Centesimal Composition

The yacon flour and chocolate cake centesimal composition was determined in triplicate according to AOAC method¹¹ humidity (method 935.29); fixed mineral residues (method 930.22-32.308), proteins (method 991.20-33.2.11), ether extract (method 963.15-31.4.02), total food fiber (985.29-45.4.08), total fructans¹², and other carbohydrates by difference.

“In vitro” Glycemic Index Determination and Glycemic Charge

The glycemic index determination (GI) was carried out according to the method developed by Gõni et al.¹³. The glucose curve obtained to calculate the glycemic index, using the white bread as food reference and the software Autocad (2008), to calculate the area.

The GI acquired was classified according to Brand-Miller et al.¹⁴ that follows the American Diabetic Association ADA¹⁵ recommendation, being the GI considered low values ≤ 55 and high values ≥ 70 . The glycemic charge (GC = GI x carbohydrate available in the portion / 100) was classified as low (≤ 10) or high (≥ 20) according to Lajolo and Menezes¹⁶.

Determination of the “in vitro” power probiotic

The probiotic effect was checked through fermentation of three formulations according to the methodology proposed by Cambrodón and Martín-Carrón¹⁷, with changes suggested by Silveira et al.¹⁸.

The 100 mg-samples were set in test tubes with 8 mL of the middle of fermentation¹⁹, incubated at 37 °C, in Gaspak jar with anaerobic system, during 12 hours. 2mL of inoculum were added to each test tube, prepared from infants' feces lifted up in the middle of fermentation, in proportion of 10 mL/g of feces, a 37 °C, under anaerobiosis for 12 hours.

Then, tubes were kept in anaerobic system, in double boiler under agitation and controlled (37 °C), remaining on these conditions during the fermentation period. In an interval of 2 hours, a 1 mL-aliquot of the metabolic liquid was used to count the bacteria.

In order to quantify and identify *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, the differential means HHD Agar²⁰ was

used. The samples of the metabolic liquid were incubated through surface plate, at 37 °C \pm 1 °C, for 72 h in anaerobic environment.

Statistic Treatment

The results were submitted to variance analysis (ANOVA), being the Duncan test carried out to be compared among the averages obtained at a 5% meaning level. In order to check the correlation among the samples, the software “statistic for windows” was used²¹.

RESULTS

The microbiological analysis for coliforms at 45 °C/g ($< 3,0$), *Bacillus cereus* at UFC/g ($< 1,0$) and *Salmonella* spp./25 g (absence) presented results according to legislation²², (10 for coliforms at 45 °C NMP/g, 3×10^3 for *Bacillus cereus* at UFC/g and absence in 25 g for *Salmonella*) being under safe conditions for human intake.

The results of the centesimal composition (Table 2) of the yacon flour were similar to the ones reported by literature. According to the centesimal composition (Table 3), experimental cakes presented a higher humidity, minerals and fibers contents. On the other hand, presented reduced content of carbohydrates (compared to the standard sample).

Table 2. Centesimal composition of yacon flour

Physical-chemical analysis	Yacon flour
Moisture	13,24
Ash	4,2
Protein	3,36
Lipids	0,19
Carbohydrate*	66,8
Total soluble fiber	2,76
Total fructans	1,45
Insoluble fiber	9,45
Total dietary fiber	12,21
V.C.T (Kcal)	282,35

* calculated by difference

According to the results depicted in the Table 4, the GI and GC values found for formulations with yacon flour were considered low¹⁴⁻¹⁶. Brand-Miller et al.¹⁴ that follows the American Diabetic Association ADA¹⁶ recommendation, being the GI considered low values ≤ 55 and high values ≥ 70 . The glycemic charge (GC = GI x carbohydrate available

Table 3. Centesimal composition of chocolate cakes

Analysis (humid basis g/100 g)	Standard cake (without yacon flour)	Sample A (20% of yacon flour)	Sample B (40% of yacon flour)
Moisture	35,85 ± 0,56c	42,59 ± 0,55b	45,72 ± 1,15a
Ash	2,15 ± 0,02c	2,66 ± 0,02b	3,20 ± 0,01a
Protein	7,21 ± 0,26a	7,06 ± 0,11a	6,59 ± 0,04b
Lipids	31,23 ± 0,40a	28,98 ± 0,26b	24,39 ± 0,58c
Carbohydrates*	19,93 ± 0,13a	11,22 ± 0,12b	9,35 ± 0,25c
Total soluble fiber	2,15 ± 0,02c	4,47 ± 0,04b	4,94 ± 0,05a
Total fructans	-	0,84 ± 0,01a	1,06 ± 0,01a
Insoluble fiber	1,48 ± 0,08c	3,02 ± 0,05b	5,81 ± 0,02a
Total dietary fiber	3,63 ± 0,02c	7,49 ± 0,02b	10,75 ± 0,03a
V.C.T (Kcal)	389,63 ± 2,03a	333,94 ± 1,10b	283,27 ± 2,04c

Same letter horizontally do not differ significantly at 5% significance level

* calculated by difference

in the portion / 100) was classified as low (≤ 10) or high (≥ 20) according to Lajolo and Menezes¹⁶.

Table 4. Glycemic index and glycemic charge of standard and experimental cakes

Sample	Glycemic Index	Glycemic Charge (100 g da portion of food)
Standard cake (without yacon flour)	73,18	17,08
Sample A (20% of yacon flour)	25,22	2,82
Sample B (40% of yacon flour)	17,16	1,6

The results (Table 5) showed that experimental cakes presented a satisfactory quantities of probiotics bacteria, mainly *lactobacillus*. According to Saad²³, for changes favorable in the composition of intestinal microbiota are observed at doses of 100g of food product containing 10^9 CFU of probiotic micro-organisms (10^7 CFU/g of product).

DISCUSSION

Centesimal composition of yacon flour

The results of the centesimal composition (Table 3) of the yacon flour were similar to the ones reported by Marangoni and Collares²⁴ and Fuke et al.²⁵, except for protein values. Ribeiro²⁶ reported percentages of protein and total food fiber similar to the data depicted in the Table 3, in yacon flour obtained through the same drying temperature (55 °C). Viega et al.²⁷ also found similar values to such work, regarding the percentage of ashes,

fibers and lipids. On the other hand, Moscatto et al.²⁸ found distinct values for all the parameters analyzed. The divergences could be explained through different times and drying temperature deployed, apart from the yacon growing and harvesting, and the state of maturation of the vegetable studied²⁹.

Centesimal composition of chocolate cakes

According to the centesimal composition (Table 4), the experimental cake B, presented a higher humidity content compared to the other cakes, result expected due to the higher yacon flour content, raw material containing a high number of hydroxyls available for water bond³⁰.

Regarding minerals, the experimental cakes presented a higher content, possibly by the calcium (23 mg/g) and the phosphorus (21 mg/g) in the yacon³¹.

And as for the other parameters, meaningful differences were observed among the experimental samples (Table 4). Upon observing the fiber content, the cakes A and B were considered products high in fiber, according to the current legislation that classifies a product as rich in fibers when it presents 3% of fibers and high for a percentage of 6% of fibers³¹.

The reduced content of carbohydrates available in the cakes A and B, regarding the pattern, it was already expected, due to the partial replacement of the wheat and flour for the yacon flour and the reduction of the sugar in the formulations (Table 1). Moreover, there was a meaningful reduction on the carbohydrates available around 30% for the cake A and 60% for the cake B, if compared to the standard cake providing low-sugar products, previously established by the Brazilian food legislation³² (Table 4). It was expected because the cakes

Table 5. Count of probiotics bacteria in cake formulations

Samples / Ferment. time	Infant feces (inoculum)		Standard cake (CFU/g)		Cake A (CFU/g)		Cake B (CFU/g)	
	Lacto	Bifid	Lacto.	Bifid.	Lacto.	Bifid	Lacto.	Bifid
0h	INC	2,0 x 10 ⁷	8 x 10 ⁶	NI	1,1 x 10 ⁸	NI	3,0 x 10 ⁷	1,5 x 10 ⁸
2h	4,2 x 10 ⁷	NI	6 x 10 ⁶	NI	1,2 x 10 ⁸	NI	INC	INC
4h	1,2 x 10 ⁷	NI	3,2 x 10 ⁷	NI	1,3 x 10 ⁸	NI	INC	INC
6h	1,5 x 10 ⁷	NI	8,4 x 10 ⁷	NI	1,2 x 10 ⁸	NI	INC	INC
8h	1,0 x 10 ⁷	NI	6,1 x 10 ⁷	NI	9,8 x 10 ⁷	NI	5,1 x 10 ⁷	INC
10h	2,1 x 10 ⁷	NI	3,2 x 10 ⁷	NI	8,3 x 10 ⁷	NI	3,3 x 10 ⁷	INC
12h	1,2 x 10 ⁷	NI	3 x 10 ⁶	NI	9,6 x 10 ⁷	NI	1,8 x 10 ⁷	INC

Lacto. = *Lactobacillus*, Bifid = *Bifidbacteria*; C.F.U. = Colony forming units; NI = Non identified; INC = uncountable

A and B contained less sugar in these formulations. However, results of sensory analysis performed by Padilha et al.⁵ showed that for the attribute sweet taste, the cake B, formulated with lower content of sugar (40 g) and higher content of yacon flour (40%) had the highest note, which stated that not significantly different ($p < 0.05$) standard sample and proving the performance of the FOS as a sugar substitute³³.

Determination of the glycemic index and glycemic charge

The literature is scarce concerning the determination of the GI in formulated foods with yacon flour. According to the results depicted in the Table 5, the GI values found for formulations with yacon flour were considered low. The cakes' GC containing yacon were also classified as low¹⁵⁻¹⁷.

These results can be explained by the application of yacon flour and, furthermore, by the fructans' content, as they perform similar effects compared to the fiber fraction, influences the foods' GI³⁴.

Besides the presence of fructans, the interactions starch-lipid and starch-protein during the thermal process possibly intervened in the GI and GC of the cakes³⁵. It's remarkable to determine such parameters in foods containing starch and fructans, aiming to help individuals to select better foods, especially those bearing disturbance on carbohydrate metabolism⁴.

Comparing the results of the standard cake to the literature, it was stated that the latter's GC was higher to the one reported by Brand-Miller et al.¹⁴ that detected 47, and lower to the FAO chart, which determines the GI of 87±5 for cakes³⁶. The divergences in the results described are resulted from the different ingredients used in the formulations, time and temperature of the thermal process, among other factors.

Cakes' Prebiotic Power

The results (Table 6) showed that the inoculum used in the fermentation presented satisfactory quantities of prebiotic bacteria, mainly *Lactobacillus*. Roberfroid³⁷ agreeing with other works reported that the growth of probiotic bacteria depend on the starting counting of bacteria in the feces (inoculum), regardless of the fructans dose deployed.

There was a remarkable growth of these bacteria during the fermentation of the experimental cakes, stating the yacon flour's potential as a prebiotic ingredient. According to Brasil³⁸ the prebiotic cultures counting over 10⁶ UFC/g of substrate is able to produce beneficial effects in the organism. Through a work carried out by Pedreschi et al.³⁹ depicted that *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* were able to ferment the FOS in the yacon roots.

The absence of bifidbacteria in the cake A can be explained through a higher demand on such bacteria, as well as through the lower amount of yacon flour in the formulation at issue, causing a competition among the prebiotic cultures for the substrate⁴⁰.

Regarding the fermentation of the cake B, the genders *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* presented an outstanding growth, especially the former one, possibly due to its higher fructans content in the formulation, reducing, thus, the competition among the prebiotic bacteria.

Nevertheless, such results must be checked by *in vivo* experimental models, whereas as the other prebiotics, its intake from 20 to 30 g of those might present several effects, however reversible, through the intake interruption³⁷.

CONCLUSION

The partial replacement of wheat flour by yacon flour favored the production of cakes rich in fiber. In

addition, probably contributed to reduce the content of sugar used in formulations A and B which contributed to obtaining low glycemic index and low glycemic charge. Cakes containing yacon flour presented prebiotic potential for causing the probiotic bacteria growth during the *in vitro* fermentation.

REFERENCES

- Ojansivu I, Ferreira CL, Salminen S. Yacon, a new source of prebiotic oligosaccharides with a history of safe use. *Trends Food Sci Tech*. 2011;22:40-46.
- Mann J, Cummings JH, Englyat HN, Key T, Liu S, Riccardi G, et al. Scientific update on carbohydrates in human nutrition: conclusions. *Eur J Clin Nutr*. 2007;61: 132-7.
- Valesca K. Otimização da desidratação osmótica e secagem do yacon (*Polymnia sonchifolia*) [dissertação de mestrado]. Curitiba, PR: Universidade Federal do Paraná; 2011.
- Cumming JH, Stephen AM. Carbohydrate terminology and classification. *Eur J Clin Nutr*. 2007;61:5-18.
- Padilha VM, Rolim PM, Salgado SM, Livera AVS, Andrade SAC. Perfil sensorial de bolos de chocolate formulados com farinha de yacon. *Cienc Tecnol Aliment*. 2010;30:3.
- Rolim PM, Salgado S.M, Padilha VM, Livera AVS, Andrade SAC, Guerra NB. Análise de componentes principais de pães de forma formulados com farinha de yacon. *Rev Ceres*. 2010;57:12-17.
- Prati P, Berbari AS, Pacheco MTB, Silva MG, Nacazume N. Estabilidade dos componentes funcionais de geleia de yacon, goiaba e acerola, sem adição de açúcares. *Braz J Food Technol*. 2009;12:4:285-94.
- Lago CC, Bernstein A, Brandelli A. Estudo do comportamento reológico, da atividade de água e do ponto de início de congelamento do suco de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) a diferentes concentrações. *Braz J Food Technol*. 2011;14:1:1-9.
- Moscato JA, Borsato D, Bona E, Oliveira AS, Haully MCO. The optimization of the formulation for a chocolate cake containing inulin and yacon meal. *Food Technol*. 2006;181-88.
- American Public Health Association (APHA). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington; 2001. 676p.
- Association of Official Analytical Chemistry (AOAC). Official Methods of Analysis. 13. ed. Washington; 2002.
- Quemener B, Thibault JF, Coussement, P. Determination of inulin and oligofructose in food products and integration in the AOAC method for measurement of total dietary fibre. *LWT-Food Sci Technol*. 1994;27: 125-132.
- Göni I, Garcia-Alonso A, Sauro-Calixto FA. A starch hydrolysis procedure to estimate glycemic index. *Nutr Res*. 1997;17(3):427-437.
- Brand-Miller J, Gilbertson H. Practical aspects of meal planning using the glycemic index. Workshop: Glycemic index and health: the quality of the evidence. Bandol: FAO/Danone Vitapole; 2002.
- ADA (American Diabetes Association). Evidence-based nutrition principles and recommendations for the treatment and prevention of diabetes and related complications. *Diab Care*. 2002;25:1:202-12.
- Lajolo MF, Menezes EW. Carbohidratos. Em Alimentos Regionales. Iberoamericanos. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo; 2006.
- Cambrondon IG, Martin-Carron N. Fermentación colónica de fibra dietética y almidón resistente. In: Lajolo FM, Saura-calixto F, Penna EW, Menezes EW. Fibra dietética em Iberoamérica: tecnologia y salud. São Paulo: Varela; 2001.
- Silveira KC, Brasil JA, Livera AVS, Salgado SM, Faro ZP, Guerra NB. Bebida à base de flocos de abóbora com inulina: características prebióticas e aceitabilidade. *Rev Nutr*. 2008;21(3).
- Barry JL, Hoebler C, Macfarlane GT, Macfarlane S, Mathers JC, Reed KA, et al. Estimation of fermentability of dietary fiber *in vitro*: a european interlaboratory study. *Br J Nutr*. 1995;74:303-22.
- Vanderzant C, Splittsloesser DF. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4. ed. Washington, DC: American Public Health Association; 2001.
- Statsoft, Inc. STATISTICA for Windows 6.0 [Computer program manual]. Tulsa: StatSoft; 2002.
- Brasil. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br].
- Saad SMI. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Rev Bras Cienc Farm*. 2006;42:1:1-16.
- Marangoni AL, Collares FP. Potencialidade de aplicação de farinha de yacon (*Polymnia sonchifolia*) em produtos à base de cereais [dissertação de mestrado]. Campinas, SP: Universidade Estadual de Campinas; 2007.
- Fuke G, Oliveira VR, Viega SD. Análise química e sensorial de leite com farinha de yacon e sua resposta glicêmica em indivíduos sadios. In: 7º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos. SLACA; 2007.
- Ribeiro JA. Estudo químico e bioquímico do yacon (*Smallanthus sonchifolius*) *in natura* e processado e influência do consumo de yacon sobre níveis glicêmicos e lipídeos fecais de ratos [dissertação de mestrado]. Lavras, MG: Universidade Federal de Lavras; 2008.
- Viega et al. Análise química e sensorial de leite com farinha de yacon e sua resposta glicêmica em indivíduos sadios. Simpósio Latino-Americano de Ciência dos Alimentos; 2007. Campinas: Anais. Sociedade Latino-Americana de Ciência de Alimentos.
- Moscato JA, Prudêncio-Ferreira SH, Haully COM. Farinha de yacon e inulina como ingredientes na formulação de bolo de chocolate. *Cienc Tecnol Aliment*. 2004;634-40.
- Santana I, Cardoso MH. Raiz tuberosa de yacon (*Smallanthus sonchifolius*): potencialidade de cultivo, aspectos tecnológicos e nutricionais. *Cienc Rural*. 20008;8(3):898-905.
- Madrigal L, Sangronis E. La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. *Arch Latinoam Nutr*. 2007;57(4):387-96.
- Brasil. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 27, de 13 de janeiro de 1998. Regulamento técnico referente à informação nutricional complementar. Disponível em [http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/27_98.htm].

32. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria n. 29, de 13 de janeiro de 1998. Regulamento de alimentos para fins especiais. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/29_98.htm].
33. Renhe IRT, Volp ACP, Barbosa KBF, Stringheta PC. Prebióticos e os benefícios de seu consumo na saúde. *Rev Bras Nutr Cli*. 2008;23:119-26.
34. Mabel MJ, Sangeetha PT, Platel K, Srinivasan K, Prapulla SG. Physiocochemical characterization of fructooligosaccharides and evaluation of their suitability as a potential sweetener for diabetics. *Carb Resource*. 2008;343(1):56-66.
35. Kelley DE. Sugars and starch in the nutritional management of diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr*. 2003;78:858-64.
36. FAO/WHO. Carbohydrates in Human Nutrition. Report of a joint expert consultation. *FAO Food Nutr*. 1998;66:1-140.
37. Roberfroid MB. Inulin-Type Fructans: Functional Food Ingredients. *J Nutr*. 2007;137:2493-502.
38. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução n. 18, de 3 de dezembro de 1999, atualizada em 2005. Regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e/ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. Disponível em: [<http://www.anvisa.gov.br>].
39. Pedreschi R, Campos D, Noratto G, Chirinos R, Zevallos LC. Andean yacon roots (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. Endl) fructooligosaccharides as potential novel source of prebiotics. *J Agr Food Chem*. 2003;51:5278-84.
40. Kolida S, Tuohy K, Gibson GR. Prebiotic effects of inulin and oligofructose. *Br J Nutr*. 2002;87(2):193-7.

Análise descritiva de iogurte light suplementado com farinha de yacon (*Smallanthus sonchifolius*)

Descriptive analysis of light yogurt supplemented with yacon (*Smallanthus sonchifolius*) flour

RIALA6/1469

Christiane Mileib VASCONCELOS*, Célia Lúcia de Lucas Fortes FERREIRA, Mônica Ribeiro PIROZI, José Benício Paes CHAVES

* Endereço para correspondência: Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa/UFV, Av. P. H. Rolfs s/n., Campus da UFV, CEP. 36570-000, Viçosa, MG. Tel: +55 (31) 3899-3803. E-mail: chrismileib@yahoo.com.br
Recebido: 24.08.2011 - Aceito para publicação: 24.04.2012

RESUMO

A farinha de yacon é ingrediente alimentar rico em fibras, especialmente fruto-oligossacarídeos (FOS) e inulina, considerados como prebióticos. Neste estudo, foram produzidos iogurtes *light* suplementados com 1,58%, 2,56%, 3,00% e 3,86% de farinha de yacon e quantificados os teores de fibras. O efeito da concentração de farinha de yacon foi avaliado no perfil sensorial e na aceitabilidade dos produtos. A quantidade de farinha de yacon foi estimada para obter iogurtes que poderiam ser classificados como fontes de fibra alimentar total (FAT), inulina e/ou FOS. A FAT foi mensurada pelo método enzimático-gravimétrico, e FOS e inulina por cromatografia líquida de alta eficiência. O painel sensorial avaliou 11 atributos pelo método espectro (n = 9) e a aceitabilidade (n = 92) pela escala hedônica de nove pontos. Os resultados foram analisados por meio de Anova e regressão. Os iogurtes contendo 2,56% a 3,86% de farinha de yacon podem ser considerados como fontes de FAT. No perfil sensorial, os descritores para aparência, textura, aroma e sabor de yacon aumentaram linearmente ($p < 0,01$) com adição de farinha de yacon. Não houve mudança nos gostos doce e ácido, porém o aroma fermentado diminuiu com a suplementação. Houve maior aceitação de iogurtes com menor quantidade de farinha de yacon.

Palavras-chave. iogurte, farinha de yacon, fibra alimentar, fructooligossacarídeos, inulina, método espectro.

ABSTRACT

Yacon flour is a food ingredient rich in fiber, specially fructooligosaccharides (FOS) and inulin, considered as prebiotic. This study aimed at producing a light yogurt supplemented with 1.58%, 2.56%, 3.00% and 3.86% of yacon flour, and evaluating the quantity of fiber contents. The effect of yacon flour contents on the sensory profile and acceptability of yogurt was analyzed. The yacon flour amounts were estimated to produce yogurts, which could be classified as sources of total dietary fibers (TDF), inulin and/or FOS. TDF was quantified by enzymatic-gravimetric method, and FOS and inulin by high performance liquid chromatography. Sensory panel evaluated 11 attributes by spectrum method (n = 9) and acceptability (n = 92) by using nine-point hedonic scale. The results were analyzed by ANOVA and regression. Yogurts containing 2.56% to 3.86% of yacon flour may be considered a source of TDF. In the sensory profile, the descriptors for appearance, texture, yacon aroma and yacon flavor increased linearly ($P < 0.01$) with addition of yacon flour. Sweet and acid tastes did not change, and the fermented aroma decreased with supplementation. Acceptance was higher for yogurts with lower quantities of yacon flour.

Keywords. yogurt, yacon flour, dietary fiber, fructooligosaccharides, inulin, spectrum method.

INTRODUÇÃO

Os alimentos funcionais constituem prioridade de pesquisa na área de nutrição e tecnologia de alimentos, levando-se em conta o interesse do consumidor em alimentos mais saudáveis, que, além de nutrir, ajudam a modelar o sistema fisiológico do organismo¹⁻⁴.

O setor lácteo não foge a esta tendência em produzir alimentos em que a funcionalidade é o principal atributo^{5,6}. Dentre os produtos derivados do leite, o iogurte tem grande destaque, dada a sua versatilidade, podendo apresentar ausência ou reduzido teor de gordura, pode ser adicionado de frutas, cereais e diferentes sabores, sendo um alimento saudável e nutritivo^{7,8}. Pode também ser enriquecido com alimentos aos quais são atribuídas características probióticas, prebióticas e nutracêuticas.

Dentre os alimentos funcionais, o yacon (*Smallanthus sonchifolius*) tem ganhado importância. É uma raiz de origem andina e tem sido descrita como o alimento com maior conteúdo de fruto-oligossacarídeos (FOS) na natureza, diferentemente da maioria dos tubérculos e raízes, que armazenam seus carboidratos em forma de amido. Os FOS são um tipo especial de carboidrato com efeitos enormemente benéficos para a saúde humana. Uma das principais características desses carboidratos é a estimulação do crescimento de bactérias não patogênicas por meio da fermentação colônica, sendo assim classificados como constituintes bioativos com alegação prebiótica⁹ e, portanto, funcionais.

A partir da raiz de yacon, é possível obter a farinha, que vem sendo utilizada como ingrediente em alimentos, dando origem a produtos com baixo teor de gordura e reduzido valor calórico, além de propiciar benefícios fisiológicos ao consumidor¹⁰.

O desenvolvimento de iogurte *light* adicionado de farinha de yacon poderia ser uma alternativa no mercado de fermentados, pois, além de poder ser consumido por pessoas de diferentes faixas etárias, gerando vários benefícios à saúde, permitiria a elaboração de um produto com fibras e baixos teores de gordura e açúcar, possibilitando sua indicação para consumidores obesos, com índices lipídicos séricos elevados^{11,12} e com distúrbios gastrointestinais, como prisão de ventre.

Essas características, associadas à presença de atributos sensoriais desejáveis, são fatores fundamentais para assegurar um produto no mercado. Porém, para garantir que este produto tenha sucesso junto aos consumidores, é necessário que se trabalhe com

ferramentas de qualidade. Dentre estas ferramentas, têm-se as técnicas de análise sensorial que permitem diagnosticar os tipos e causas de deficiências na qualidade do produto, o que é fundamental para se definir medidas preventivas na produção, processamento e distribuição¹³.

Dentre os métodos sensoriais analíticos utilizados em alimentos, destaca-se a análise descritiva pelo método espectro, que consiste em uma completa, detalhada e acurada caracterização descritiva dos atributos sensoriais de um produto, dando ênfase tanto aos aspectos qualitativos, quanto aos quantitativos de medidas descritivas¹⁴.

Outros testes de expressiva relevância e muito úteis no campo da análise sensorial são os testes afetivos, que geralmente vêm em sequência aos descritivos. Os testes afetivos compreendem aqueles que irão avaliar o grau de gostar ou desgostar de determinado produto ou, ainda, a preferência que o consumidor assume sobre um produto com relação a outro. Estes testes podem fornecer informações complementares às respostas obtidas pela análise descritiva¹⁵.

Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo quantificar o teor de fibra alimentar total, fruto-oligossacarídeos e inulina e determinar o perfil sensorial, usando o método espectro de análise sensorial descritiva e a aceitabilidade sensorial de iogurtes *light* suplementados com diferentes proporções de farinha de yacon.

MATERIAL E MÉTODOS

Planejamento experimental

O preparo do iogurte foi conduzido segundo um delineamento inteiramente casualizado, com quatro formulações e um controle em duas repetições. Quatro concentrações de farinha de yacon foram adicionadas aos iogurtes formulados a partir de leite desnatado e adoçados com aspartame (0,072%). As concentrações de farinha de yacon foram estimadas em função da quantidade de fibras alimentares, FOS e/ou inulina, recomendada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária¹⁶ para alimentos líquidos com alegação de propriedades funcionais a partir da composição centesimal da farinha de yacon utilizada no presente estudo. Assim, os iogurtes foram adicionados de 1,58%, 2,56%, 3,00% e 3,86% de farinha de yacon, quantidades estas estimadas para fornecer 1,50 g de fibras totais, 1,50 g de FOS e inulina, 1,75 g de FOS e inulina e 1,50 g de FOS por porção de iogurte, respectivamente, sendo a porção de iogurte equivalente a

200 mL. O iogurte controle consistiu na mistura base de leite desnatado adoçados com aspartame sem adição de farinha de yacon.

Processo de obtenção da farinha de yacon

A farinha de yacon, produzida com base na metodologia de Ribeiro¹⁷, foi obtida a partir de 45,5 kg de raízes de yacon *in natura*, adquiridas no Ceasa de Belo Horizonte (MG) no período de agosto a setembro de 2009. As raízes foram descascadas manualmente, fatiadas em multiprocessador (Walita RI7625) e imersas, inicialmente, em bacias de aço inoxidável por 15 minutos, contendo solução de hipoclorito de sódio (4% a 6% de cloro ativo) a 200 ppm e, posteriormente, em outra bacia de aço inoxidável, contendo solução de bissulfito de sódio a 0,1% em relação ao peso da raiz descascada. Em seguida, as raízes trituradas foram secas em estufa com ventilação forçada (Nova Ética 400ND/300 °C) a 55 °C por 48 horas. As raízes secas foram, então, trituradas em moinho com rotor vertical de martelos fixos (Marconi MA-090/CF) para obtenção de farinha, embalada em saco de polietileno e armazenada sob refrigeração, em câmara fria a 2-4 °C.

Processo de fabricação do iogurte *ligh* com farinha de yacon

Ao leite desnatado, foram adicionados a farinha de yacon e o aspartame, sendo a mistura homogeneizada em agitador mecânico (Omni Macro ES Digital Programmable Homogenizer) a 4.480 x g por 10 minutos e, posteriormente, aquecida à temperatura de 83 °C por 30 minutos em iogurteiras de aço inoxidável com capacidade para 20 L (Biasinox).

Após o aquecimento, a mistura foi resfriada até 42 °C e acrescida de 0,02% de fermento láctico fornecido pela Christian Hansen (Valinhos, SP), conforme Reis¹⁸, contendo culturas de *Lactobacillus delbrückii subsp. bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* para iniciar o processo de fermentação.

A fermentação do leite ocorreu por aproximadamente seis horas, a temperatura de 42 °C a 43 °C, até o iogurte atingir valores de acidez de 0,70-0,75% (expressa em porcentagem de ácido láctico). Em seguida, ele foi resfriado até alcançar 37 °C, para, então, realizar a quebra da coalhada. Imediatamente, foi realizado o envase em embalagens de polietileno de 860 mL e o armazenamento em câmara fria à temperatura de 2-4 °C até o momento das análises sensoriais, totalizando

30 dias. O processo de fabricação de cada formulação de iogurte foi realizado em repetição.

Determinação das frações de fibra alimentar dos iogurtes *light* com farinha de yacon

A concentração de fibra alimentar total (FAT) foi determinada por meio do somatório da quantidade de fibra alimentar solúvel (FAS), fibra alimentar insolúvel (FAI), FOS e inulina.

As concentrações de FAS e FAI foram mensuradas utilizando o kit-dietary fiber total, marca Sigma®, seguindo-se as técnicas de análises enzimático-gravimétricas propostas pela AOAC¹⁹. As determinações foram expressas como a média de duplicatas realizadas no iogurte de cada unidade experimental.

As determinações de FOS e inulina foram realizadas conforme metodologia de Kaneko; Kudo e Horikoshi²⁰ por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com coluna HPX 87P marca BIO-RAD (fase estacionária de chumbo), usando água purificada como fase móvel. As amostras foram injetadas na coluna HPX 87P em cromatógrafo líquido marca Várian, modelo Pró-Star 410 com detector de índice de refração e injetor automático (Auto Sampler 410), com fluxo de 0,6 mL/m e temperatura da coluna 85 °C, projetando uma sequência de picos que formam comparados com os padrões.

Análise sensorial descritiva pelo método espectro dos iogurtes *light* com farinha de yacon

A análise sensorial descritiva dos iogurtes foi realizada usando o Método Espectro descrito por Meilgaard, Civille e Carr²¹.

Os provadores eram alunos da Universidade com faixa etária entre 19 e 30 anos, sendo sete mulheres e dois homens.

Inicialmente, foram recrutados 70 alunos da Universidade Federal de Viçosa, por meio de um questionário de identificação de consumidores de iogurte, em bom estado de saúde, disponibilidade de tempo, interesse e habilidade para utilizar a escala e definir termos descritivos. Desses, 50 foram pré-selecionados para participar da seleção e compor a equipe sensorial.

A seleção dos provadores contou com uma série de testes de acuidade para testar a habilidade dos participantes em detectar e descrever as características sensoriais e suas intensidades. Dentre esses testes, foram realizados testes de gostos primários, escala e uso de referências, identificação de odor, textura e aparência.

Dos 50 participantes pré-selecionados, 19 passaram nos testes de acuidade, sendo, então, selecionados para compor a equipe sensorial.

O treinamento foi realizado em duas partes, sessão de orientação geral e sessão prática. Na orientação geral, os provadores foram solicitados a identificar e definir os atributos de aparência, textura, gosto, sabor e aroma dos iogurtes. Em cada sessão de treinamento, todos os cinco iogurtes eram apresentados aos provadores para facilitar a identificação dos termos e referências. Foram definidos os atributos: aparência (cor, granulosidade e consistência), textura (viscosidade, textura farinácea e residual de farinha), gosto (doce e ácido), sabor (yacon) e aroma (yacon e fermentado). A definição dos termos e as referências utilizadas para cada atributo estão apresentados na Tabela 1.

É importante salientar que, apesar de o aspartame fazer parte dos ingredientes das formulações de iogurte *light* desenvolvidas neste estudo, os provadores não identificaram gosto residual de edulcorante durante o levantamento dos descritores a serem trabalhados, não sendo, portanto, utilizado este atributo durante a avaliação sensorial descritiva.

Após a definição da linguagem sensorial, foi elaborada a ficha de avaliação, com escalas não estruturadas de 15 centímetros, em que 0 = ausente e 15 = extremamente forte.

Na sessão prática, foi realizado um total de 11 exercícios, para que os provadores praticassem e aplicassem os princípios aprendidos. A partir desses exercícios, foi verificada a existência de repetibilidade e concordância das médias com a equipe. Ao final de cada sessão de exercícios, os resultados foram discutidos com a equipe sensorial a fim de identificar aqueles atributos sensoriais ou provadores que necessitavam de mais treinamento.

Após aproximadamente 50 horas de treinamento com base nas referências definidas para cada atributo e a realização dos exercícios, apenas nove provadores permaneceram compondo a equipe sensorial, sendo eles aptos a realizar a avaliação dos iogurtes *light* com farinha de yacon.

Para avaliação dos iogurtes, foi utilizado o delineamento em blocos casualizados com três replicatas, sendo apresentadas as cinco amostras de uma vez em cada sessão. Os provadores receberam aproximadamente 30 g

Tabela 1. Linguagem sensorial utilizada na avaliação sensorial descritiva de iogurtes com yacon

Termos	Definição	Referência
Cor	Tonalidade da cor variando de branco a marrom	0 = iogurte natural; 7,5 = iogurte Nestlé Neston [®] sabor banana, mamão e maçã; 15 = iogurte de ameixa Molico [®]
Granulosidade	Partículas de farinha de yacon observadas visualmente	1 = água; 7,5 = iogurte com 2,5% FY; 15 = iogurte com 5% FY.
Consistência	Propriedade de resistência ao escoamento	1 = água; 7,5 = iogurte com 2,5% FY; 15 = iogurte com 5% FY.
Viscosidade	Propriedade de resistência ao escoamento na boca	1 = água; 7,5 = iogurte com 2,5% FY; 15 = iogurte com 5% FY.
Textura farinácea	Partículas de farinha de yacon percebidas na boca durante a manipulação da amostra adicionada	0 = iogurte natural; 7,5 = iogurte com 2,5% FY; 15 = iogurte com 5% FY.
Residual de farinha	Sensação residual de farinha de yacon percebida após a deglutição do iogurte	0 = iogurte natural; 7,5 = iogurte com 2,5% FY; 15 = iogurte com 5% FY.
Gosto doce	Gosto doce associado à presença de açúcares ou agentes adoçantes	0 = iogurte natural; 2 = 2% de sacarose; 5 = 5% de sacarose; 15 = 15% de sacarose.
Gosto ácido	Gosto ácido associado à presença de ácidos	2 = 0,05% de ácido cítrico; 5 = 0,08% de ácido cítrico; 15 = iogurte natural.
Sabor de yacon	Sabor característico de yacon	0 = iogurte natural; 7,5 = iogurte com 2,5% FY; 15 = iogurte com 5% FY.
Aroma de yacon	Aroma característico de yacon	0 = iogurte natural; 7,5 = iogurte com 2,5% FY; 15 = iogurte com 5% FY.
Aroma fermentado	Aroma associado com iogurte natural	0 = iogurte de coco DeLeite [®] ; 15 = iogurte natural.

FY = Farinha de yacon

de amostra a 10 °C, servidas em copos descartáveis de 50 mL codificados com números aleatórios de três dígitos em cabines individuais sob luz branca, juntamente com um copo de água filtrada.

Testes de aceitação sensorial dos iogurtes *light* com farinha de yacon

O teste de aceitação foi conduzido com a participação de 92 funcionários e estudantes universitários com idade entre 15 e 45 anos, sendo 54% do sexo masculino. Amostras das cinco formulações de iogurte foram servidas em uma só vez, monadicamente, em ordem aleatória, em copos descartáveis de 50 mL, identificados com códigos de três dígitos, juntamente com a ficha de avaliação da escala hedônica e um copo de água filtrada, a 23 °C, para cada provador. Os atributos sensoriais aroma, sabor, textura e impressão global foram avaliados utilizando-se uma escala hedônica de nove pontos variando de “desgostei extremamente” (1) a “gostei extremamente” (9)¹⁵.

Análise estatística

Os resultados da avaliação sensorial descritiva foram analisados de acordo com o delineamento em blocos casualizados (DBC), sendo os provadores considerados como blocos, com 5 formulações e 2 repetições. Para o teste de aceitação sensorial, foi utilizado o modelo de delineamento inteiramente casualizado, com 5 formulações e 92 provadores como repetição.

A avaliação sensorial descritiva foi submetida à análise de variância (Anova) realizada com três fontes de variação: formulação, provador e interação provador-formulação.

Para os atributos sensoriais que apresentaram interação provador-formulação significativos ($p < 0,01$), foi verificada a magnitude dessas interações por meio de gráficos de intensidade dos atributos por formulação por

provador. Os dados dos provadores que demonstraram interação grave foram retirados da análise dos resultados para o respectivo atributo.

Em relação aos atributos sensoriais que demonstraram diferença significativa ($p < 0,01$) entre os iogurtes, foram ajustadas equações de regressão dos escores obtidos de cada atributo em função do teor de farinha de yacon. Nesta análise, foram testados modelos de equação linear e quadrático para cada atributo sensorial em função da variação na concentração de farinha de yacon no iogurte.

Os resultados do teste de aceitação sensorial foram submetidos a Anova. Para os atributos que apresentaram diferença significativa ($p < 0,01$), foram testados modelos de equação linear ou quadrático.

A análise dos resultados foi realizada utilizando-se os procedimentos do ambiente SAS²² versão 9.1 licenciado para a Universidade Federal de Viçosa.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise das frações de fibra alimentar dos iogurtes *light* com farinha de yacon

Os teores de fibra alimentar total (FAT), fibra alimentar insolúvel (FAI), fibra alimentar solúvel (FAS), fosfo-oligossacarídeos (FOS) e inulina presentes em cada iogurte estão apresentados na Tabela 2.

De acordo com a legislação brasileira, são considerados alimentos com alegação funcional aqueles que apresentam no mínimo 1,5 g de fibras alimentares totais, ou 1,5 g dos constituintes de fibras (FOS ou inulina, isoladamente), em alimentos líquidos, por porção de consumo do produto (200 mL)²³.

Para o experimento, foi estimada a quantidade de farinha de yacon capaz de fornecer 1,50 g de fibras totais (1,58%); 1,50 g de FOS e inulina (2,56%); 1,75 g de FOS e inulina (3,00%); e 1,50 g de FOS (3,86%) por

Tabela 2. Valores médios dos componentes da fração fibra alimentar por porção de iogurte *light* com yacon (g/200 mL)

Componentes (%)	Iogurte controle	Iogurte com 1,58 % FY*	Iogurte com 2,56 % FY*	Iogurte com 3,00 % FY*	Iogurte com 3,86 % FY*
FAI	0	0,50	0,82	0,96	1,22
FAS	0	0,08	0,12	0,14	0,18
FOS	0	0,28	0,34	0,34	0,40
Inulina	0	0,54	0,78	0,78	0,96
FAT**	0	1,40	2,06	2,22	2,76

* Farinha de yacon.

** Fibra alimentar total obtida por meio do somatório das determinações de fibra alimentar insolúvel (FAI), fibra alimentar solúvel (FAS), FOS e inulina.

porção de iogurte, quantidade suficiente para classificá-los como produtos com alegação funcional. Contudo, ao determinar os componentes da fração fibra no produto final, obteve-se 1,40, 1,12, 1,12 e 0,40 g/porção dos constituintes descritos; assim, nenhum dos iogurtes desenvolvidos neste estudo contemplou a quantidade de fibra alimentar total, FOS e/ou inulina previamente estimada.

A redução nos valores de fibras totais, FOS e inulina determinados pelo método enzimático-gravimétrico e HPLC nos iogurtes, em relação à quantidade inicialmente estimada, podem ter ocorrido devido à degradação enzimática de FOS e inulina em sacarose, glicose e frutose, que ocorrem durante a estocagem²⁴, visto que a farinha utilizada no desenvolvimento dos iogurtes foi armazenada sob refrigeração (2-4 °C) por um período aproximado de sete meses.

A degradação enzimática de FOS e inulina provém da despolimerização das cadeias dessas fibras, hidrolisadas em açúcares simples pela ação da enzima frutano hidrolase, que rompe a cadeia entre os resíduos de frutose até a molécula terminal de sacarose e, em seguida, a invertase rompe a molécula de sacarose resultando em frutose e glicose livres^{25,26}. Os trabalhos de Graefe et al.²⁴ indicam que a velocidade desta conversão é especialmente rápida nos primeiros dias pós-colheita. Após uma semana de armazenamento à temperatura ambiente, cerca de 30% a 40% dos FOS terão sido transformados em açúcares simples na raiz *in natura*. A produção de farinha de yacon permite a redução da degradação enzimática de FOS em glicose e frutose²⁴ e, além disso, a velocidade de conversão desses constituintes de fibras se torna mais lenta sob refrigeração^{27,28}.

Assim, apesar de não serem considerados fontes de FOS e/ou inulina, os iogurtes contendo 2,56%, 3,00% e 3,86% de farinha de yacon apresentaram 2,06, 2,22 e 2,76 g de fibra alimentar total por porção do produto, respectivamente (Tabela 2), suprimindo a recomendação para este componente. Portanto, pode-se considerar que esses iogurtes são alimentos fonte de fibras alimentares totais com alegação funcional e que, além disso, fornecem quantidades consideráveis das fibras solúveis FOS e inulina.

Análise descritiva pelo método espectro sensorial dos iogurtes *light* com farinha de yacon

Os atributos sensoriais textura farinácea, residual de farinha, gosto doce e aroma fermentado demonstraram

efeito significativo ($p \leq 0,01$) da interação formulação-provador. Para corrigir essa ocorrência, a magnitude dessas interações nesses atributos foi verificada por meio de gráficos da intensidade dos atributos por formulação, por provador.

A partir da construção desses gráficos, foram observados que, para determinados atributos, alguns provadores apresentaram comportamento destoante em relação aos demais e, conseqüentemente, efeito da interação formulação-provador significativo ($p < 0,01$); assim, na avaliação desses atributos, as notas atribuídas por esses provadores foram retiradas. Para o atributo textura farinácea, foram retirados dois provadores que apresentaram interação grave, sendo, portanto, recalculada a média com base nos resultados de sete provadores. Já para os atributos residual de farinha e gosto doce, foi retirado apenas um provador, utilizando os dados de oito provadores para cada um desses atributos e, para aroma fermentado, foram retirados três provadores, restando seis para o cálculo das médias.

Retirados os dados dos provadores com interação grave, a Anova foi novamente realizada, sendo não significativo ($p > 0,01$) o efeito da interação formulação-provador, para os atributos sensoriais avaliados. O atributo gosto ácido do iogurte demonstrou não sofrer alteração significativa ($p > 0,01$) com a variação da concentração de farinha de yacon utilizada neste estudo.

Para os demais atributos, foram testados modelos de regressão linear e quadrático a 1% de probabilidade, como apresentado na Tabela 3.

Os atributos cor, consistência, sabor de yacon, aroma de yacon e aroma fermentado apresentaram modelos de regressão com falta de ajuste não significativa, coeficientes de regressão significativos e elevados coeficientes de determinação ($R^2 > 0,83$), podendo ser usado para fins preditivos. Por outro lado, apesar do atributo gosto doce ter apresentado falta de ajuste não significativa, seus coeficientes de regressão foram não significativos, indicando uma inadequação dos modelos linear e quadrático para prever o comportamento desse atributo em relação à variação da concentração de farinha de yacon utilizada no estudo.

Os atributos granulidade, viscosidade, textura farinácea e residual de farinha apresentaram coeficientes de regressão e falta de ajuste significativos; no entanto, a falta de ajuste para esses atributos apresentou um valor muito baixo; assim, sua significância foi desconsiderada, e os modelos foram utilizados para explicar a variação

Tabela 3. Estimativas de regressão da variação dos escores dos atributos sensoriais da análise descritiva pelo método espectro dos iogurtes em função da adição de farinha de yacon (X), seus respectivos coeficientes de determinação (R²) e níveis de probabilidade (p) para o valor F da regressão

Atributo	Modelo de regressão	R ²	Prob >F
Cor	1,03 + 2,30X	0,9594	<0,0001
Granulosidade	0,72 + 2,67X	0,9055	<0,0001
Viscosidade	4,11 + 1,54X	0,7538	<0,0001
Consistência	3,69 + 1,63X	0,8336	<0,0001
Textura farinácea	0,51 + 2,70X	0,8406	<0,0001
Residual de farinha	0,58 + 2,76X	0,9069	<0,0001
Gosto doce	Y = 3,71		
Sabor de yacon	0,26 + 2,88X	0,9808	<0,0001
Aroma de yacon	0,20 + 2,77X	0,9639	<0,0001
Aroma fermentado	10,26 - 2,55X	0,9554	<0,0001

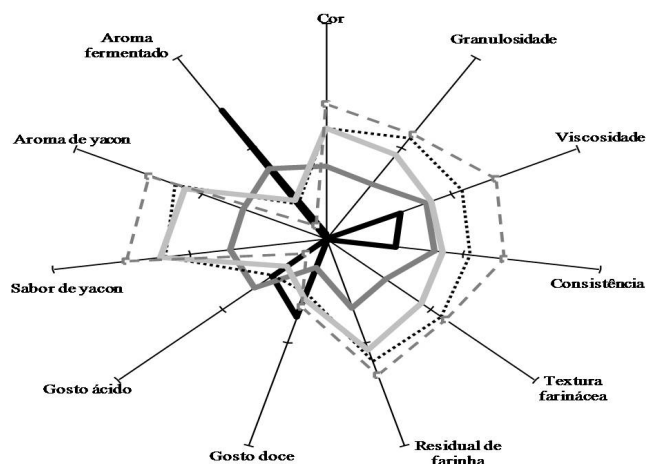
desses atributos em função da concentração de farinha de yacon.

Pode-se observar que houve efeito linear significativo para todos os atributos avaliados. Estes resultados sugerem que, sob as condições praticadas no experimento, as mudanças sensoriais ocorreram de forma linear em função da concentração de farinha de yacon no iogurte, ou seja, com o aumento das concentrações, tem-se uma variação linear da percepção dos atributos avaliados.

Para os atributos cor, granulosidade, viscosidade, consistência, textura farinácea, residual de farinha, sabor de yacon e aroma de yacon foram observados relação positiva, ou seja, a intensidade desses atributos aumenta à medida que se aumenta a concentração da farinha de yacon. Contrariamente, o atributo aroma fermentado apresentou relação negativa, isto é, com o aumento da concentração de farinha de yacon, tem-se a redução da intensidade de percepção pelos provadores desse atributo sensorial.

A relação inversa percebida entre aroma fermentado e aroma de yacon, sugere que, com o aumento da concentração de farinha de yacon, tem-se também o aumento de aroma de yacon que, por sua vez, reduz a percepção do aroma fermentado. Nota-se também que as equações geradas para aroma de yacon e sabor de yacon são bem semelhantes.

O perfil sensorial de cada iogurte com yacon, expresso graficamente, segundo as médias dos termos descritores do Método Espectro, pode ser observado na Figura 1. No gráfico, o ponto zero da escala do atributo é o seu centro, e a intensidade aumenta do centro para a sua periferia. A média de cada atributo, para cada iogurte, é marcada no eixo correspondente e o perfil sensorial é traçado pela conexão dos pontos.



Ao se comparar o iogurte controle com os iogurtes adicionados de farinha de yacon, observa-se que os provadores indicaram que a presença desta farinha contribui para um aumento dos escores sensoriais para viscosidade e consistência, possivelmente devido ao teor de fibras solúveis presente na farinha de yacon que interagem com a fração aquosa do iogurte. Para aroma fermentado, os provadores indicaram que a presença de farinha de yacon diminuiu os escores da percepção desse atributo, confirmando a equação de regressão encontrada.

Quanto aos atributos granulosidade, textura farinácea, residual de farinha, sabor de yacon e aroma de yacon, o iogurte controle apresentou média igual a zero, o que se deve à ausência de farinha de yacon em sua composição.

O perfil sensorial descritivo dos atributos demonstra que o iogurte com 3,86% de farinha de yacon apresentou maior intensidade (maiores valores

Tabela 4. Estimativas de regressão para os atributos avaliados no teste de aceitação dos iogurtes *light* com yacon em função da concentração de farinha de yacon (X) e seus respectivos coeficientes de determinação (R^2) e níveis de probabilidade para os valores de F da regressão

Atributo	Modelo de regressão	R^2	Prob>F
Aroma	6,53 - 0,37X	0,8414	<0,0001
Sabor	6,77 - 1,59X + 0,21X ²	0,9535	<0,0001
Textura	6,11 - 0,65X	0,9427	<0,0001
Impressão global	6,47 - 1,27X + 0,16X ²	0,9503	<0,0001

de escores médios) para cor, granulidade, viscosidade, consistência, textura farinácea, residual de farinha, aroma de yacon e sabor de yacon, visto que as médias para esses atributos apresentaram-se mais externas e menor intensidade para aroma fermentado e gosto ácido, uma vez que suas médias estão mais internas (Figura 1). Este resultado era esperado, visto que tal iogurte possuía a maior concentração de farinha de yacon. A menor intensidade de gosto ácido indica que a farinha de yacon mascara a percepção desse atributo presente naturalmente em iogurtes.

Os escores médios dos iogurtes com 2,56% e 3,00% de farinha de yacon foram bem semelhantes, especialmente para cor, residual de farinha, gosto doce, gosto ácido, sabor de yacon, aroma de yacon e aroma fermentado. Esta ocorrência se deve ao fato de a diferença nas concentrações de farinha de yacon para estes iogurtes ter sido de apenas 0,44%, muito baixa quando comparada à diferença apresentada pelos demais iogurtes.

Aceitação sensorial dos iogurtes com farinha de yacon

Todos os iogurtes avaliados apresentaram escores de aceitação médios alocados entre os termos hedônicos “desgostei ligeiramente” e “gostei moderadamente” (dados não mostrados). Sugere-se que a baixa aceitação dos iogurtes, inclusive do controle pode ter ocorrido devido ao fato de ter sido realizado um teste com informação e de os consumidores não conhecerem a raiz de yacon e, portanto, não reconhecerem seu aroma e sabor característicos.

Como a aceitação foi significativamente ($p < 0,01$) diferente para todas as formulações de iogurte *light* suplementadas com farinha yacon, foram gerados modelos de regressão para prever a tendência da aceitação de cada atributo em relação à concentração de farinha de yacon. Tais equações estão apresentadas na Tabela 4.

Todos os modelos apresentaram falta de ajuste não significativo, coeficientes de regressão significativos e altos coeficientes de determinação ($R^2 > 80\%$), indicando

que eles podem ser usados para avaliar a variação das respostas dentro do intervalo de variação estudado.

Aroma e textura apresentaram efeito linear negativo, enquanto sabor e impressão global demonstraram efeito quadrático negativo. Assim, para os primeiros, os modelos de regressão sugerem que, em relação à quantidade de farinha de yacon estudada, quanto maior a concentração de farinha de yacon adicionada aos iogurtes, menor é a sua aceitação para esses atributos.

CONCLUSÃO

Os iogurtes *light* do presente estudo contendo 2,56%, 3,00% e 3,86% de farinha de yacon por porção permitiram a obtenção de produtos que podem ser considerados alimentos fonte de fibras alimentares totais com alegação funcional e que, além disso, fornecem quantidades consideráveis de fibras solúveis, como FOS e inulina.

O teste de aceitação forneceu médias baixas para os atributos avaliados. Seria interessante a realização de novos testes de aceitação sem a informação da composição do iogurte e/ou com a informação de suas propriedades funcionais para comparar os resultados e verificar se estas informações influenciam ou não na aceitação dos produtos.

Em conclusão, as indústrias alimentícias que desejam lançar no mercado produtos contendo yacon devem investir tanto nos aspectos sensoriais do produto, como na divulgação dos benefícios do consumo dessa raiz à saúde humana, a fim de levantar expectativas positivas nos consumidores e estimular a compra e o consumo destes produtos.

REFERÊNCIAS

1. Ferreira CLLF. Tecnologia para Produtos Lácteos Funcionais: Probióticos. *Bol SBCTA*. 2000;1(36).
2. Nitschke M, Umbelino DC. Frutooligossacarídeos: Novos Alimentos Funcionais. *Bol SBCTA*. 2002;1(36).

3. Kimura YO. Alimentos Simbióticos: A combinação de microrganismos probióticos com ingredientes prebióticos representa uma nova oportunidade no desenvolvimento de produtos lácteos saudáveis. *Rev Laticínios*. 2002;22.
4. Oliveira SP. Alimentos Funcionais: Aspectos Relacionados ao Consumo. *Rev Food Ingrid*. 2002;20.
5. Matsubara S. Alimentos Funcionais: Uma tendência que abre perspectivas aos laticínios. *Rev Laticínios*. 2001;6(34):10-8.
6. Belchior F. Lácteos 100 % saudáveis. *Rev Leite e Derivados*. 2003;12(69):30-3.
7. Tamime AY, Robinson RK. *Yogurt Science and Technology*. 3. ed. Washington: CRC Press; 2000.
8. McKinley MC. The nutrition and health benefits of yoghurt. *Int J Dairy Technol*. 2005;58:1-12.
9. Meier R, Lochs H. [Pre- and probiotics]. *Ther Umsch*. 2007;64(3):161-9.
10. Rolim PM, Salgado SM, Padilha VM, Livera AVS, Guerra NB, Andrade SAC. Análise de componentes principais de pães de forma formulados com farinha de yacon (*Smallanthus sonchifolius* (Poepp.) H. Rob.). *Rev Ceres*. 2010;57(1):12-7.
11. Oliveira AFA. *Leites Fermentados e Bebidas Lácteas*. Campinas: Ital; 1997.
12. Mahan LK. *Krause: Alimentos, nutrição e dietoterapia*. 9. ed. São Paulo: Roca; 1998.
13. Madrona GS, Zotarelli MF, Bergamasco R, Branco IG. Estudo do efeito da adição de soro de queijo na qualidade sensorial do doce de leite pastoso. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2009;29(4):826-33.
14. Muñoz AM, Civille GV. The Spectrum descriptive analysis method. In: Hootman RC, editor. *Manual on Descriptive Analysis Testing for Sensory Evaluation*. ASTM Manual Series: MNL 13; 1992; p. 22-34.
15. Stone H, Sidel JL. *Descriptive analysis*. In: Stone H, Sidel JL, editores. *Sensory Evaluation Practices*. 3. ed. Califórnia: Elsevier Academic Press; 1985. p. 248-77.
16. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. Lista das Alegações Aprovadas*. 2005. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm].
17. Ribeiro JA. Estudo químico e bioquímico do yacon (*Smallanthus sonchifolius*) in natura e processado e influência do seu consumo sobre níveis glicêmicos e lipídios fecais de ratos [dissertação de mestrado]. Lavras, MG: Universidade Federal de Lavras; 2008.
18. REIS RC. Iogurte “light” sabor morango: equivalência de doçura, caracterização sensorial e impacto da embalagem na intenção de compra do consumidor [tese de doutorado]. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa; 2007.
19. AOAC. *Official Methods of Analysis of the AOAC International*. 16. ed. Gaithersburg; 1997.
20. Kaneko T, Kudo T, Horikoshi K. Comparison of CD composition produced by chimeric Cgtases. *Agric Biol Chem*. 1990;54(1):197-201.
21. Meilgaard M, Civille GV, Carr BT. The Spectrum™ Descriptive Analysis Method. In: Meilgaard M, Civille GV, Carr BT, editores. *Sensory Evaluation Techniques*. 3. ed. New York: CRC Press; 1999. p. 173-229.
22. *Statistical Analysis System – SAS. User’s procedures guide*. Version 9.1, Cary: SAS Institute; 1989.
23. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria n. 27, de 13 de janeiro de 1998. Regulamento técnico referente à informação nutricional complementar. *Diário Oficial [da] União, Brasília, DF, n. 11E, 1998. p. 4-13*.
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. Carvalho S, Toledo I, Araújo F, Pereira G. Fructanos en raíces tuberosas de yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl.) expuestas al sol y almacenadas bajo condiciones ambientales. *Agro-Ciencia*. 2004;20(1):17-23.
26. Manrique I, Párraga A, Hermann M. Yacon syrup: Principles and processing. Series: Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos andinos: Una década de investigación para el desarrollo (1993-2003). n. 8B. International Potato Center, Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión, Erbacher Foundation, Swiss Agency for Development and Cooperation. Lima; 2005.
27. Asami T, Minamisawa K, Tsuchiya T, Kano K, Hori I, Ohyama T, Kubota M, Sukihashi T. Fluctuations of oligofructan contents in tubers of yacon (*Polymnia sonchifolia*) during growth and storage. *Jpn J Soil Sci Plant Nutr*. 1991;62:621-7.
28. Seminario J, Valderrama M, Manrique I. El yacon: fundamentos para el aprovechamiento de un recurso promisorio. Centro Internacional de la Papa (CIP), Universidad Nacional de Cajamarca, Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación (COSUDE). Lima; 2003.

Desenvolvimento e caracterização de bebida achocolatada à base de extrato hidrossolúvel de quinoa e de arroz

Production and characterization of the quinoa and rice water soluble extract-based chocolate drink

RIALA6/1470

Rafaela Suzuki BENTO, Mônica Regina da Silva SCAPIM, Miriam Carla Bonicontrô AMBROSIO-UGRI*

*Endereço para correspondência: Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Av. Colombo 5790, Bl.13 sala 001, zona 07, Maringá, PR, CEP: 87020-900. Fone: (44) 3011-5092. E-mail: miriamugri@uol.com.br
Recebido: 10.02.2012- Aceito para publicação: 25.05.2012

RESUMO

A busca por alimentos saudáveis e ricos em nutrientes tem crescido nos últimos anos. Outrossim, muitas pessoas e, principalmente, as crianças apresentam intolerância à lactose e restrição ao consumo de glúten e proteínas lácteas. Com o intuito de buscar alternativas para as crianças que têm distúrbios alimentares e pela pouca opção no mercado de bebidas achocolatadas que atendam tais pessoas, foi desenvolvida uma formulação achocolatada isenta de glúten, proteínas lácteas e lactose, preparada de extrato hidrossolúvel de arroz e de quinoa. Foram feitas três formulações (F1, F2 e F3) variando-se as proporções dos dois extratos. A avaliação destas amostras foi efetuada pelas análises química e microbiológica, e o atributo sensorial por meio de escala hedônica estruturada de nove pontos. As formulações não diferiram entre si ($p > 0,05$) nos teores de cinzas e fibras; porém, houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) quanto ao conteúdo proteico, umidade, lipídeos, carboidratos e valor energético. A formulação com maior quantidade de extrato de quinoa (F3) obteve a melhor aprovação no atributo sabor e a melhor nota na intenção de compra do produto. O produto achocolatado desenvolvido na presente investigação atendeu aos padrões microbiológicos exigidos pela legislação, sendo adequado para o consumo humano.

Palavras-chave. alimento funcional, alfarroba, novos produtos, intolerância alimentar.

ABSTRACT

Lately, the search for healthy and nutritionally rich foods has been much growing. In addition, many persons especially children have lactose intolerance and restriction for gluten and milk proteins consumption. Focusing on children who have these kind of eating disorders, this study developed the chocolate drink formulations free of gluten, milk protein and lactose, prepared with water soluble extract from quinoa and rice. Three formulations (F1, F2 and F3) were produced by varying the two extracts proportions. These samples were assessed by chemical and microbiological analyses and the sensory attribute by 9 point-hedonic scale. The formulations did not differ significantly ($p > 0.05$) in ash and fiber contents; however, significant differences ($p \leq 0.05$) in protein, moisture, lipids and carbohydrates contents and in energy value were found. The formulation containing the highest amount of quinoa extract (F3) got the best rating in flavor attribute, and the highest score to the purchase intention. The chocolate drink developed in this study met the microbiological standards required by legislation, being suitable for human consumption.

Keywords. functional food, carob, new products, food intolerance.

INTRODUÇÃO

O interesse dos consumidores por alimentos que, além da função básica de nutrir, promovam efeitos benéficos à saúde, tem crescido nos últimos anos¹. Desta forma, o desenvolvimento de produtos com características especiais é importante devido aos aspectos econômicos e nutricionais dos mesmos.

Neste contexto, destaca-se a quinoa, ou quinua, pseudocereal pertencente à família Amaranthaceae, do gênero *Chenopodium*, originário dos Andes e que tem sido cultivado há milênios e amplamente distribuído em todos os países do mundo². Seu conteúdo proteico é notável e a composição de aminoácidos essenciais, principalmente a lisina, é excelente³. O teor deste aminoácido geralmente é limitado em cereais e, metabolicamente, o seu consumo é associado à melhora da imunidade, da capacidade de aprendizagem e da memória^{2,4}. Sob o ponto de vista nutricional, a proteína da quinoa apresenta qualidade elevada, comparada à caseína do leite⁵, tornando-se uma boa opção para a alimentação de recém-nascidos.

A quinoa apresenta também quantidades elevadas de minerais, como magnésio, zinco, cobre, ferro, manganês e potássio, necessários para as reações metabólicas, transmissão de impulsos nervosos, formação óssea rígida e regulação do equilíbrio de água e sal^{2,5}.

Além disso, este alimento contém uma grande variedade de compostos antioxidantes, como os carotenoides, flavonoides e tocoferóis, que auxiliam na prevenção de doenças inflamatórias, cardiovasculares, diabetes, câncer, e doença de Alzheimer^{6,7}.

Os grãos deste pseudocereal apresentam ainda teores de fibras maiores que os do arroz, trigo e milho, o que auxilia no bom funcionamento do intestino e na redução da absorção de gorduras e açúcares; além da ausência das proteínas formadoras da rede de glúten, um aspecto nutricional interessante para o tratamento da doença celíaca⁴.

Assim, a combinação da quinoa com outro cereal que esteja presente na dieta do consumidor pode ser utilizada na formulação de alimentos para pessoas que necessitem de alimentos isentos de glúten, leite e até mesmo soja. Entre os diversos cereais disponíveis, o arroz tem destaque devido à qualidade da proteína presente neste grão, presença na dieta usual no Brasil e por apresentar sabor suave. Em alguns países orientais, são comercializadas bebidas à base de arroz, conhecidas

como extrato, “leite” ou bebida de arroz, caracterizadas como um produto de sabor suave e levemente adocicado, decorrente da hidrólise do amido em maltose e em outros açúcares, pela ação de enzimas. A tecnologia empregada na sua elaboração é simples, favorecendo seu desenvolvimento em regiões onde a produção de arroz é expressiva, como no Brasil, ampliando e diversificando o consumo deste cereal¹.

O arroz (*Oryza sativa*) é um cereal altamente consumido no Brasil e, por apresentar sabor suave, pode contribuir para a obtenção de bebidas, utilizando seu extrato, com propriedades sensoriais adequadas. É um alimento de grande valor nutricional, altamente energético (contém em torno de 90% de amido), proteínas (7-8%), sais minerais (fósforo, ferro e cálcio) e vitaminas do complexo B. A proteína, de alta qualidade, contém oito aminoácidos essenciais ao homem, estando dispersa no endosplama e no farelo do grão, e apresenta boa digestibilidade. Além disso, o arroz possui um baixo valor de lipídeos. Por ser um alimento isento de glúten e pouco alergênico, o arroz pode ser consumido por pessoas celíacas, utilizado na formulação de alimentos infantis e como fonte de amido⁸.

Para conferir o corpo adequado de uma bebida achocolatada, deve-se utilizar um tipo de goma que apresente característica emulsificante ao produto. A alfarroba é um polissacarídeo que pode ser utilizado como estabilizante, espessante e emulsionante, muito utilizado na elaboração de produtos achocolatados sem alteração no perfil sensorial do produto. A alfarroba é um espessante já utilizado industrialmente, como por exemplo, na elaboração de iogurtes⁹.

A alfarroba é a vagem comestível da alfarrobeira, uma árvore nativa dos países mediterrâneos. Os compostos estimulantes (cafeína e teobromina), encontrados no cacau e considerados como fatores antinutricionais responsáveis por efeitos fisiológicos adversos, não estão presentes na farinha de alfarroba. Devido à sua composição rica em carboidratos de baixo peso molecular, ela apresenta boa solubilidade e é isenta de glúten e lactose¹⁰.

Muitas pessoas apresentam reações alérgicas a algum componente presente nos alimentos, o que pode colocar em risco sua saúde, além de reduzir o número de opções no momento da escolha das matérias-primas que irão compor diariamente sua dieta. A doença celíaca é um tipo bem conhecido de intolerância alimentar associada especificamente a produtos que contêm glúten, presente

no trigo, aveia, centeio e cevada, e que age agressivamente sobre a mucosa do intestino delgado de indivíduos que apresentam a doença, danificando suas vilosidades e prejudicando a absorção de alimentos. Os sintomas mais comuns são: diarreia e desnutrição e, como consequência há perda de peso, podendo apresentar deficiência de vitaminas e minerais^{4,11}.

O tratamento da doença celíaca é basicamente dietético, devendo-se excluir o glúten da alimentação por toda a vida. Após realizá-lo, os sintomas gastrointestinais desaparecem dentro de dias ou semanas, e ocorre o reaparecimento das vilosidades e a recuperação da capacidade de digestão e absorção^{4,11}.

O leite de vaca também desencadeia diversos sintomas alérgicos. Atualmente, a alergia ao leite ocorre entre 1,9-7,5% da população mundial, principalmente em crianças e é observada nos primeiros dois a três meses de idade, desaparecendo quase sempre após o quarto ano de vida⁸. Após a confirmação do diagnóstico de alergia ao leite de vaca, a conduta é introduzir uma dieta com sua exclusão e de seus derivados, além daqueles alimentos nos quais o composto alergênico faça parte da sua composição¹².

Os extratos vegetais podem ser utilizados como substitutos do leite de vaca, sendo uma alternativa viável, em razão dos seus valores nutricionais, bem como ao baixo custo de produção. Algumas opções de extratos vegetais são: o “leite” de arroz integral ou de quirera de arroz e o extrato hidrossolúvel de soja.

A utilização do arroz para obtenção de extratos na elaboração de bebidas, em substituição à soja, apresenta algumas vantagens como: hipoalergenicidade, agregar valor a este alimento e não apresentar sabor desagradável comum em derivados de soja⁸.

O crescente consumo de extratos de soja em substituição ao leite de vaca tem impulsionado a produção de bebidas à base de soja e frutas, mas no mercado a oferta de bebidas isenta de soja é escassa. Assim, o objetivo desta pesquisa foi desenvolver uma bebida achocolatada preparada a partir de extratos hidrossolúveis de quinoa e de arroz, destinada especialmente a crianças, indivíduos celíacos e intolerantes à lactose.

MATERIAIS E MÉTODOS

A preparação das amostras de bebida achocolatada foi realizada no Laboratório de Tecnologia de Cereais do Curso de Engenharia de Alimentos,

Departamento de Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá.

No Laboratório de Química de Alimentos, do Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá, foi determinada a composição química da bebida.

As análises microbiológicas de coliformes totais e termotolerantes e *Bacillus cereus* foram feitas no Laboratório de Microbiologia e Microscopia de Alimentos do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá.

A análise sensorial foi conduzida no Laboratório de Análise Sensorial do Curso de Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá.

Matéria-prima

O propósito desta pesquisa foi a elaboração de uma bebida achocolatada. Como o cacau em pó utilizado não era lecitinado, o mesmo não conferiu à bebida o corpo adequado, foi necessária a utilização de um espessante, daí o uso da alfarroba na elaboração do produto em questão.

Desta forma, os ingredientes (arroz, quinoa, alfarroba, sal, óleo de girassol e açúcar) utilizados na elaboração da bebida foram adquiridos no comércio local da cidade de Maringá (PR), exceto o cacau em pó alcalinizado – BR 1300 LINHA AZUL, fornecido pela Indústria Brasileira de Cacau e Gêneros Alimentícios Ltda., localizada na cidade de Rio das Pedras (SP).

Produção do extrato hidrossolúvel de arroz e de quinoa

O processo para a obtenção dos extratos de arroz e de quinoa foi baseado no trabalho de Soares Junior et al.⁸.

Inicialmente, os grãos de arroz foram lavados em água potável corrente, a fim de eliminar possíveis sujidades físicas. Na sequência, em uma panela de aço inox, foram adicionados o arroz e a água (na proporção de 1:4) e realizado o cozimento durante um tempo médio de 17 minutos. Após a pesagem do arroz cozido, foi feita sua desintegração em liquidificador na proporção de 1 (uma) parte do arroz cozido para 2 (duas) partes de água, durante 3 minutos. O homogeneizado resultante foi filtrado em uma peneira de aço inox, obtendo-se, assim, o extrato hidrossolúvel de arroz.

Para a produção do extrato de quinoa, foi realizado o mesmo procedimento descrito acima, porém, na etapa

do cozimento, a quinoa e a água foram adicionadas na proporção de 1:8.

Produção da bebida achocolatada

As três formulações estudadas (F1, F2, F3) foram definidas em função de testes preliminares, variando as quantidades de arroz e de quinoa.

Na Tabela 1, são apresentadas as proporções dos ingredientes utilizados para as formulações avaliadas neste estudo.

Tabela 1. Formulações das bebidas com diferentes proporções de arroz e de quinoa

Ingredientes (%)	F1	F2	F3
Arroz	10	7,5	5
Quinoa	5	7,5	10
Cacau	13,3	13,3	13,3
Alfarroba	10	10	10
Sal	0,8	0,8	0,8
Óleo de Girassol	6,7	6,7	6,7
Açúcar	33,3	33,3	33,3
Água	20,9	20,9	20,9

Para o preparo da bebida, os extratos de arroz e de quinoa e os demais ingredientes foram homogeneizados em liquidificador, durante 3 minutos, obtendo-se a bebida achocolatada. A bebida foi pasteurizada a 75 °C durante 15 minutos, envasada a quente em garrafas de vidro, previamente esterilizadas em autoclave a 121 °C por 30 minutos, e mantida sob refrigeração a uma temperatura de 5 ± 1 °C até a análise sensorial.

Análises químicas

A composição química das três formulações do achocolatado (umidade, cinzas e proteína bruta) foi obtida conforme técnicas sugeridas pela *Association of Official Analytical Chemists* – AOAC¹³. A matéria graxa foi determinada segundo metodologia de Bligh e Dyer¹⁴ e o teor de fibra bruta foi obtido conforme metodologia da *Australian Official Analytical Chemists* – AOAC¹⁵.

As análises foram realizadas em triplicata no Laboratório de Química de Alimentos, do Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá.

Análises microbiológicas

As análises microbiológicas foram realizadas 24 horas após o processamento das amostras, sendo que as mesmas foram mantidas sob refrigeração a uma temperatura de 5 ± 1 °C até o início das análises.

Estas análises foram feitas de acordo com a metodologia do FDA¹⁶. Foram realizadas análises para o número mais provável (NMP) de coliformes totais/mL e de coliformes termotolerantes/mL e contagem de *Bacillus cereus* em UFC/mL, no Laboratório de Microbiologia e Microscopia de Alimentos do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá.

Análise sensorial

A avaliação sensorial foi conduzida no Laboratório de Análise Sensorial do Curso de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Maringá em cabines individuais, com 50 provadores não treinados, de ambos os sexos. Amostras de cada formulação foram servidas em copos plásticos de coloração branca, codificados com números aleatórios de três dígitos. Os atributos aparência, aroma, textura e sabor foram avaliados utilizando escala hedônica de 9 pontos, variando desde “desgostei muitíssimo” a “gostei muitíssimo”. Na mesma ficha, foi incluída uma escala para avaliar a intenção de compra do produto pelos provadores.

Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada submetendo-se os resultados à Análise de Variância (Anova) e ao teste de comparação de médias de Tukey com significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análises químicas

Os teores médios de umidade, cinzas, proteína bruta, lipídeos, fibra bruta, carboidratos (todos em base úmida) e do valor energético das três formulações de bebida com diferentes proporções de extrato de arroz e de quinoa estão apresentados na Tabela 2.

Segundo a Tabela 2, o maior teor de carboidrato foi encontrado para a formulação F1, uma vez que F2 e F3 não diferiram significativamente. Os valores apresentados são maiores que o citado na literatura para o extrato de quinoa, que foi de 7,13%¹⁸. Tal fato pode ser explicado pela presença do extrato de arroz na composição das bebidas avaliadas, pois os carboidratos são os principais constituintes deste cereal.

Segundo Suzuki¹⁹, um achocolatado comum possui teor de lipídeos de 3,07 g/100 g de produto. Este valor é superior ao encontrado para as formulações

desenvolvidas, pois o leite possui maior quantidade deste componente. Entretanto, as três formulações apresentaram conteúdo lipídico superior ao relatado por Ordóñez¹⁸, igual a 0,49 g/100 g para o extrato de quinoa.

Tabela 2. Composição química (g/100 g de produto) e valor energético (Kcal/100 g de produto) das três formulações do achocolatado

	F1	F2	F3
Umidade	80,79 ^b ± 0,011	84,20 ^a ± 0,085	83,48 ^a ± 0,015
Cinzas	0,31 ^a ± 0,019	0,25 ^a ± 0,018	0,27 ^a ± 0,030
Proteína bruta	1,14 ^a ± 0,057	0,99 ^{ab} ± 0,164	0,85 ^b ± 0,061
Lipídeos	1,18 ^a ± 0,014	0,79 ^b ± 0,084	1,07 ^a ± 0,028
Fibra bruta	0,51 ^a ± 0,031	0,49 ^a ± 0,057	0,42 ^a ± 0,054
Carboidratos**	16,58 ^a ± 0,042	13,77 ^b ± 0,194	14,33 ^b ± 0,055
Energia***	83,52 ^a ± 0,048	68,08 ^c ± 0,394	72,07 ^b ± 0,471

* Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$).

** Calculados por diferença [Carboidratos = 100-(umidade + cinzas + proteínas + lipídeos)].

*** Estimada por meio de coeficientes de conversão de Atwater: 4 Kcal/g para proteínas e carboidratos e 9 Kcal/g para lipídeos¹⁷.

A Ingestão Diária Recomendada (IDR – Dietary Reference Intakes) de proteínas é de 19g, para crianças de 4 a 8 anos e de ambos os sexos^{20,21}. Segundo NAP^{20,21}, o nível de consumo diário de proteínas pode ser calculado considerando que 19 g seria 100% de ingestão diária; para as três formulações da bebida, tem-se um teor médio de proteínas de 0,991 g/100 g (Tabela 2). Desta forma, 100 g da bebida elaborada neste estudo apresentam 5,22% do teor de proteínas necessárias diariamente para crianças entre 4 e 8 anos de idade. Segundo CASTRO et al.⁴, a quinoa é considerada fonte de proteína por apresentar qualidade protéica comparável à caseína do leite.

As formulações F2 e F3, como apresentado na Tabela 2, apresentaram os maiores teores de umidade e diferiram da formulação F1 ($p \leq 0,05$). Em relação às cinzas, as três amostras não diferiram significativamente entre si ($p > 0,05$). Os valores de umidade e cinzas são próximos aos encontrados por Ordóñez¹⁸ para o extrato de quinoa, 90,96% e 0,26%, respectivamente.

De acordo com Soares Junior et al.⁸, o teor de proteína no arroz pode variar de 7% a 8% e Lopes et al.² avaliou a proteína na farinha de quinoa e determinou cerca de 11,5%. Na presente pesquisa, como pode ser observado na Tabela 2, a formulação que continha o menor percentual de quinoa (F1) apresentou um teor de proteína superior à amostra (F3), que continha maior teor de quinoa. Este pode ser explicado devido às condições de processamento da bebida em

laboratório, o que dificultou uma boa homogeneização das amostras.

Jaekel et al.¹ avaliaram uma bebida à base de extrato de soja e de arroz, em que a proporção de soja e arroz corresponde, respectivamente, à mesma proporção de quinoa e arroz da formulação 3 do presente estudo. Eles relataram que o teor de fibra era de 0,31%, enquanto que, neste estudo, o teor de fibras encontrado para F3 foi de 0,42%. Este resultado mostra que a quinoa fornece mais fibras do que a soja, podendo favorecer ainda mais o bom funcionamento do intestino, reduzindo a absorção de gorduras e açúcares, entre outros.

Análises microbiológicas

Na Tabela 3, estão expressos os resultados das análises microbiológicas para a avaliação das condições higiênico-sanitárias do achocolatado. No Brasil, não há legislação específica para bebida à base de extrato de arroz e de quinoa, portanto, os valores encontrados foram comparados com os padrões exigidos para bebida à base de extrato de soja, de acordo com a Resolução – RDC n. 12, de 2 de janeiro de 2001²².

Segundo os resultados apresentados na Tabela 3, a bebida desenvolvida neste estudo encontrava-se adequada às condições de segurança alimentar e de consumo, não representando riscos à saúde do consumidor.

Tabela 3. Resultados microbiológicos da bebida a base de extrato de quinoa e de arroz

Análise microbiológica	Achocolatado	Legislação
Coliformes a 35 °C	< 0,3 (NMP/mL)	< 10 (NMP/mL)
Coliformes a 45 °C	< 0,3 (NMP/mL)	< 10 (NMP/mL)
Bacillus cereus	< 10 (UFC/mL)	< 5 × 10 ² (UFC/mL)

Análise sensorial

As médias obtidas para os atributos sensoriais de aparência, aroma, textura e sabor das formulações estudadas estão dispostas na Tabela 4.

Tabela 4. Valores médios das notas atribuídas pelos provadores para as características sensoriais

Atributos sensoriais	F1	F2	F3
Aparência	7,12 ^a	6,36 ^b	6,36 ^b
Aroma	6,40 ^a	5,94 ^a	6,32 ^a
Textura	6,72 ^a	6,48 ^a	6,48 ^a
Sabor	6,16 ^a	6,52 ^a	6,68 ^a

* Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$).

A análise de variância mostrou que F1 obteve a média mais alta em relação à aparência (média 7,12), indicando que os provadores gostaram regularmente, de acordo com a escala utilizada. Para o mesmo atributo, F2 e F3 não diferiram entre si ($p > 0,05$).

Na Tabela 4, também se pode observar que não existe diferença significativa entre as três formulações estudadas ($p > 0,05$) com relação às características de aroma, textura e sabor. As notas encontradas não foram muito altas (variando de 5,94 a 7,12), indicando que o produto ainda precisa de novos estudos quanto ao grau de homogeneização e formulação para que obtenha uma melhor avaliação sensorial.

A formulação com maior proporção de extrato de arroz (F1) se apresentou mais viscosa e obteve maior média de textura (6,72), sendo que esta nota indica que os provadores gostaram ligeiramente.

Quanto ao atributo sabor, devido ao sabor suave da quinoa, a formulação F3 apresentou a média mais alta (6,68) por ter a maior quantidade de quinoa e a menor de arroz.

Os provadores expressaram sua intenção de compra em relação ao produto e os resultados estão representados na Figura 1.

Na Figura 1, pode-se observar que as notas atribuídas pelos provadores indicaram que a maioria deles talvez comprasse as três formulações do achocolatado. A formulação 3, que obteve a média mais alta para o atributo sabor, também apresentou o maior número de provadores que certamente a comprariam (30%). A formulação 1 apresentou o maior índice de rejeição em relação às demais, 30% dos avaliadores certamente não comprariam.

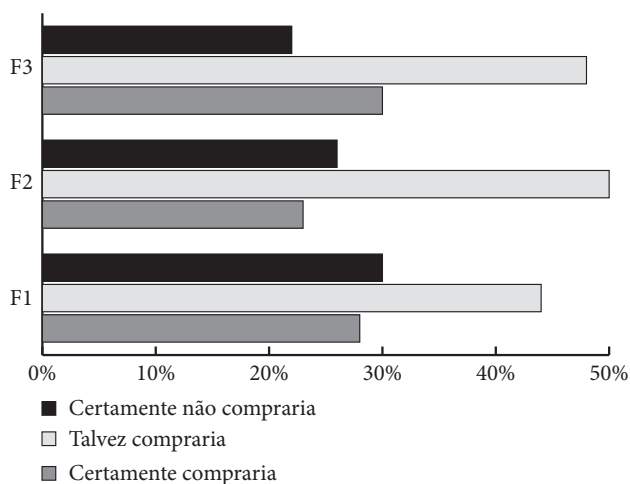


Figura 1. Teste de intenção de compra

CONCLUSÃO

A bebida formulada com 10% de extrato de arroz e 5% de extrato de quinoa (F1) destacou-se quanto ao seu teor de minerais, lipídeos, proteínas, fibras e carboidratos. A formulação F1 também apresentou as melhores características sensoriais, obtendo as maiores notas para os atributos aparência, aroma e textura, mas apresentou a pior nota com relação aos consumidores que não comprariam.

Com os resultados obtidos, pode-se concluir que o achocolatado elaborado a partir do extrato de arroz e de quinoa pode vir a ser uma alternativa viável para a alimentação de pessoas de todas as idades, inclusive celíacos, intolerantes à lactose e alérgicos às proteínas do leite. Além disso, pode proporcionar benefícios à saúde dos consumidores devido às propriedades nutricionais de seus constituintes, entretanto, a formulação ainda precisa ser melhorada para uma maior aceitação do mercado consumidor.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a colaboração da Indústria Brasileira de Cacau e Gêneros Alimentícios Ltda., localizada em Rio das Pedras (SP), pelo fornecimento do cacau em pó alcalinizado.

REFERÊNCIAS

1. Jaekel LZ, Rodrigues RS, Silva AP. Avaliação físico-química e sensorial de bebidas com diferentes proporções de extratos de soja e de arroz. *Cienc Tecnol Aliment*. 2010;30(2):342-8.
2. Lopes CO, Dessimoni GV, Costa da Silva M, Vieira G, Pinto NAVD. Aproveitamento, composição nutricional e antinutricional da farinha de quinoa (*Chenopodium quinoa*). *Alim Nutr*. 2009;20(4):669-75.
3. Repo-Carrasco-Valencia RA, Serna LA. Quinoa (*Chenopodium quinoa*, Willd.) as a source of dietary fiber and other functional components. *Cienc Tecnol Aliment*. 2011;31(1):225-30.
4. Miranda M, Vega-Gálvez A, López J, Parada G, Sanders M, Aranda M, et al. Impact of air-drying temperature on nutritional properties, total phenolic content and antioxidant capacity of quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* Willd). *Ind Crops and Products*. 2010;32: 258-63.
5. Castro LIA, Vila Real CM, Pires ISC, Pires CV, Pinto NAVD, Miranda LS, et al. Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd): digestibilidade *in vitro*, desenvolvimento e análise sensorial de preparações destinadas a pacientes celíacos. *Alim Nutr*. 2007;18(4):413-9.
6. Hirose Y, Fujita T, Ishii T, Ueno N. Antioxidative properties and flavonoid composition of *Chenopodium quinoa* seeds cultivated in Japan. *Food Chem*. 2010;119:1300-6.

7. Dini I, Tenore GC, Dini A. Antioxidant compound contents and antioxidant activity before and after cooking in sweet and bitter *Chenopodium quinoa* seeds. *LWT – Food Sci Technol*. 2010;43:447-51.
8. Soares Junior MS, Bassinelo PZ, Calliari M, Velasco P, Reis RC, Carvalho WT. Bebidas saborizadas obtidas de extratos de quirera de arroz, de arroz integral e de soja. *Ciênc Agrotec*. 2010;34(2):407-13.
9. Mathias TRS, Carvalho Junior IC, Carvalho CWP, Sérvulo EFC. Rheological characterization of coffee – flavored yogurt with different types of thickener. *Alim Nutr*. 2011;22(4):521-9.
10. Medeiros ML, Lannes SCS. Propriedades físicas de substitutos do cacau. *Cienc Tecnol Aliment*. 2010;30(1):243-53.
11. Borges JTS, Ascheri JLR, Ascheri DR, Nascimento RE, Freitas AS. Propriedades de cozimento e caracterização físico-química de macarrão pré-cozido à base de farinha integral de quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) e de farinha de arroz (*Oryza sativa*, L) polido por extrusão termoplástica. *B CEPPA*. 2003;21(2):303-22.
12. Binsfeld BL, Pastorino AC, Castro APBM, Yonamine GH, Gushken AKF, Jacob, CMA. Conhecimento da rotulagem de produtos industrializados por familiares de pacientes com alergia a leite de vaca. *Rev Paul Pediatr*. 2009;27(3):296-302.
13. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). *Official Methods of Analysis*. 16. ed. Washington, DC; 1995.
14. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*. 1959;37:911-7.
15. Australian Official Analytical Chemists. *Official methods of analysis of the AOAC International*. 17. ed. Arlington; 2002. cap. 37.
16. US Food and Drug Administration (FDA). *Bacteriological Analytical Manual*. 8. ed. 1995.
17. Capriles VD, Soares RAM, Arêas JAG. Development and assessment of acceptability and nutritional properties of a light snack. *Cienc Tecnol Aliment*. 2007;27(3):562-6.
18. Ordóñez SAP. *Elaboración de Leche de Quinoa (Chenopodium quinoa, Willd)* [projeto para conclusão de curso]. Quito: Escuela Politécnica Nacional; 2011.
19. Suzuki RM. *Composição química e quantificação de ácidos graxos em chocolates, achocolatados em pó, bebidas achocolatadas e sorvetes de chocolate* [tese de doutorado]. Maringá, PR: Universidade Estadual de Maringá; 2009.
20. United States Department of Agriculture (USDA). *Dietary Reference Intakes: Macronutrientes*. [acesso 2011 jun 19]. Disponível em: [http://fnic.nal.usda.gov/nal_display/index.php?info_center=4&tax_level=2&tax_subject=256&topic_id=1342].
21. The National Academies Press (NAP). *Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids (2002/2005)*. [acesso 2011 jun 19]. Disponível em: [<http://www.iom.edu/Global/News%20Announcements/~media/C5CD2DD>]
22. 7840544979A549EC47E56A02B.ashx].
23. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. Resolução RDC n. 12, de 2 de janeiro de 2001. [acesso 2011 jun 19]. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm].

Aceitabilidade sensorial de biscoito tipo cracker adicionado de farinha de casca de limão siciliano (*Citrus limon* L. Burm.)

Sensory acceptability of cream cracker prepared by adding sicilian lemon peel (*Citrus limon* L. Burm.) flour

RIALA6/1471

Ana Cláudia THOMAZ¹, Gabriela Regina da SILVA¹, Daiana NOVELLO^{1*}, Herta Stutz DALLA SANTA², Melissa dos Santos RAYMUNDO², Mateus Gatti BATISTA³

*Endereço para correspondência: 1Setor de Ciências da Saúde, Departamento de Nutrição, Universidade Estadual do Centro-Oeste (Unicentro), Rua Capitão Rocha, 2380, Guarapuava, PR. Tel.: (42) 9988-3411. E-mail: nutridai@hotmail.com

²Setor de Ciências e Tecnologia, Departamento de Engenharia de Alimentos, Unicentro, Guarapuava, PR

³Setor de Saúde, Faculdade Campo Real, Guarapuava, PR

Recebido: 19.11.2011 - Aceito para publicação: 08.05.2012

RESUMO

Este estudo avaliou a aceitabilidade sensorial de biscoito tipo *cracker* enriquecido com farinha da casca do limão siciliano (*Citrus limon* L. Burm.), determinando-se a composição centesimal da formulação de biscoito mais aceita. Utilizaram-se cinco formulações de biscoitos contendo diferentes concentrações de farinha de casca de limão siciliano, sendo F1 (padrão), F2 (1%), F3 (2%), F4 (3%) e F5 (4%). A análise sensorial avaliou os atributos: aparência, aroma, sabor, textura e característica crocante. Ademais, foram realizadas análises da composição centesimal. Sensorialmente, as formulações padrão e adicionada de 1% de farinha de casca de limão siciliano foram as mais aceitas, principalmente nos atributos sabor, aceitação global e intenção de compra. Por meio de análise química do produto verificou-se que os teores de fibra bruta, proteínas, cinzas e umidade e o valor calórico foram maiores na formulação F2 do que em F1. O desenvolvimento dos produtos comprovou que a adição de até 1% de farinha de casca de limão siciliano em biscoitos tipo *cracker* foi o mais aceito pelos provadores entre as demais formulações contendo este ingrediente, com aceitação sensorial semelhante ao produto convencional.

Palavras-chave. análise sensorial, fruta cítrica, aproveitamento integral.

ABSTRACT

The study aimed at assessing the sensory acceptability of cream cracker enriched with the sicilian lemon peel (*Citrus limon* L. Burm.) flour, and the chemical composition of the mostly accepted cream cracker formulation was determined. Five cream cracker formulations were prepared by adding different concentration of lemon peel flour, being F1 (standard), F2 (1%), F3 (2%), F4 (3%) and F5 (4%). The sensory analysis evaluated the appearance, aroma, flavor, texture and crispness attributes. Also, centesimal composition analysis was carried out. On the sensorial aspects, the standard and the formulation containing 1% of lemon peel flour were the mostly accepted, especially as for flavor, overall acceptability and purchase intention attributes. By means of chemical analysis, the F2 product showed higher fiber, protein, ash and moisture contents and the higher calorific value than in F1 formulation. These developed products proved that the cream cracker samples containing up to 1% of Sicilian lemon peel flour were more accepted by the tasters than the other formulations, and its sensory acceptance was similar to the regular cream cracker.

Keywords. sensory analysis, citric fruit, total utilization.

INTRODUÇÃO

Atualmente, o Brasil é considerado um dos maiores produtores e exportadores mundiais de alimentos. Entretanto, o país ainda apresenta elevado índice de desperdício, uma vez que 35% da produção agrícola não são aproveitadas, o que seria suficiente para alimentar dez milhões de brasileiros¹. Estima-se que cerca de 30% a 40% de alguns produtos, como frutas, verduras, folhas e talos, sejam desperdiçados.

Os principais motivos que reduzem a ingestão das partes não convencionais dos alimentos são o desconhecimento dos princípios nutritivos e, também, a importância do aproveitamento integral dos alimentos, o que eleva o desperdício pela população^{2,3}.

Sabe-se que as folhas, talos e cascas podem ser mais nutritivos que a parte comestível usualmente, uma vez que estão presentes em maiores quantidades as fibras, vitaminas e minerais. Desta forma, podem enriquecer a alimentação, contribuindo para o maior valor nutricional do alimento⁴.

No Brasil, nota-se o aumento da produção de frutas cítricas, uma vez que a tendência mundial é para um maior consumo de produtos naturais⁵. Na indústria, durante o processamento de citros para sucos naturais ou concentrados, as cascas são os principais subprodutos e, se não tratadas, tornam-se resíduos e possível fonte de poluição ambiental, além de favorecer o desperdício⁶.

Dentre as frutas cítricas utilizadas na fabricação de sucos naturais e concentrados, destaca-se o limão siciliano (*Citrus limon* L. Burm.), de cor amarela, casca grossa e superfície levemente rugosa⁷. Na sua casca, estão presentes substâncias que contribuem para a saúde, como os flavonoides, os hidroxicinâmicos e os carotenoides. Todos estes se compostos se encontram em níveis mais elevados na casca do que na polpa da fruta⁸.

Ainda na casca dos alimentos podem-se encontrar as fibras alimentares (FA), constituídas de polissacarídeos, lignina, celulose e hemicelulose⁹. Evidências indicam que a pectina, um polissacarídeo estrutural, funciona como um agente hidratante e material de cimentação para a rede de celulose, além de múltiplas atividades biológicas, incluindo o controle de glicemia e colesterol¹⁰. As fibras também exercem importante papel em relação à manutenção de peso e redução do risco de obesidade¹¹.

Uma alternativa para o aproveitamento de alimentos é o desenvolvimento de produtos de panificação, como biscoitos, pães e massas alimentícias, adicionados

de farinhas de cascas de frutas para o aproveitamento integral, ampliando assim a oferta de novos produtos com alto teor de fibra, tanto para os consumidores saudáveis, quanto para aqueles que apresentam algumas patologias (constipação intestinal, alto nível de colesterol, obesidade, entre outras)¹².

Observa-se que o biscoito tipo *cracker* é bastante aceito pela população em geral, pois possui poder atrativo, além de ser muito utilizado em recomendações dietéticas, e de ser um produto fácil de ser enriquecido¹³.

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi verificar a aceitabilidade sensorial de biscoito tipo *cracker* enriquecido com farinha da casca de limão siciliano (*Citrus limon* L. Burm.) e determinar a composição centesimal do biscoito mais aceito.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção da farinha de limão

Os limões sicilianos foram adquiridos no Mercado Municipal de Curitiba (PR). Para a obtenção da farinha, os limões foram higienizados em água corrente e cortados ao meio. O suco dos limões foi extraído com o auxílio de um espremedor de frutas (NKS[®], Brasil). O bagaço foi retirado e as cascas usadas integralmente (epicarpo, pericarpo e endocarpo), foram cortadas em quatro partes com auxílio de uma faca. As cascas foram secas a 60 °C em estufa com circulação forçada de ar (Nova Ética[®], Brasil) por 24 horas, sendo, em seguida, trituradas em processador (Cemaf[®], Brasil). A farinha resultante do processo foi passada em peneira com abertura de 1 mm/16 mesh (Bertel[®], Brasil).

Formulação do biscoito

Foram elaboradas cinco formulações de biscoitos tipo *cracker*, sendo: F1 = padrão, sem adição de farinha de casca de limão; e F2, F3, F4 e F5, adicionadas de farinha de casca de limão siciliano a 1%, 2%, 3% e 4%, respectivamente. Estas porcentagens foram definidas após realização de testes preliminares no produto. Na Tabela 1, podem ser verificadas as formulações dos biscoitos tipo *cracker*, adicionados de casca de limão siciliano.

As formulações foram preparadas, individualmente, no Laboratório de Técnica Dietética do Departamento de Nutrição da Unicentro, Guarapuava (PR). Primeiramente, os ingredientes da esponja foram misturados, amassados e deixados em descanso para

Tabela 1. Ingredientes das formulações de biscoitos tipo *cracker* padrão e adicionados de 1, 2, 3 e 4% de farinha de casca de limão siciliano

Ingredientes	Formulações				
	F1	F2	F3	F4	F5
Esponja					
Farinha de trigo (%)*	45,50	45,00	44,50	44,00	43,50
Flocos de batata (%)*	9,25	9,25	9,25	9,25	9,25
Amido de milho (%)*	6,50	6,50	6,50	6,50	6,50
Fécula de mandioca (%)*	3,25	3,25	3,25	3,25	3,25
Água (%)	27,60	27,60	27,60	27,60	27,60
Óleo de milho (%)	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00
Fermento biológico (%)	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
Farinha de casca de limão siciliano (%)*	0,00	0,50	1,00	1,50	2,00
Massa					
Farinha de trigo (%)*	24,50	24,00	23,50	23,00	22,50
Flocos de batata (%)*	5,75	5,75	5,75	5,75	5,75
Amido de milho (%)*	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50
Fécula de mandioca (%)*	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75
Açúcar (%)	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Sal (%)	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Bicarbonato de sódio (%)	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60
Lecitina de soja (%)	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Farinha de casca de limão siciliano (%)*	0,00	0,50	1,00	1,50	2,00

F1: Formulação padrão; F2: formulação adicionada com 1% de farinha de casca de limão; F3: formulação adicionada com 2% de farinha de casca de limão; F4: formulação adicionada com 3% farinha de casca de limão; F5: formulação adicionada de 4% farinha de casca de limão.

*A soma destes ingredientes totaliza 100%.

fermentação durante 7 horas. Em seguida, o restante dos ingredientes foi misturado e deixado em descanso durante 6 horas. A massa resultante foi laminada, com auxílio de um rolo manual, e cortada em quadrados de 2 × 2 cm. Os mesmos foram dispostos em assadeiras e deixados em descanso durante 30 minutos. Logo após, foram assados em forno (Dako, Brasil) a 140 °C durante 20 minutos.

Análise sensorial

A avaliação sensorial foi realizada no Laboratório de Análise Sensorial, do Departamento de Engenharia de Alimentos da Unicentro, em cabines individuais e com iluminação de cor branca.

Participaram da pesquisa 60 provadores não treinados¹⁴, sendo estudantes e funcionários do campus Cedeteg da Unicentro em Guarapuava (PR), de ambos os sexos, com idade entre 18 e 70 anos.

Pelos testes sensoriais dos produtos foram avaliados os atributos: aparência, aroma, sabor, textura e crocância. Os provadores avaliaram a aceitação das amostras por meio de escala hedônica estruturada de 9 pontos (1 = desgostei muitíssimo, 9 = gostei muitíssimo) segundo Dutcosky¹⁵. Foram aplicadas também, questões de aceitação global e intenção de compra analisadas por meio de dois pontos

específicos entre “*sim*” compraria a amostra e “*não*”, não compraria a amostra, como sugerido por Moskowitz¹⁶.

Cada julgador recebeu uma porção de cada amostra (dois biscoitos, aproximadamente 10 g), em copos plásticos brancos codificados com números de três dígitos, de forma casualizada e balanceada, acompanhados de um copo de água para realização do branco entre as amostras. As formulações foram oferecidas aos julgadores de forma monádica sequencial.

Análise da composição centesimal

A análise da composição centesimal foi realizada no Laboratório de Análise de Alimentos do Departamento de Engenharia de Alimentos da Unicentro, em Guarapuava (PR). As seguintes determinações químicas foram realizadas, em triplicata, na farinha das cascas de limão siciliano, no biscoito padrão e na formulação do biscoito com maior teor de farinha das cascas de limão siciliano e com aceitação semelhante a padrão:

Umidade

Foi determinada em estufa a 105 °C até o peso constante, segundo o método gravimétrico nº 920.151 da AOAC (1984)¹⁷.

Cinzas

Foram analisadas pelo método gravimétrico nº 940.26 da AOAC¹⁷.

Lipídios totais

Foi utilizado o método de extração a frio de Bligh e Dyer¹⁸.

Proteínas

Foi realizada por meio da avaliação do nitrogênio total da amostra, em triplicata, pelo método Kjeldahl determinado ao nível semimicro¹⁷. Utilizou-se o fator de conversão de nitrogênio para proteína de 6,25.

Fibra bruta

Seguiu-se o método nº 920.86 da AOAC¹⁷, utilizou-se extração a quente com H₂SO₄ a 1,25% p/v e NaOH 1,25% p/v.

Carboidratos

A determinação de carboidratos (incluindo fibra bruta) dos produtos foi realizada por meio de cálculo teórico (por diferença) nos resultados das triplicatas, conforme fórmula abaixo:

$$\% \text{ Carboidratos} = 100 - (\% \text{ umidade} + \% \text{ proteína} + \% \text{ lipídios} + \% \text{ cinzas})$$

Valor calórico

O total de calorias (kcal) foi calculado em relação a 100 g da amostra, utilizando os valores de Atwater (ou calor de combustão) para gordura (9 kcal/g), proteína (4,02 kcal/g) e carboidratos (3,87 kcal/g)¹⁹.

Questões éticas

Esta pesquisa teve seu projeto avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual do Centro-Oeste – Unicentro (PR0 (Parecer nº 107/2011)). Entretanto, como critérios de exclusão foram considerados os seguintes fatores: possuir alergia a algum ingrediente utilizado na elaboração dos biscoitos, possuir idade menor que 18 anos, não ser aluno ou funcionário do campus em questão e as pessoas que não assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Análise estatística

Os dados foram analisados com auxílio do *software* Statgraphics® Plus, versão 5.1, através da análise de variância (ANOVA), sendo que a comparação de médias foi realizada pelo teste de médias de Tukey e Qui-quadrado de McNemar, todos avaliados com nível de 5% de significância²⁰.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise sensorial

A Tabela 2 apresenta a aceitação sensorial dos biscoitos tipo *cracker* padrão e enriquecidos com 1%, 2%, 3% e 4% de farinha de casca de limão.

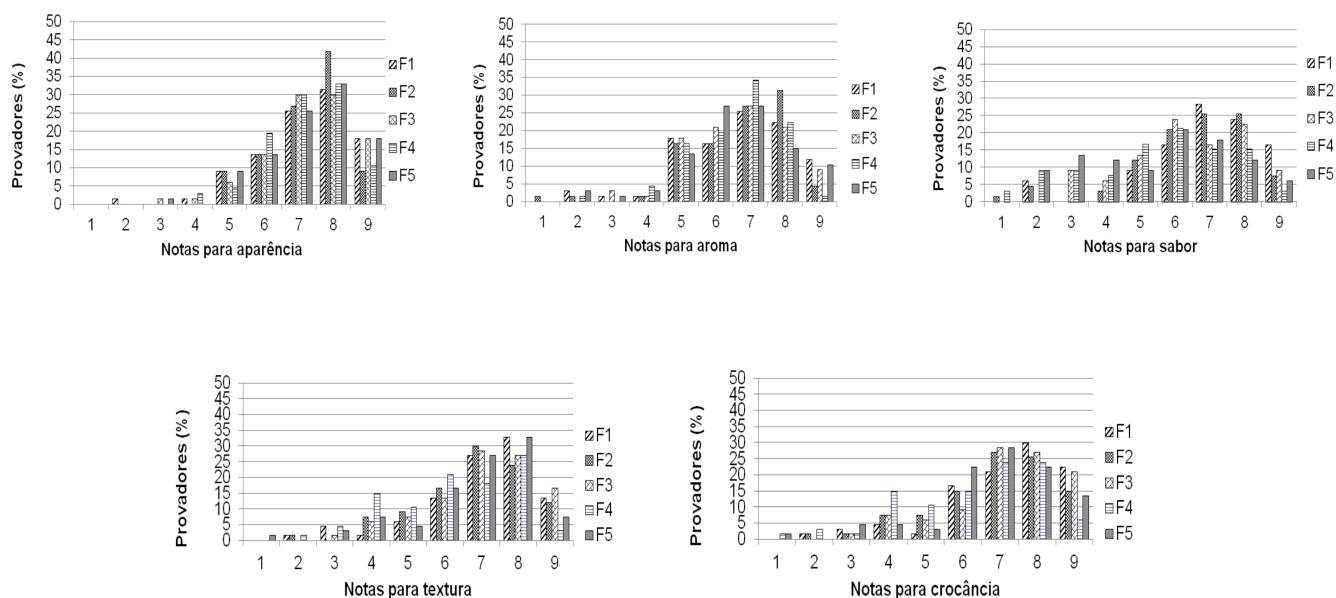
Na Tabela 2, pode-se perceber que os atributos “aparência” e “aroma” não apresentaram diferenças significativas entre as amostras, igualmente aos resultados encontrados por Mauro, Silva e Freitas²¹, quando estudaram diferentes formulações de *cookies* contendo farinha de talo de couve e de espinafre.

Para o atributo “sabor”, as formulações F1 e F2 tiveram maiores notas que F3, F4 e F5. No atributo

Tabela 2. Aceitação sensorial dos biscoitos tipo *cracker* padrão e enriquecidos com 1, 2, 3 e 4% de farinha de casca de limão

Amostras/ Atributos	F1 Média ± DP	F2 Média ± DP	F3 Média ± DP	F4 Média ± DP	F5 Média ± DP
Aparência	7,24 ± 1,42 ^a	7,28 ± 1,10 ^a	7,30 ± 1,30 ^a	7,16 ± 1,18 ^a	7,31 ± 1,31 ^a
Aroma	6,69 ± 1,63 ^a	6,70 ± 1,52 ^a	6,66 ± 1,42 ^a	6,52 ± 1,31 ^a	6,52 ± 1,56 ^a
Sabor	6,93 ± 1,72 ^a	6,55 ± 1,73 ^a	6,15 ± 1,72 ^b	5,48 ± 2,08 ^b	5,51 ± 2,06 ^b
Textura	7,22 ± 1,60 ^a	6,90 ± 1,62 ^{ab}	7,20 ± 1,50 ^a	6,30 ± 1,80 ^b	6,81 ± 1,66 ^{ab}
Crocância	7,04 ± 1,60 ^a	6,84 ± 1,51 ^{ab}	7,10 ± 1,50 ^a	6,20 ± 1,70 ^b	6,79 ± 1,63 ^{ab}
Aceitação Global Positiva (sim) (%)**	76,12 ^a	76,12 ^a	65,67 ^b	35,82 ^b	47,78 ^b
Intenção de Compra Positiva (sim) (%)**	67,16 ^a	67,16 ^a	57,70 ^b	34,33 ^b	41,79 ^b

*Letras diferentes na linha indicam diferença significativa pelo teste de Tukey (p < 0,05); **letras diferentes na linha indicam diferença significativa pelo teste de Qui-quadrado de McNemar (p < 0,05); DP: Desvio padrão da média; F1: Formulação padrão; F2: formulação adicionada com 1% de farinha de casca de limão; F3: formulação adicionada com 2% de farinha de casca de limão; F4: formulação adicionada com 3% farinha de casca de limão; F5: formulação adicionada de 4% farinha de casca de limão.



*F1: Formulação padrão; F2: formulação adicionada com 1% de farinha de casca de limão; F3: formulação adicionada com 2% de farinha de casca de limão; F4: formulação adicionada com 3% farinha de casca de limão; F5: formulação adicionada com 4% farinha de casca de limão.

Figura 1. Frequência de notas obtidas pelos provadores na avaliação sensorial das formulações de biscoito tipo *cracker* padrão e adicionadas de 1, 2, 3 e 4% de farinha de casca de limão siciliano.

“textura”, as amostras F1 e F3 apresentaram notas maiores ($p < 0,05$) que F4, sem diferença estatística das demais. Estes resultados mostram-se diferentes dos verificados em estudo de Ishimoto et al.²² ao avaliarem diferentes formulações de biscoitos acrescidos de casca de maracujá, que encontraram notas menores nas adições de 1% e 4% do que para 7% nos atributos de “textura” e “sabor”.

Avaliando-se a crocância, pode-se observar que F1 e F3 apresentaram notas semelhantes a F2 e F5, sendo maiores que F4. Isso pode ter ocorrido, devido a uma possível diferença no forneamento dos biscoitos, deixando F4 menos crocante que F1 e F3.

Quanto à aceitação global e intenção de compra positiva, constatou-se que as formulações F1 e F2 foram as que apresentaram maiores porcentagens de respostas positivas, decrescendo com a adição de maiores níveis de farinha de casca de limão. As amostras F4 e F5 permaneceram com resultados de aceitação global e intenção de compra abaixo de 50%. Corroborando com estes dados, Francisco²³, que verificou aceitabilidade de biscoitos caseiros enriquecidos com farinha de casca de vegetais, também observou que, conforme o maior enriquecimento do produto, menor foi a aceitabilidade.

Na Figura 1, podem-se observar as frequências das notas atribuídas pelos provadores para cada atributo sensorial.

As avaliações “gostei muito” (41,79%) e “gostei moderadamente” (29,85%) foram as mais assinaladas para o atributo “aparência” e “aroma”, corroborando com o estudo de Larosa et al.²⁴ ao avaliarem o aroma nas formulações de biscoitos enriquecidos com farinha de okara também verificaram boa aceitação, assemelhando-se ao produto comercial. Já no atributo “sabor”, as notas 7 e 8 também foram as mais referidas pela maioria dos provadores, principalmente para as formulações F1 e F2.

Para os atributos textura e crocância, as notas 7 e 8 foram as mais apontadas pelos provadores. O mesmo resultado foi observado no estudo de Matias, Oliveira e Magalhães¹³ avaliando o uso de bagaço de caju e goiaba no enriquecimento de biscoitos.

Assim, é possível avaliar que a maioria das notas de todos os atributos (aparência, sabor, aroma, textura e cor) permaneceu superior a 5 (“nem gostei/nem desgostei”).

Segundo Alamanou et al.²⁵, atributos como o aroma e sabor são, provavelmente, as características mais importantes que influenciam as propriedades sensoriais de produtos alimentícios adicionados de ingredientes diferenciados. Em razão disso, foi verificado que a amostra mais aceita, considerando o sabor, foi aquela adicionada de 1% de farinha de casca de limão siciliano (F2). Dessa forma, a mesma foi selecionada para

realização das demais análises, junto com o padrão (F1), sem a adição, para fins de comparação.

Análise da composição centesimal

A Tabela 3 apresenta os resultados da análise da composição centesimal da farinha de casca de limão siciliano, bem como seu teor de fibra bruta e valor calórico, enquanto a Tabela 4 apresenta a análise da composição centesimal dos biscoitos padrão (F1) e formulação contendo 1% de farinha de casca de limão siciliano (F2).

Tabela 3. Composição centesimal da farinha de casca de limão siciliano (100 g)

Composição centesimal	Média ± DP
Umidade (%)	17,50 ± 0,54
Cinzas (%)**	4,67 ± 0,12
Carboidratos (%)**	72,81 ± 0,19
Proteínas (%)**	4,81 ± 0,87
Lipídios (%)**	3,84 ± 0,56
Fibra bruta (%)**	13,87 ± 0,83
Valor calórico (kcal)	345,04 ± 5,32

*DP: desvio-padrão da média; **Valores calculados em base seca.

Em pesquisas de Lucchesi e Raymundo²⁶, foram verificados teores de fibras de 24,7% para a farinha de casca de limão siciliano, sendo maior do que o encontrado no presente trabalho, entretanto, os autores relatam valores de cinzas (0,19%) e umidade (9,25%), menores do que os verificados na atual pesquisa. Diversos fatores podem influenciar nas diferenças físico-químicas dos frutos

como a constituição genética, as condições climáticas e o tratamento pós-colheita²⁷. Esses dados podem explicar as discordâncias de resultados verificadas com a literatura para a farinha de casca de limão siciliano.

Na Tabela 4, pode-se constatar que os teores de umidade, cinzas, lipídios, proteínas, fibra bruta e calorías mostraram-se significativamente superiores no biscoito acrescido de 1% de farinha de casca de limão siciliano F2 ($p < 0,05$), que, na formulação padrão F1, obtendo-se maiores valores diários recomendados (VD)²⁹. Embora os carboidratos tenham sido encontrados em menor teor na formulação F2 que em F1, menor inclusive que o encontrado no produto comercial, a adição da farinha de casca de limão siciliano aumentou a quantidade de fibra bruta do alimento, mesmo ao nível de 1%.

O maior valor calórico do biscoito acrescido de 1% de farinha pode ser explicado devido à adição da farinha de limão nas formulações, uma vez que a mesma é rica em lipídios, proteínas e carboidratos (Tabela 3).

CONCLUSÃO

O desenvolvimento dos produtos permitiu comprovar que um nível de adição de até 1% de farinha de casca de limão siciliano em biscoitos tipo *cracker* foi o mais aceito pelos provadores dentre aqueles contendo este ingrediente, obtendo-se aceitação sensorial semelhante ao produto padrão.

A análise química do produto adicionado de 1% de limão siciliano proporcionou, em geral, aumento no teor de nutrientes, com exceção dos carboidratos.

Tabela 4. Valores diários recomendados – VD* (porção média de 100 gramas) e composição centesimal dos biscoitos padrão e adicionado de 1% de farinha de casca de limão siciliano comparados com valores de referência²⁸ e informação nutricional de um produto similar vendido comercialmente

Composição centesimal	F1		F2		Referência**
	Média ± DP	VD (%)*	Média ± DP	VD (%)*	
Umidade (%)***	7,67 ± 0,04 ^b	ND	10,27 ± 0,13 ^a	ND	4,10 ^c
Cinzas (%)***	2,72 ± 0,02 ^b	ND	3,00 ± 0,06 ^a	ND	2,70 ^b
Carboidratos (%)***	74,51 ± 0,02 ^a	25,0	63,91 ± 0,18 ^b	21,00	73,90 ^a
Proteínas (%)***	7,66 ± 0,13 ^b	7,10	8,20 ± 0,09 ^a	7,40	6,95 ^c
Lipídios (%)***	15,11 ± 0,09 ^b	29,10	24,89 ± 0,97 ^a	40,10	12,60 ^c
Valor calórico (kcal)***	464,74 ± 0,17 ^c	21,40	512,45 ± 0,40 ^a	22,80	434,80 ^b
Fibra bruta (%)***	0,64 ± 0,14 ^b	ND	2,37 ± 0,22 ^a	ND	ND

*VD: nutrientes avaliados pela média da Dietary Reference Intakes (DRI)²⁹, com base numa dieta de 2000 kcal; **Valores de umidade e cinzas foram comparados com a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO)²⁸ e valores de lipídeos, proteínas, carboidratos e calorías foram comparados com a informação nutricional de um produto similar vendido comercialmente; ***letras diferentes na linha indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); ****letras diferentes na linha indicam diferença significativa pelo teste de t de *student* ($p < 0,05$); Valores calculados em base seca; F1: Formulação padrão; F2: formulação adicionada com 1% de farinha de casca de limão siciliano; DP: desvio-padrão da média; ND: Não disponível.

Assim sendo, a farinha de casca de limão siciliano pode ser considerada um potencial ingrediente com propriedades funcionais para a adição em biscoitos e produtos de panificação e similares, podendo ser oferecidos aos consumidores com altas expectativas de aceitação no mercado.

REFERÊNCIAS

1. Oliveira CR, Oliveira ECC, Sampaio TMT, Oliveira MN. Aproveitamento integral dos alimentos: Capacitando Multiplicadores. *Rev Bras Agroecologia*. 2009;4(2):784-7.
2. Emídio EA. Reaproveitamento alimentar: uma opção econômica e saudável. 2006. [acesso 2009 maio 13.] Disponível em: [http://www.livrodereceitas.com].
3. Callegari FL, Salome CM, Rocha AV, Gonçalves CAA, Ciabotti S, Silva MBL, et al. Desenvolvimento, aceitabilidade e intenção de compra de cookie de frutas. *Rev Nort Cient*. 2010;5(1):161-8.
4. Moraes MR, Sousa LM, Nascimento LA, Ribeiro MWS, Sousa SE, Azevedo HS. Aproveitamento integral de alimentos: uma opção econômica e saudável. Congresso Brasileiro de Economia Doméstica, setembro de 2009. Fortaleza. p. 1-6.
5. Reda SY, Leal ES, Batista EAC, Barana AC, Schnitzel E, Carneiro PIB. Caracterização dos óleos das sementes de limão rosa (*Citrus Limonia* Osbeck) e limão siciliano (*Citrus limon*), um resíduo agroindustrial. *Rev Ciênc Tecnol Aliment*. 2005;5(4):672-6.
6. Kobori CN, Jorge N. Caracterização dos óleos de algumas sementes de frutas como aproveitamento de resíduos industrial. *Ciênc Agrotec*. 2005;29(5):1008-14.
7. Trucom C. Aromaterapia: a casca do limão contém d-limoneno. [acesso 2011 abr 10.] Disponível em: [http://www.docelima.com.br/site/component/content/article/1-conceito/31-a-casca-do-limao-contem-d-limoneno.html].
8. Wang YC, Chuang YC, Hsu HW. The flavonoid, carotenoid and pectin content in peels of citrus cultivated in taiwan. *Food Chemis*. 2008;106(1):277-84.
9. Mendonça LMVL. Caracterização da composição química e do rendimento dos resíduos industriais do limão Tahiti (*Citrus latifolia* Tanaka). *Ciênc Tecnol Aliment*. 2006;26(4):870-4.
10. Mendonça K, Jacomino AP, Melhem TX, Kluge RA. Concentração de etileno e tempo de exposição para desverdecimento de limão "siciliano". *Braz J Tecno*. 2003;6(2):179-83.
11. Mello V, Laaksonrn D. Fibras na dieta: tendências atuais e benefícios à saúde na síndrome metabólica e no diabetes melito tipo 2. *Arq Bras End Metab*. 2009;53(5):53-5.
12. Perez PMP, Germani R. Elaboração de biscoitos tipo salgado, com alto teor de fibra alimentar, utilizando farinha de berinjela (*Solanum melongena*, L.). *Rev Ciênc Tecnol Aliment*. 2007;27(1):186-92.
13. Matias MFO, Oliveira ELO, Gertrudes E, Magalhães MMA. Use of fibres obtained from the Cashew (*Anacardium occidentale*, L) and Guava (*Psidium guayava*) fruits for Enrichment of food products. *Rev Braz Arch Bio and Tech*. 2005;48(1):143-50.
14. Macfie, HJ. et al. Designs to balance the effect of order of presentation and first-order carry-over effects in hall tests. *J Sens Stud*. 1989;4(2):129-48.
15. Dutcosky SD. Análise sensorial de alimentos. 20. ed. Curitiba: Champagnat; 1996.
16. Moskowitz HR. Product optimization approaches and applications. In: Macfie HJ, Thomson DM, editors. Measurement of Food Preferences. Londres: Blackie Academic and Professional; 1994. p. 67-136.
17. Association of Official Analytical Chemistry (AOAC). Official methods of analysis. 14 ed. Virginia; 1984.
18. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem and Physiol*. 1959;37(8):911-7.
19. Atwater WO, Woods CD. The chemical composition of American food materials. US Official Experiment Stations, Experiment Station Bulletin nº 28. Washington, DC; 1896.
20. Zar JH. Biostatistical analysis. Upper Saddle River: Prentice Hall International; 1996.
21. Mauro AK, Silva VLM, Freitas MCJ. Caracterização física, química e sensorial de *cookies* confeccionados com farinha de talo de couve (FTC) e farinha de talo de espinafre (FTE) ricas em fibra alimentar. *Rev Ciênc Tecnol Aliment*. 2010;30(3):719-20.
22. Ishimoto FY, Harada AI, Branco IG, Conceição WAS, Coutinho M. Aproveitamento alternativo da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. var. *flavicarpa* Deg.) para produção de biscoitos. *Rev Ciênc Exat Nat*. 2007;9(2):279-92.
23. Francisco JS. Biscoitos produzidos com farinha de vegetais descartados em pontos de comercialização. Programa Institucional de Iniciação Científica (Pibic). Londrina; agosto 2010.
24. Larosa G, Elizeu EA, Barbosa JC, Carvalho MRBC. Aspectos sensoriais, nutricionais e tecnológicos de biscoito doce contendo farinha de Okara. *Rev Alim Nutr*. 2006;17(2):151-7.
25. Alamanou S, Bloukas JG, Paneras ED, Doxastakis G. Influence of protein isolate from lupin seed (*Lupinus albus* ssp. Graecus) on processing and quality characteristics of frankfurters. *Meat Scien*. 1996;42(1):79-93.
26. Lucchesi BF, Raymundo MS. Caracterização físico-química de farinhas obtidas a partir das cascas de limões das variedades rosa, siciliano e tahiti. XIX Encontro de Alunos de Iniciação Científica (EAIC), outubro de 2010. Guarapuava: Unicentro. [Resumo 665]
27. Melo PCB, Barroso APS, Lima AM, Silva IM, Almeida ECB. Caracterização física e físico-química de frutos do oití (*licania tomentosa*) cultivado no vale do São Francisco. V Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica (CONNEPI). novembro de 2010; Petrolina, PE. [Resumo 35].
28. Unicamp. Tabela brasileira de composição de alimentos (TACO). 2. ed. Campinas, SP: NEPA/UNICAMP; 2006.
29. Institute of Medicine. DRI - Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids (Macronutrients). Washington, DC: The National Academies Press; 2005.

Assessing the ascorbic acid contents in beverages and powdered juices: comparison between the experimental data and the values displayed on the product label

Avaliação do conteúdo de ácido ascórbico em bebidas e refrescos em pó: comparação entre valores experimentais e os declarados no rótulo

RIALA6/1472

Daniel GRANATO^{1,2*}, Flavia Vilas Boas Wiecheteck PIEKARSKI², Maria Lucia MASSON²

*Endereço para correspondência: 1Núcleo de Análise e Tratamento de Dados, Centro de Materiais de Referência, Instituto Adolfo Lutz. Av. Dr. Arnaldo, 355, CEP: 01246-902, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: granatod@gmail.com

²Universidade Federal do Paraná – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos

Recebido: 06.10.2011- Aceito para publicação: 02.04.2012

ABSTRACT

The determination of ascorbic acid (AA) contents in beverages is a challenging and necessary task because consumers have to know the exact amount of this component in the product as displayed on the container label. Moreover, the food industries have to add the exact ($\pm 20\%$) quantity of ascorbic acid as it is stated on the label. This study aimed at evaluating 60 ready-to-drink beverages and powdered juices marketed in Curitiba (PR, Brazil). The results were compared with the values declared on the label, and in 90% of the samples no statistically similar values ($p < 0.05$) were found by comparing with those stated on the packaging label. Moreover, the AA values found in this analysis were from 12 to 90% lower than those reported by manufacturers. For that reason, the ascorbic acid contents in these products should be monitored by the National Health Surveillance Agency (ANVISA).

Keywords. vitamin C, quality control, beverages.

RESUMO

A determinação do conteúdo de ácido ascórbico (AA) em bebidas é uma tarefa desafiadora e indispensável, uma vez que os consumidores necessitam ter conhecimento da quantidade exata de AA declarada no rótulo da embalagem do produto. As indústrias de alimentos devem adicionar a quantidade exata ($\pm 20\%$) de AA declarada no rótulo. Neste trabalho, foram avaliadas 60 amostras de bebidas prontas para beber e sucos em pó comercializados em Curitiba (PR, Brasil). Os resultados obtidos foram comparados estatisticamente com o valor declarado no rótulo. Em 90% das amostras, não foram encontrados valores similares ($p < 0,05$) aos declarados nas embalagens. Além disso, os teores de AA encontrados no estudo foram de 12% a 90% menores do que os valores declarados pelos fabricantes. Estes achados indicam que os teores de vitamina C em produtos dessa natureza necessitam ser monitorados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Palavras-chave. vitamina C, controle de qualidade, bebidas.

INTRODUCTION

Ascorbic acid (AA), also known as vitamin C, is a water-soluble vitamin that can be found in many biological systems and foodstuffs (fresh vegetables and fruits). Ascorbic acid plays an important role in collagen biosynthesis, iron absorption, and immune response activation¹. It also acts as a powerful antioxidant in numerous *in vivo* protocols by buffering free-radicals that are closely associated to some diseases such as aging, neurodegenerative and other non-transmissible chronic diseases²; moreover, ascorbic acid has been proved to suppress sarcoma cell death in rats³. In this regard, it is noteworthy that AA has been added as an antioxidant (fruit juices, for example) in many foods, being used in medicine in pill form as a component of multivitamin tablets⁴.

In order to analyze the ascorbic acid content in beverages, different analytical methods have been used to quantify the ascorbic acid present in foods and beverages such as UV-VIS spectrophotometry, high performance liquid chromatography, electrophoresis, enzymatic methods, amperometry, and titametric methods⁵, in which one of the most employed oxidant agents is the iodine⁶. Iodine is a mild oxidizing agent that is capable of oxidizing only quantitatively strongly reducing substances such as ascorbic acid.

According to the Brazilian Ministry of Health⁷, Ordinance n° 31 January 1998, a food is considered "source of vitamins" since 100 mL or 100 g of the product ready for consumption provide at least 7.5% of the daily recommended value of intake (DRV) for liquids, and 15% of the DRV in case of solids. To use high content or rich in vitamins 'claim' it is necessary that 100 ml or 100 g of the product ready for consumption provide at least 15% of the DRV in case of liquids, and 30% of DRV in the case of solids.

Consumers demand for safe, functional, and fresh products has been increasing continuously, contributing to the increasing consumption of fruit juices and fruit juice-based drinks. Nutritional information related to these products is necessary to guide consumers towards the best options of beverages available in the marketplace. In this context, this study aimed at evaluating 60 ready-to-drink beverages, including fruit juices, powdered juices, teas, and soy/juice blends, marketed in Curitiba (PR, Brazil).

MATERIAL AND METHODS

Sampling

A total number of 60 samples of soft drinks, powder juices, green teas, juice concentrates, ready-to-drink natural juices, and soy beverages (blended with fruit juices) were purchased from five different local markets in Curitiba, PR. A total number of 19 beverages (soy blends, teas, sodas, fruit juices) and 41 powder juices from different trademarks were acquired. Attention to the expiration date and condition of the packaging was paid for each product. A quantity of about 200 g of powder juice from the same lot and 1 liter of beverage were used for each product.

Assessment of the ascorbic acid content displayed on the label

In order to assess the adequacy of the information on the label, firstly a worksheet was assembled using the software Microsoft Excel version 2003, having the ascorbic acid content (AA) (mg/100 g) of each sample. The Resolution number 269 from 22 September 2005 from the National Agency of Sanitary Vigilance⁸ was taken into consideration to compare the content of AA displayed on the label with the one determined in our study.

Determination of the ascorbic acid content

The ascorbic acid content was determined by the redox titration method, in which a 0.01 M potassium iodate (KIO_3) solution was prepared according to the method 364/IV from the Instituto Adolfo Lutz⁹. In order to perform the ascorbic acid determination, the ready-to-drink beverages were not diluted, whereas the powdered juices were diluted 5 times using Mili-Q ultra-pure water. The ascorbic acid content in every sample was obtained from three parallel determinations and were expressed as mg/100 g or mg/100 mL.

The end-point of the reaction between AA and the potassium iodate is indicated by the production of a blue-black product. As long as the ascorbic acid is present in the test sample, the triiodine is quickly converted to iodide ion, and no blue-black iodine-starch product is formed in the medium. However, when all ascorbic acid has been oxidized, the excess of triiodide (in equilibrium with iodine) reacts with the starch to form the expected blue-black color. This method was validated and showed a good linearity, precision and accuracy when ready-to-

drink beverages were assessed¹⁰. In comparison to other analytical procedures, this titration method is considered simple, inexpensive, and no time-consuming once it does not require preliminary extraction.

Statistical evaluation

Results were presented as mean \pm standard deviation. The *t*-Student test for a single sample was applied to the data in order to compare the value displayed on the label with the one determined experimentally. The probability level (*p*-value) for each evaluation was also provided. For this analysis, the software Statistica v. 7 (StatSoft, Tulsa, OK, USA) was used. A *p*-value below 0.05 was considered significant, that is, a *p*-value higher than 0.05 means that no statistical difference was found between the experimental value and the one on the label.

RESULTS AND DISCUSSION

In our study, a great number of products (*n* = 60) available on the marketplace was selected in order to confer reliability and provide scientifically sound results. Table 1 summarizes the data obtained from the determination of the ascorbic acid content and the statistical comparison between experimental results and the values displayed on the label of each product. It is possible to observe that only 6 samples out of 60 presented a non-significant *p*-value (*p* > 0.05) in accordance with the Student *t*-test, while 8 products did not present any information about the ascorbic acid content on the label. It means that 76.7% of the products did not contain a similar (*p* > 0.05) ascorbic acid content as compared to the value displayed on the label. Likewise, Quirós et al.¹¹ measured the ascorbic acid content in fruit juices and soft drinks using the same experimental procedures adopted in this study. By applying this method, they found that the amounts of vitamin C declared on the labels of many drinks are not what they obtained experimentally. Among a total of 17 fruit juices, soft drinks and isotonic drinks, only 2 samples presented a similar value to the one indicated on the label. The authors also evaluated how the vitamin C content present in orange juices and tea drinks varies during the shelf life. After a six-day storage period, the juice barely lost 8% of its ascorbic acid amount, while in teas the vitamin C content fell by 54% at 4 °C and practically disappeared at room temperature.

From the comparison between the mean AA contents and the value indicated on the label it is possible

to observe that the ascorbic acid content remained between 12 to 90% lower than the values declared on the label of the products. Although 6 samples showed no significant difference in the assessment, 4 samples were liquid juice, and only two were powdered juices.

Other authors have already analyzed the ascorbic acid content in fruit juices, sodas, and other beverages marketed in Brazil and verified that a great part of the products does not contain the specified content displayed on the label. A study conducted by José et al.¹² showed that powdered juices marketed in Brazil did not contain the content of AA displayed on the label: the contents varied from 3.45 to 12.12 mg/100 mL. The study emphasized that powdered juices are not sources of AA and that a tougher control and monitoring should be performed by governmental agencies; Silva et al.¹³ concluded that powdered juices cannot be considered sources of AA, once the samples presented low AA contents (0.67 – 32.00 mg/100 g of powder). They also verified that eight out of eleven samples presented wrong information about the AA content displayed on the label, and it would be necessary to intake a total number of 4 to 67 glasses (200 mL) of diluted powdered juice to provide the daily recommended value of intake for adults (\geq 19 years old); Abreu et al.¹⁴ evaluated the AA content of soy extracts blended with fruit juices (mango, coconut, pineapple, passion fruit, and guava) and found AA values ranging from 0.09 to 3.30 mg/100 g. These values were also lower than the ones declared on the label. The authors also mentioned that for some samples the difference was 10 times lower than the value declared on the packaging.

Other authors such as Santos et al.¹⁵ observed that among six brands of mango nectar only two had lower values than those provided on the label. In the same sense, other fruit nectars presented higher (up to 65%) AA levels than the values indicated on the label. Yamashita et al.¹⁶ investigated the vitamin C stability in fresh acerola, pasteurized acerola pulp, and acerola juice, stored at -12 °C/18 °C for up 4 months. The ascorbic acid content of acerola juice at the beginning of the experiment was 1,511 mg/100 g, and after the storage period at -12 °C this content decreased to 869 mg/100 g, while the sample stored at -18 °C had 1,223 mg/100 g. The initial ascorbic acid content in the pasteurized pulp was 1360 mg/100 g and at the end of 4 months it was 1,314 mg/100 g. The pasteurized juice stored at room temperature presented an initial ascorbic acid content of 988 mg/100 g, and at the end of 4 months of storage the content was 673 mg/100 g.

Table 1. Ascorbic acid content displayed on the label of beverages *versus* the content determined experimentally

Samples	Type	Ascorbic acid – label – (mg/100 g)	Ascorbic acid – experimental – (mg/100 g)	Significance (p-level)
1	Powder juice	214.29	85.85 ± 0.98	0.007
2	Powder juice	166.67	75.67 ± 1.23	0.021
3	Powder juice	214.29	86.47 ± 1.77	0.004
4	Powder juice	272.00	179.96 ± 0.40	0.031
5	Powder juice	272.00	153.68 ± 0.44	0.009
6	Powder juice	ND	7.80 ± 0.06	NA
7	Powder juice	111.67	70.82 ± 1.54	0.006
8	Powder juice	111.67	64.42 ± 1.49	0.004
9	Powder juice	111.67	67.59 ± 1.56	0.005
10	Powder juice	214.29	270.61 ± 7.99	0.054
11	Powder juice	200.00	119.54 ± 6.80	0.043
12	Powder juice	471.43	240.43 ± 11.63	0.013
13	Powder juice	200.00	104.86 ± 8.66	0.012
14	Powder juice	200.00	97.07 ± 8.54	0.008
15	Powder juice	471.43	205.98 ± 23.57	0.001
16	Powder juice	200.00	119.64 ± 10.70	0.006
17	Powder juice	166.67	85.00 ± 9.14	0.005
18	Powder juice	166.67	99.95 ± 8.50	0.008
19	Powder juice	166.67	87.73 ± 7.76	0.006
20	Powder juice	166.67	76.61 ± 5.68	0.004
21	Powder juice	166.67	75.02 ± 4.46	0.013
22	Powder juice	166.67	77.66 ± 5.20	0.011
23	Powder juice	155.56	281.85 ± 14.67	0.004
24	Powder juice	155.56	288.35 ± 12.38	0.019
25	Powder juice	155.56	338.43 ± 21.45	0.004
26	Powder juice	111.67	84.10 ± 8.23	0.068
27	Powder juice	111.67	66.42 ± 4.37	0.039
28	Powder juice	111.67	80.41 ± 2.89	0.017
29	Powder juice	166.67	66.23 ± 3.98	0.002
30	Powder juice	214.29	101.14 ± 4.67	0.011
31	Powder juice	272.00	164.34 ± 6.82	0.003
32	Powder juice	100.00	21.87 ± 1.49	0.015
33	Powder juice	562.50	108.51 ± 10.77	0.008
34	Powder juice	366.67	92.23 ± 7.69	0.003
35	Powder juice	366.67	61.35 ± 4.84	0.002
36	Powder juice	366.67	76.49 ± 5.42	0.005
37	Powder juice	471.43	256.24 ± 15.25	0.001
38	Powder juice	200.00	123.46 ± 10.53	0.035
39	Powder juice	111.67	78.90 ± 6.79	0.024
40	Powder juice	366.67	84.78 ± 8.44	0.004
41	Powder juice	366.67	88.92 ± 9.28	0.004
42	Liquid	7.58	39.75 ± 1.77	< 0.001
43	Liquid	9.00	7.63 ± 0.21	0.070
44	Liquid	100.00	7.04 ± 0.33	< 0.001
45	Liquid	ND	1.01 ± 0.15	NA
46	Liquid	ND	0.50 ± 0.09	NA
47	Liquid	ND	0.50 ± 0.07	NA

Samples	Type	Ascorbic acid – label – (mg/100 g)	Ascorbic acid – experimental – (mg/100 g)	Significance (p-level)
48	Liquid	ND	0.50 ± 0.03	NA
49	Liquid	ND	1.38 ± 0.07	NA
50	Liquid	ND	1.01 ± 0.02	NA
51	Liquid	23.00	9.98 ± 0.13	0.029
52	Liquid	7.50	7.42 ± 0.05	0.644
53	Liquid	12.00	5.64 ± 0.05	0.001
54	Liquid	12.00	7.75 ± 0.04	0.001
55	Liquid	4.25	5.14 ± 0.31	0.104
56	Liquid	4.25	7.04 ± 0.03	0.005
57	Liquid	ND	0.75 ± 0.05	NA
58	Liquid	3.00	5.03 ± 0.21	0.006
59	Liquid	23.50	14.75 ± 0.44	0.045
60	Liquid	9.00	7.04 ± 0.06	0.076

Note: ND = not declared on the label.

These findings need to be seriously considered by governmental agencies such as the National Health Surveillance Agency (ANVISA), once they suggest that the food industry has not paid sufficient attention to the ascorbic acid content added to the products or even to measure accurately this substance in such products before and after the unitary operations used to their development. Another hypothesis to be taken into consideration is that the food industry may have added unstable chemical forms of ascorbic acid to the products, which may oxidize throughout transportation and shelf-life.

Ascorbic acid is easily oxidized as compared to other vitamins. It is known that AA is stable only in acidic medium, in the absence of light, oxygen and heat, and the factors favoring its degradation are the presence of alkali, oxygen, heat, light, metals, and some enzymes¹⁷. Taking into consideration the type of packaging, the thermal processing and other unit operations, it is possible to assume that all these factors may also be responsible for the differences between experimental values and those declared on the labels. It is known that the air incorporation during the processing steps and the storage temperatures enhance aerobic degradation reactions¹⁸. In the case of hermetically sealed anaerobic conditions, ascorbic acid decomposes to 2,5-dihydro-2-furanoic acid to become carbon dioxide and furfural. The furfural undergoes polymerization as an active aldehyde and can be combined with amino acids, contributing to the juice darkening¹⁹.

Losses may also occur due to different types of equipments used during the process and / or by chemical

oxidation of ascorbic acid and/or thermal degradation through blanching, cooking, pasteurization and dehydration²⁰. Freitas et al.²¹ evaluated the ascorbic acid stability in acerola juices produced by the hot fill (glass bottles) and aseptic (carton packaging) processes during 350 days of storage in similar conditions of marketing (25 ± 2 °C). The authors observed a reduction in ascorbic acid content of 23.61% for the hot fill process and 35.95% for the aseptic process.

A study conducted by Kabasakalis, Siopidou and Moshatou²² concluded that the AA content in different commercial fruit juices marketed in Greece ranged from 2.4 to 43 mg/100 mL. The storage of such products in closed containers at room temperature for a period of 4 months resulted in ascorbic acid losses ranging from 29% to 41%. Commercial orange juice, when stored in open containers in the refrigerator for 31 days, lost 60% to 67% of its ascorbic acid content while fresh orange juice lost between 7% and 13% of the AA content. Open containers of commercial fruit juice, when stored outside the refrigerator for 10 days, lost 12.5% of their ascorbic acid content, while the refrigerated juice for the same period, lost up to 9% of AA.

Although ANVISA allows a variation range of $\pm 20\%$ in relation to the mean value of the nutrient displayed on the label, we believe that this value is extremely high for beverages due to the main reasons: 1) this high variance range allows the industry not to monitor suitably each lot of the final products; 2) a less intense development of new packaging systems to prevent deterioration of chemical constituents such as vitamins, sterols, phenolic compounds, carotenoids, among others; 3) the higher

the variance range, the lesser attention to quality control is paid by food industries; 4) with less attention paid to quality control, consumers do not get what they believe they actually buy, and implications on satisfaction, trust, and loyalty to brand get compromised. Thus, ANVISA should monitor such products evaluated in this study and possibly reduce the acceptable range for the values of nutrients, including ascorbic acid, displayed on the label. This action would prevent eventual relapses on quality control and more attention on food processing would be paid in the beverage industry.

CONCLUSIONS

The study showed a high variability between the vitamin C content experimentally determined and the one declared by the manufacturer. Among the 60 samples analyzed in this study, 76.7% of the products had their vitamin C content statistically different ($p < 0.05$) from the amount displayed on the container label, with a content ranging from 12 to 90% lower than the value declared on the label. These results indicate it is necessary to perform a stricter quality control in powdered juices and ready-to-drink beverages.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful for the financial support provided by CAPES (Brazilian research supporting foundation).

REFERENCES

1. Sahoo PK, Mukherjee SC. Immunomodulation by dietary vitamin C in healthy and aflatoxin B1-induced immunocompromised rohu (*Labeo rohita*). *Comp. Immun. Microb. Infect. Dis.* 2003;26(1):65-76.
2. Chao JCI, Huang CH, Wu SJ, Yang SC, Chang NC, Shieh MJ, et al. Effects of β -carotene, vitamin C and E on antioxidant status in hyperlipidemic smokers. *J Nutr Biochem.* 2002;13(7):427-34.
3. Frank J, Flaccus A, Schwarz C, Lambert C, Biesalski HK. Ascorbic acid suppresses cell death in rat DS-sarcoma cancer cells induced by 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. *Free Radic Biol Med.* 2006;40(5):827-36.
4. Davis MB, Austin J, Partridge D. *Vitamin C: its chemistry and biochemistry*. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 1991.
5. Campos FM, Ribeiro SMR, Lucia CMD, Pinheiro-Sant'ana HM, Stringheta PC. Optimization of methodology to analyze ascorbic and dehydroascorbic acid in vegetables. *Quím Nova.* 2009;32(1):87-91.
6. Andrade RSG, Diniz MCT, Neves EA, Nóbrega JA. Determinação e distribuição de ácido ascórbico em três frutos tropicais. *Eclét Quím.* 2006;27(1):1-6.
7. Brasil. Portaria SVS/MS nº 31, de 13 de janeiro de 1998. Regulamento técnico referente a alimentos adicionados de nutrientes essenciais. *Diário Oficial da União, Brasília, DF*, 16 jan 1998.
8. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005: regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. *Diário Oficial da União, Brasília, DF*.
9. Instituto Adolfo Lutz. *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. 4. ed. Brasília; 2005.
10. Suntornsuk L, Gritsanapun W, Nilkamhank S, Paochom A. Quantitation of vitamin C content in herbal juice using direct titration. *J Pharm Biomed Anal.* 2002;28:849-55.
11. Quirós ARB, Fernández-Arias M, López-Hernández J. A screening method for the determination of ascorbic acid in fruit juices and soft drinks. *Food Chem.* 2009;116(2):509-12.
12. José AB, Souza JM, Lavinás FC. Avaliação do teor de ácido ascórbico e dos parâmetros físico-químicos de amostras de preparados sólidos para refresco, sabor limão. *Saúde & Amb Ver.* 2009;4(1):11-2.
13. Silva PT, Filho E, Lopes MLM, Valente-Mesquita VL. Sucos de laranja industrializados e preparados sólidos para refrescos: estabilidade química e físico-química. *Ciênc Tecnol Aliment.* 2005;25(3):597-602.
14. Abreu CRA, Pinheiro AM, Maia GA, Carvalho JM, Sousa PHM. Avaliação química e físico-química de bebidas de soja com frutas tropicais. *Aliment Nutri.* 2007;18(3):291-6.
15. Santos E, Batista E, Carvalho L, Salgado M, Souza P. Avaliação dos teores de vitamina c em néctares de manga. IX ENPPG / IX ENICIT / III SIMPIT. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará. Fortaleza, CE. 2009.
16. Yamashita F, Benassi MT, Tonzar AC, Moriya S, Fernandes JG. Produtos de acerola: estudo da estabilidade de vitamina C. *Ciênc Tecnol Aliment.* 2003;23(1):92-4.
17. Oliveira MEB, Bastos MSR, Feitosa T, Branco MAAC, Silva MGG. Avaliação de parâmetros de qualidade físico-químicos de polpas congeladas de acerola, cajá e caju. *Ciênc Tecnol Aliment.* 1999;19(3):326-332.
18. Lima VLAG, Mélo EA, Lima LS. Avaliação da qualidade de suco de laranja industrializado. *Bol CEPPA.* 2000;18(1):95-104.
19. Shaw PE, Nagy S, Rouseff RL. The shelf life of citrus products. In: Charalambous G. Shelf life studies of foods and beverages: chemical, biological, physical and nutritional aspects. Amsterdam: Elsevier; 1993.
20. Maia GA, Souza PHM, Santos GM, Silva DS, Fernandes AG, Prado GM. Efeito do processamento sobre componentes do suco de acerola. *Ciênc Tecnol Aliment.* 2007;27(1):130-4.
21. Freitas CAS, Maia GA, Costa JMC, Figueiredo RW, Sousa PHM, Fernandes AG. Estabilidade dos carotenoides, antocianinas e vitamina C presentes no suco tropical de acerola (*Malpighia emarginata* DC.) adoçado envasado pelos processos *hot-fill* e asséptico. *Ciênc Agrotecnol.* 2006;30(5):942-9.
22. Kabasakalis V, Siopidou D, Moshatou E. Ascorbic acid content of commercial fruit juices and its rate of loss upon storage. *Food Chem.* 2000;70(3):325-8.

Chemical characterization and size distribution of sorghum genotypes for human consumption

Caracterização química e distribuição granulométrica de genótipos de sorgo para alimentação humana

RIALA6/1473

Hércia Stampini Duarte MARTINO¹, Priscila Alves TOMAZ¹, Érica Aguiar MORAES^{1*}, Lisiane Lopes da CONCEIÇÃO¹, Daniela da Silva OLIVEIRA¹, Valéria Aparecida Vieira QUEIROZ², José Avelino Santos RODRIGUES², Mônica Ribeiro PIROZI³, Helena Maria PINHEIRO-SANT'ANA¹, Sônia Machado Rocha RIBEIRO¹

*Endereço para correspondência: 1Departamento de Nutrição e Saúde, Universidade Federal de Viçosa, Av. P.H. Rolfs S/N, CEP 36570-000, Viçosa, MG/Brasil. Tel.: + 55 (31) 3899-2545. E-mail: erica_moraes12@hotmail.com

²Núcleo de Recursos Genético e Genótipos, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG

³Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa

Recebido: 28.10.2011- Aceito para publicação: 25.06.2012

ABSTRACT

The purpose of this paper was to evaluate the approximate composition, size distribution, minerals and vitamin E isomers concentrations in eight sorghum genotypes available for human consumption. The protein concentration of samples ranged from 8.57 to 11.59%, lipids from 1.24 to 3.07% and carbohydrates from 57.3 to 64.7%. The total dietary fiber varied from 9.13% to 15.09%. Sorghum genotypes flours were characterized as hard grain and of coarse granulometry, which are the relevant aspects for developing food products. Sorghum genotypes were considered as sources of iron, phosphorus, magnesium and zinc. The α and γ -tocopherol isomers were determined in sorghum genotypes grain and flour, and γ -tocopherol was predominant. In conclusion, sorghum genotypes evidenced to be as relevant sources of dietary fiber, iron, phosphorus, magnesium and zinc. Furthermore, the sorghum genotypes were classified as hard grain, suitable for formulating bakery products.

Keywords. *Sorghum bicolor* L. Moench, size distribution, vitamin E, minerals, nutritional value.

RESUMO

Foram avaliadas as características de composição centesimal, distribuição granulométrica, concentração de minerais e isômeros de vitamina E de oito genótipos de sorgo destinados à alimentação humana. A concentração proteica das amostras variou de 8,57 a 11,59%, e os lipídios de 1,24 a 3,07% e os carboidratos de 57,3 a 64,7%. A fibra alimentar total variou de 9,13% a 15,09%. As farinhas dos genótipos foram caracterizadas como de granulometria grossa e grão duro, cujos aspectos são relevantes para elaborar produtos alimentícios. Dentre os treze minerais pesquisados, os genótipos foram considerados como fonte de ferro, fósforo, magnésio e zinco. Foram determinados os isômeros α e γ -tocoferol nas amostras de grãos e farinhas dos oito genótipos, sendo predominante o γ -tocoferol. Em conclusão, os genótipos de sorgo destacaram-se como boas fontes de fibra alimentar, ferro, fósforo, magnésio e zinco. Além disso, os genótipos de sorgo foram classificados como duros grãos, adequado para a elaboração de produtos de panificação.

Palavras-chave. *Sorghum bicolor* L. Moench, distribuição granulométrica, vitamina E, minerais, valor nutricional.

INTRODUCTION

Sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) stands out as fifth most produced cereal in the world and fourth in Brazil^{1,2}. Sorghum constitutes the major source of proteins, calories and minerals for millions of people individuals, principally in Africa and Asia^{3,4}. However, the human consumption of sorghum in Brazil is not significant and its production is destined mainly for animal feeds^{5,6}.

Carbohydrates under starch form are the main sorghum macronutrients⁷, followed by proteins, typically deficient in the essential amino acids lysine, methionine and cysteine⁸. Lipids content are low and they are present especially under polyunsaturated fatty acids form⁹. The mineral and vitamin composition of sorghum are similar to corn. Potassium and phosphorus are prevalent, as well as B vitamins complex and fat soluble vitamins A, D, E and K^{10,11}. It is noteworthy that nutrients composition of sorghum is influenced by its genetics⁷. In this context, the Brazilian Agency of Maize and Sorghum Research (Embrapa Maize and Sorghum, MG, Brazil) is developing sorghum genetic improvement studies in order to select genotypes with nutritional quality and technology, aiming to encourage the use of sorghum in human consumption.

Sorghum is usually consumed as grain or as flour in recipes including fermented and unfermented porridges, bakery products and is also used in the manufacture of alcoholic beverages^{12,13}. Sorghum is a cereal devoid of gluten, it can replace wheat in bakery products, especially with the aim of developing food products for individuals with celiac disease¹⁴. The development of products made from sorghum of different genotypes, which differ mainly in grain color and the presence of tannins, result in foods with high technological and sensory quality^{2,15}.

Given the potential of sorghum for development of foods and its great variability in composition due to plant genetics, justifies the search for genotypes showing nutritional characteristics suitable for this purpose. The objective of this study was to evaluate the approximate composition, size distribution and concentrations of minerals and vitamin E isomers in eight sorghum genotypes for human consumption.

MATERIALS AND METHODS

Samples

Eight sorghum genotypes were developed and provided by Embrapa Maize and Sorghum, Sete Lagoas,

MG, Brazil: BR 501 and BR 506 (white grains without tannin), BRS 700 and BR 305 (grain brown with tannin), BRS 309 (white grains without tannin), BRS 310 (red grains, without tannin), CMSXS 136 (white grains without tannin), BR 007 (red grains, without tannins). The planting of sorghum was conducted using techniques of crop cultivation, where the spacing between rows was 0.70 m with a mean density of 140,000 plants per hectare. Crop fertilization was 350 kg ha⁻¹ of the formula 08-28-16 + 0.5% Zn. Fertilization was 100 kg.ha⁻¹ of urea applied 40 days after germination. Planting was done in Sete Lagoas, MG, Brazil, in February 2009.

Preparation and size distribution of the sorghum flours

Sorghum grains were manually selected and subjected to sieving for removal of dirt and impurities. To prepare the integral sorghum flours, the grains were crushed with pericarp in a knives mill (CW Brasender, Dusborg, Germany) with a number zero sieve.

To determine flour distribution size of the sorghum genotypes, 100 g of each flour sample were sieved, in duplicate, for 10 minutes in vibratory sieves with mesh openings of 0.84, 0.42, 0.25, 0.21, 0.17 and 0.14 µm. The amounts retained on each sieve were weighed and expressed in percentages.

Approximate composition

Determination of moisture, protein, lipids and ash content of flour from the eight sorghum genotypes was conducted in triplicate according to the methodology recommended by AOAC¹⁶. The determination of soluble and insoluble dietary fiber was performed in accordance with the enzymatic gravimetric method¹⁶. Total dietary fiber was obtained by summing the soluble and insoluble dietary fiber. The carbohydrate content was calculated by difference using the equation: 100 - (moisture + protein + lipid + ash + dietary fiber). The caloric value of the flour was calculated using the Atwater conversion factors: 9 kcal per gram of lipid, 4 kcal per gram of carbohydrate and 4 calories per gram of protein.

Quantification of minerals

The content of aluminum, cadmium, calcium, lead, copper, chromium, sulfur, iron, phosphorus, magnesium, manganese, nickel and zinc were performed in triplicate. The minerals content was analyzed by acid digestion method with a nitroperchloric mixture

in a block digester and analyzed by atomic emission spectrophotometry with argon inductively coupled plasma (model "OPTIMA 3300 DV", Perkin Elmer brand) under the conditions of 1,300 W, cooling airflow of 15 L/min, auxiliary air flow rate of 0.7 L.min⁻¹, carrier gas flow rate 0.5 L.min⁻¹, sample speed introduction of 1.5 mL.min⁻¹, observation height of 15 mm and use of a Meinhard nebulizer¹⁷.

Quantification of vitamin E

Occurrence and content of the eight vitamin E isomers (α , β , γ and δ tocopherols and α , β , γ and δ tocotrienol) was investigated in grains and flours of the genotypes. The vitamin E quantification was performed in both the grains and flours of the genotypes, to investigate the content and behavior of the vitamin before and after processing.

The vitamin E extraction was performed in triplicate as performed by Guinaz et al.¹⁸ with modifications, using a solvent mixture composed by hexane and ethyl acetate at a ratio of 85:15, v/v. The analysis of the vitamin E isomers was performed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) utilizing the chromatographic conditions used by Guinaz et al.¹⁸.

The total vitamin E content was calculated as the sum of its isomers identified in sorghum flour, and the results expressed in $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ fresh matter.

Nutritional value of the sorghum genotypes

The content of minerals, dietary fiber and vitamin E in sorghum flour were compared to Dietary Reference Intakes - DRI¹⁹ using the averages recommended for both genders and aged between 19 to 70 years. The references values of Adequate Intake (AI) were used to calcium, manganese and dietary fiber content and the Recommended Dietary Allowance (RDA) was used to the other minerals and vitamin E. The sorghum genotypes were considered sources of minerals, dietary fiber and vitamin E whether nutrients contents were greater than 5% of the specific recommended average of each mineral, as proposed by Philippi²⁰.

Statistical analysis

Approximate compositions content were expressed as mean content and the minerals and vitamin E content were expressed as the mean and standard deviation.

The in differences at minerals and vitamins content of the sorghum genotypes was analyzed by

variance analysis (ANOVA) followed by the Tukey test, with 5% of probability. For the differences in concentration between total vitamin E and vitamin E isomers in the sorghum grains and flours, the student t-test was used with a significance level of 5%.

RESULTS AND DISCUSSION

Sorghum flour size distribution

The greatest percentage of flour was retained on the sieve with a mesh size of 0.42 μm , featuring it as granulometric coarse flour, durum grain, similar to the integral corn flour (Figure 1). This fact is important because the size distribution of raw material is a relevant aspect in the development of food products²¹. The sorghum flour presented granulometric features suitable for making different types of biscuits and pasta, and can be further refined to produce bread and cakes.

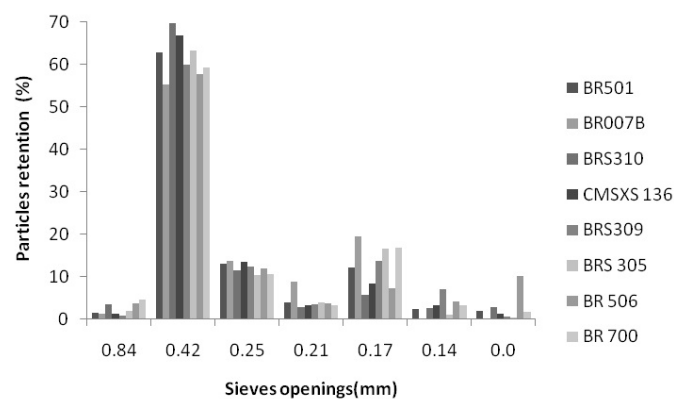


Figure 1. Particle size distribution of flour from eight sorghum genotypes for human consumption

Approximate composition

Protein concentration ranged from 8.6% (BR 700) to 11.9% (BRS 309). However, Antunes et al.²² obtained a greater variation in proteins (9.9 to 18.0%) among genotypes BR 501, BR 506 and BRS 305, also investigated in this study. The lipid content ranged from 1.2% (CMSXS 136) to 3.1% (BR 501), agreeing with the results of Antunes et al.²² and Ragaee et al.²³. However, Mehmood et al.⁹ showed higher lipid concentrations, ranging from 5.0 to 8.2% (Table 1).

Carbohydrates corresponded to the main macronutrient in the sorghum genotypes, ranging from 57.3% in the genotype BR 506 to 64.7% in BR 700 (Table

Table 1. Approximate composition of eight sorghum genotypes, intended for human consumption (g.100g⁻¹)

Nutrient	Genotype							
	BR 501	BR 007B	BRS 310	CMSXS 136	BRS 309	BRS 305	BR 506	BR 700
Protein	9.91 ± 0.16 ^c	10.31 ± 0.13 ^{bc}	11.59 ± 0.14 ^{ab}	10.99 ± 0.79 ^{abc}	11.97 ± 0.15 ^a	10.11 ± 0.17 ^c	11.43 ± .14 ^{abc}	8.57 ± 0.17 ^d
Lipids	3,07 ± 0.04 ^a	2,33 ± 0.03 ^c	2.61 ± 0.07 ^b	1.24 ± 0.03 ^e	2.48 ± 0.15 ^{bc}	2.60 ± 0.08 ^b	2.36 ± 0.01 ^{bc}	1.94 ± 0.12 ^d
Carbohydrates	62.74	64.48	61.81	64.59	63.76	62.09	57.30	64.70
Soluble Fiber	0.17	0.29	0.70	0.28	0.88	0.15	0.63	0.83
Insoluble Fiber	11.01	9.23	9.01	8.85	8.30	11.28	14.46	10.85
Total Fiber	11.18	9.52	9.71	9.13	9.18	11.43	15.09	11.68
Ash	1.51 ± 0.02 ^b	1.46 ± 0.04 ^b	1.43 ± 0.07 ^b	1.49 ± 0.07 ^b	1.36 ± 0.05 ^b	1.32 ± 0.06 ^b	1.93 ± 0.07 ^a	1.23 ± 0.00 ^b
Moisture	11.59 ± 0.20 ^{cd}	11.90 ± 0.09 ^{bc}	12.85 ± 0.11 ^a	12.56 ± 0.35 ^a	11.25 ± 0.07 ^d	12.45 ± 0.03 ^{ab}	11.89 ± 0.18 ^{bcd}	11.88 ± 0.12 ^{bc}
Kcal.g ⁻¹	318.23	320.13	317.09	313.48	325.24	312.20	296.16	310.54

Means followed by the same letters in the same rows do not differ by Tukey test (p < 0.05).

Table 2. Concentration of minerals in the flour produced from eight genotypes of sorghum for human foods (mg.100g⁻¹)

Minerals	Genotypes							
	BR 501	BR 007B	BRS 310	CMSXS 136	BRS 309	BRS 305	BR 506	BR 700
Aluminum	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Cadmus	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Calcium	13.38 ^{ab} ± 3.51	12.55 ^{ab} ± 3.34	8.49 ^b ± 1.35	5.59 ^b ± 0.37	7.87 ^b ± 0.05	8.65 ^b ± 3.71	19.55 ^a ± 5.06	7.31 ^b ± 3.16
Lead	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Copper	0.65 ^{ab} ± 0.25	0.34 ^b ± 0.02	0.37 ^b ± 0.04	0.40 ^b ± 0.06	0.48 ^b ± 0.30	0.33 ^b ± 0.08	1.01 ^a ± 0.26	0.49 ^{ab} ± 0.08
Chrome	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Sulfur	77.42 ^a ± 12.13	85.62 ^a ± 3.73	77.24 ^a ± 7.52	70.32 ^a ± 13.03	66.97 ^a ± 17.76	79.78 ^a ± 9.04	100.85 ^a ± 26.23	75.43 ^a ± 16.95
Iron	1.28 ^{ab} ± 0.33	1.08 ^b ± 0.18	0.81 ^b ± 0.15	0.95 ^b ± 0.05	0.47 ^b ± 0.45	1.15 ^b ± 0.53	5.87 ^a ± 3.34	1.49 ^{ab} ± 0.48
Phosphorus	250.33 ^{ab} ± 17.28	217.13 ^b ± 16.71	187.74 ^b ± 8.17	202.52 ^b ± 64.13	204.55 ^b ± 28.87	179.59 ^b ± 22.30	278.48 ^a ± 28.36	222.63 ^{ab} ± 23.86
Magnesium	122.32 ^{ab} ± 16.72	97.16 ^b ± 10.34	79.02 ^b ± 6.75	85.57 ^b ± 18.11	99.93 ^{ab} ± 26.50	85.58 ^b ± 17.47	147.84 ^a ± 18.04	104.77 ^{ab} ± 11.77
Manganese	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.06 ± 0.11	nd
Nickel	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Zinc	1.85 ^a ± 0.79	1.50 ^a ± 0.10	1.51 ^a ± 0.24	1.34 ^a ± 0.79	1.54 ^a ± 0.50	1.43 ^a ± 0.29	2.7 ^a ± 0.70	1.32 ^a ± 0.57

Means followed by the same letters in the same rows do not differ by Tukey test (p < 0.05)

nd = Not detected.

1). These concentrations were higher than those checked by Ragaee et al. (46.69%).²³

The total dietary fiber content ranged from 9.1% for genotype CMSXS 136 to 15.1% for BR 506. Antunes et al.²² demonstrated lower concentrations of crude fiber in sorghum genotypes. However, this may be due to the limitation of the method used by the authors²⁴. Soluble dietary fiber content ranged from 0.15% for genotype BRS 305 to 0.88% for BRS 309. The insoluble fiber ranged from 8.3% in genotype BRS 309 to 14.5% in BR 506. The insoluble fraction content was greater than the soluble ones. Higher values of total, soluble and insoluble dietary fiber were reported by Ragaee et al.²³ (Table 1).

Ash content in the samples ranged from 1.2% for the genotype BR 700 to 1.9% for BR 506 (Table 1). Antunes et al.²² showed ash concentrations up to 2.2%.

The approximate composition of sorghum genotypes, compared to commercial wheat flour,

presented, on average, lower concentrations of protein, carbohydrate and energy and higher lipid and ash levels²⁵. When it was compared to corn flour, sorghum presented lower concentrations of lipids, higher levels of carbohydrates and ash, and similar values for protein²⁶.

Minerals

The analyzed heavy metals (aluminum, cadmium, lead, chromium and nickel) were not detected in any studied genotype. This result confirm the safety of this cereal in regards to potentially toxic minerals²⁷. The heavy metals absence in grains can be explained by the fact that their concentration varies in different plants tissues and generally the grains contain lower concentration than the vegetative parts²⁸. Except manganese, which was verified only in the genotype BR 506, the other analyzed minerals (calcium, copper, sulfur, iron, phosphorus, magnesium and zinc) were detected in all genotypes (Table 2).

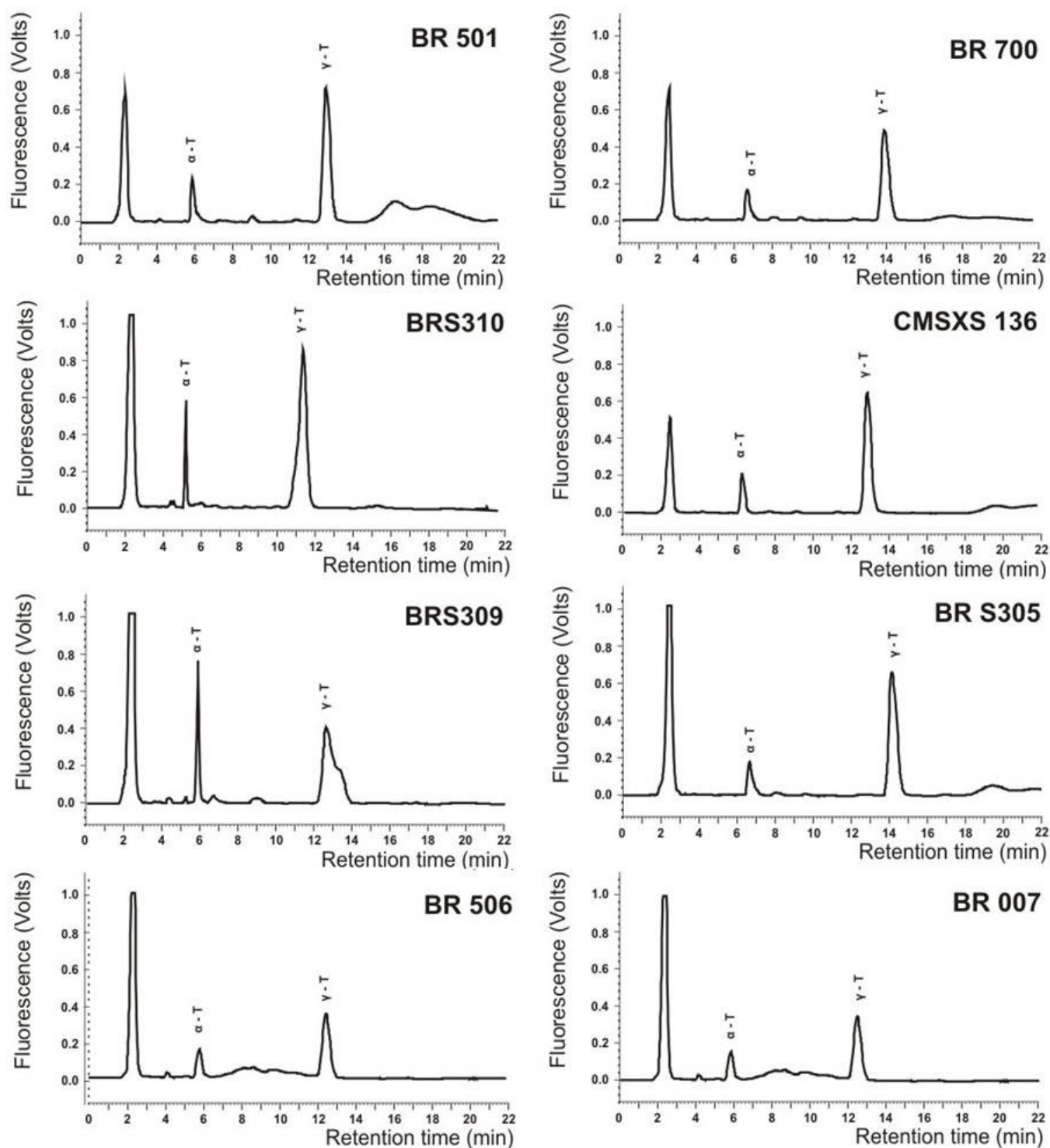


Figure 2. Analysis by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) of tocopherols in sorghum flour. Chromatographic conditions: mobile phase – hexane: isopropanol (99.6:0.4), with pH adjusted to 2.5 with glacial acetic acid; LiChrosorb column) fluorescence detector-chromatography (Si60 Phenomenex 250 × 4 mm, 5 (290 nm excitation and 330 nm emission), mobile phase flow: 1.0 mL.min⁻¹, injection volume: 50 µL. α-T: α-tocopherol, γ-T: γ-tocopherol

Table 3. Concentration of α -tocopherol, γ -tocopherol and total vitamin E ($\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$) in the grain and flour of eight different sorghum genotypes

Sorghum	Vitamin E	Genotypes							
		BR 501	BR 007B	BRS 310	CMSXS 136	BRS 309	BRS 305	BR 506	BR 700
Grains	α -tocopherol	136.79 ^{ab} ± 19.48*	162.66 ^a ± 26.16*	133.87 ^{ab} ± 18.65	83.91 ^c ± 31.13	167.95 ^a ± 19.99	109.13 ^{abc} ± 15.77	119.68 ^{ab} ± 20.35	84.34 ^{bc} ± 3.28*
		244.62 ^a ± 20.78	184.22 ^a ± 149.86	321.93 ^a ± 20.75	172.33 ^a ± 69.98	236.49 ^a ± 17.50	270.61 ^a ± 20.00	202.69 ^a ± 46.18	163.35 ^a ± 40.63
	Vitamin E Total	381.40 ^a ± 40.26	346.88 ^a ± 176.02	455.81 ^a ± 39.40	256.24 ^a ± 100.80	404.44 ^a ± 37.47	379.73 ^a ± 35.76	322.37 ^a ± 66.52	247.68 ^a ± 43.89
		α -tocopherol	83.62 ^a ± 11.38*	70.88 ^a ± 5.72*	136.57 ^a ± 78.83	94.20 ^a ± 15.63	122.44 ^a ± 25.52	85.64 ^a ± 7.12	94.86 ^a ± 20.25
	γ -tocopherol	147.33 ^a ± 68.31	149.87 ^a ± 35.71	250.40 ^a ± 100.12	223.18 ^a ± 17.16	224.64 ^a ± 30.57	236.56 ^a ± 46.37	206.48 ^a ± 52.14	168.56 ^a ± 17.03
		Vitamin E Total	230,96 ^a ± 79,69	220,75 ^a ± 41,43	386,97 ^a ± 178,94	317,37 ^a ± 32,77	347,08 ^a ± 56,08	322,20 ^a ± 53,49	301,34 ^a ± 72,38

Values represent the average of three repetitions. Means in the same row followed by same letter do not differ at 5% probability by the Tukey test. * Significant at 5% probability by the Student's t-test for comparisons of the same isomer of the grain and flour.

The BR 506 genotype showed higher contents of copper, iron, phosphorus and magnesium compared to the genotypes BRS 305, BRS 310 and CMSXS 136 ($p > 0.05$), and did not differ from genotypes BR 501 and BR 700 ($p > 0.05$). Sulfur and zinc content did not differ among the eight genotypes ($p > 0.05$).

In an studies performed by Ragaee et al. ²³ the contents of phosphorus, magnesium, calcium, copper and zinc (34.99, 18.77, 2.73, 0.02 and 0.31 $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$, respectively) were lower than the concentrations obtained in this study. The iron content was similar (1.06 $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$) and manganese was higher (0.12 $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$).

Vitamin E

The α and γ -tocopherol isomers were analyzed in grain and flours. However, the γ -tocopherol isomer was predominant in all samples. The chromatographic conditions used presented good resolution of α and γ -tocopherol, which allowed the safe quantification of these isomers in the samples (Figure 2). Retention times of α -tocopherol and γ -tocopherol in the grains and flours of sorghum were approximately 5.8 and 13.5 minutes, respectively. Analyses were performed on the grain and sorghum flour in order to verify whether processing would affect the concentration of this nutrient. The concentrations of α -tocopherol, γ -tocopherol and total vitamin E are presented in Table 3.

In grains, the α -tocopherol concentration ranged from 83.9 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ in genotype CMSXS 136 to 167.9

$\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ in BRS 309 (Table 3). The concentrations of total vitamin E and γ -tocopherol did not differ between the studied genotypes ($p > 0.05$). For α -tocopherol, genotype CMSXS 136 presented a lower concentration, and did not statistically differ from BRS 305 and BR 700 ($p > 0.05$) (Table 3).

In the flours, the total concentration of vitamin E ranged from 220.7 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ for the genotype BR 007B to 386.9 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ for BRS 310. There was no difference in levels of total vitamin E and α and γ -tocopherol isomers ($p > 0.05$) of the eight genotypes studies (Table 3).

There was also no difference in the concentrations of γ -tocopherol and total vitamin E among grains and flours of the sorghum genotypes ($p > 0.05$). However, the concentration of α -tocopherol in the grains was higher in genotype BR 007B, BR 700 and BR 501 ($p > 0.05$). The α -tocopherol decreased in the flour of genotype BR 007B was 56.4%; for BR 700 this values was 8.3% and for BR 501 was 40%. This reduction may be relevant since the α -tocopherol isomer has the highest *in vivo* biopotency. This is because its plasma concentration is maintained at significant levels in the body, while the other absorbed compounds are almost completely excreted ²⁹.

Nutritional value of sorghum genotypes

Comparing the dietary fiber content of sorghum genotypes with the recommended values, it was demonstrated that 100 g of flour may contribute approximately 30 to 50% of the RDA (genotypes CMSXS 136 and BR 506, respectively). This genotypes may be

considered as an excellent source of dietary fiber and show the potential of this cereal for use in the prevention of chronic diseases and also in the regulation of intestinal function³⁰. Along with dietary fiber, sorghum contains elevated phenolic compounds concentrations and other components that may also help to prevent chronic diseases¹⁴.

All sorghum genotypes were considered sources of iron, phosphorus, magnesium and zinc, except for iron in genotype BRS 309. In relation to the vitamin E content, all genotypes presented low concentrations and cannot be classified as a source of this nutrient¹⁹.

CONCLUSION

The studied sorghum genotypes stood out as good sources of dietary fiber, iron, phosphorus, magnesium and zinc. Further, sorghum genotypes were classified as durum grain, suitable for elaboration of bakery products.

Further studies will be useful to increase knowledge on the approximate composition of these genotypes, including those related to phenolic compounds, flavonoids and anthocyanins, aiming to explore the functional potential of sorghum.

REFERENCES

1. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Grupo de Coordenação de Estatísticas Agropecuárias – GCEA/IBGE, DPE, COAGRO. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. [acesso 2010 fev 22.] Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201001_5.shtm].
2. Sanchez DA. White food-type sorghum in direct-expansion extrusion applications, in Food Science and Technology. Dallas: Texas A&M University; 2003.
3. Dicko MH, Gruppen H, Traoré AS, Voragen AGJ, Berkel WJHv. Review – Sorghum grain as human food in Africa: relevance of content of starch and amylase activities. *African J Biotech*. 2006;5(5):384-95.
4. Mohammed NA, Mohamed AIA, Babiker EE. Nutritional evaluation of sorghum flour (*Sorghum bicolor* L. Moench) during processing of injera. *Int J Biol Life Sciences*. 2010; 6(1):35-9.
5. Ítavo CCBF, Morais MG, Ítavo LCV, Souza ARDL, Davy FCA, Biberg FA, et al. Consumo e digestibilidade de nutrientes de dietas com silagens de grãos úmidos de milho ou sorgo, em ovinos. *Arq Bras Med Vet Zoot*. 2009;61:452-9.
6. Menezes LFG, Segabinazzi LR, Brondani IL, Restle J, Arboitte MZ, Kuss F, et al. Silagem de milho e grão de sorgo como suplementos para vacas de descarte terminadas em pastagem cultivada de estação fria. *Arq Bras Med Vet Zoot*. 2009;61:182-9.
7. Boudries N, Belhaneche N, Nadjemi B, Deroanne C, Mathlouthi M, Roger B, et al. Physicochemical and functional properties of starches from sorghum cultivated in the Sahara of Algeria. *Carboh Polymers*. 2009;78(3):475-80.
8. Mokrane H, Amoura H, Belhaneche-Bensemra N, Courtin CM, Delcour JA, Nadjemi B. Assessment of Algerian sorghum protein quality [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] using amino acid analysis and in vitro pepsin digestibility. *Food Chem*. 2010;121(3):719-23.
9. Mehmood S, Orhan I, Ahsan Z, Aslan S, Gulfranz M. Fatty acid composition of seed oil of different Sorghum bicolor varieties. *Food Chem*. 2008;109(4):855-9.
10. Anglani C, Sorghum for human food – A review. *Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum)*. 1998;52(1):85-95.
11. Barcellos LCG, Furlan AC, Murakami AE, Silva MAAd, Silva RMD. Avaliação nutricional da silagem de grãos úmidos de sorgo de alto ou de baixo conteúdo de tanino para frangos de corte. *Rev Bras Zootecnia*. 2006;35:104-12.
12. Méndez-Albores A, Martínez-Bustos F, Véles-Medina JJ, Moreno-Ramos C, Río-García JCD, Moreno-Martínez E. Efecto de la adición de ácido cítrico sobre la degradación de las aflatoxinas y las propiedades funcionales de productos extrudidos de sorgo. *Interciencia*. 2009;4:252-8.
13. Taylor JRN, Schober TJ, Bean SR. Novel food and non-food uses for sorghum and millets. *J Cer Science*. 2006;44(3):252-71.
14. Dykes L, Rooney LW, Sorghum and millet phenols and antioxidants. *J Cer Science*. 2006;44(3):236-51.
15. Gonzalez AJP. Specialty sorghums in direct-expansion extrusion. In Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey. Dallas: Texas A&M University; 2005.
16. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of the AOAC International. 17. ed. Gaithersburg: Association of Analytical Communities; 2002.
17. Gomes J, Silva M, Silva C. Análise de alimentos. 2. ed. Viçosa, MG: FUNARBE; 2003.
18. Guinaz M, Milagres RCRM, Pinheiro-Sant'Ana HM, Chaves JBP. Tocoferóis e tocotrienóis em óleos vegetais e ovos. *Quím Nova*. 2009;32:2098-103.
19. IOM. Dietary Reference Intakes: The Essential Guide to Nutrient Requirements. Washington, DC: NA Press; 2006.
20. Philippi S. Pirâmide dos alimentos: Fundamentos básicos da nutrição. Barueri, SP: Manole; 2008.
21. Borges JTDS, Pirozi MR, Lucia SMD, Pereira PC, Moraes ARFE, Castro VC. Utilização de farinha mista de aveia e trigo na elaboração de bolos. *B CEPPA*. 2006;4(1):145-62.
22. Antunes RC, Rodriguez NM, Gonçalves LC, Rodrigues JAS, Borges I, Borges ALCC, et al. Composição bromatológica e parâmetros físicos de grãos de sorgo com diferentes texturas do endosperma. *Arq Bras Med Vet Zoot*. 2007;59:1351-4.
23. Ragaee S, Abdel-Aal E-SM, Noaman M. Antioxidant activity and nutrient composition of selected cereals for food use. *Food Chem*. 2006;98(1):32-8.
24. Silva D, Queiroz A. Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos. Viçosa, MG: UFV; 2002.
25. Wang SH, Oliveira MFd, Costa PdS, Ascheri JLR, Rosa AG, Farinhas de trigo e soja pré-cozidas por extrusão para massas de pizza. *Pesq Agrop Bras*. 2005;40:389-95.

26. Naves MMV, Silva MS, Cerqueira FM, Paes MCD. Avaliação química e biológica da proteína do grão em cultivares de milho de alta qualidade proteica. *Pesq Agrop Trop*. 2004;1-8.
27. Tavares T, Carvalho F, Avaliação de exposição de populações humanas a metais pesados no ambiente: exemplos do recôncavo baiano. *Quím Nova*. 1992;47-154.
28. Berton R, Riscos de contaminação do agrossistema com metais pesados. *In*: Bettiol W, Camargo O, orgs. *Impacto ambiental do uso agrícola do lodo de esgoto*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente; 2000. p. 259-68.
29. Traber MG. Vitamin E: too much or not enough?. *Amer J Clin Nutr*. 2001;73(6):p. 997-8.
30. Stringheta PC, Oliveira TT, Gomes RC, Amaral MPH, Carvalho AF, Vilela MAP. Políticas de saúde e alegações de propriedades funcionais e de saúde para alimentos no Brasil. *Rev Bras Ciênc Farm*. 2007;43: 181-94.

Resíduos de inseticidas organofosforados: validação de método e ocorrência em hortícolas

Residues of insecticides organophosphorus: method validation and occurrence in vegetables

RIALA6/1474

Eliane Hooper AMARAL^{1,2}, Alexandre Augusto SOARES^{1,2}, Leandro Augusto Ferreira de SOUSA^{1,2}, Scheilla Vitorino Carvalho de SOUZA², Roberto Gonçalves JUNQUEIRA^{2*}

* Endereço para correspondência: ²Departamento de Alimentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Campus da UFMG, Pampulha, CEP 31270-010, Belo Horizonte, MG, Brasil. Tel. +55 (31) 3409-6913. E-mail: rjunqueira@ufmg.br

¹Laboratório de Análises de Resíduos e Agrotóxicos (LARA), Laboratório de Química Agropecuária (LQA), Instituto Mineiro de Agropecuária – IMA

Recebido: 06.09.2011 - Aceito para publicação: 30.04.2012

RESUMO

Foi validada uma metodologia de análise de multirresíduos para determinar inseticidas organofosforados clorpirifós, dimetoato, etiona, etopropós, parationa-metilica e pirimifós-metilico em amostras de alface, banana e tomate por cromatografia gasosa com detector termiônico específico. Foram realizados ensaios com curvas de solventes e de matriz em amostras brancas e adicionadas de padrões dos analitos. A linearidade da técnica foi obtida na faixa de 12 a 92 ng.mL⁻¹. Comprovou-se o efeito de matriz para a maioria dos analitos e matrizes estudados, com exceção de dimetoato em alface e clorpirifós em banana. As médias de recuperação, na faixa de quantificação, variaram de 81% a 104%. A metodologia apresentou precisão aceitável, com desvios padrão relativos, sob as condições de repetibilidade de 4,7% a 14,3% e precisão intermediária de 5,7% a 21,4%. Os limites de detecção e quantificação experimentais foram, respectivamente, de 5,0 µg.kg⁻¹ e de 8,0 µg.kg⁻¹. Os limites de decisão de 6,7 a 5,2 mg.kg⁻¹ e capacidades de detecção de 11,3 a 5,5 mg.kg⁻¹ foram estimados. Das 309 amostras coletadas e analisadas no estado de Minas Gerais, 18,4% apresentaram resíduos de organofosforados, dos quais 17,2% estavam em desacordo com a legislação vigente.

Palavras-chave. validação intralaboratorial, resíduos de organofosforados, cromatografia gasosa, análise de alimentos, ocorrência.

ABSTRACT

A multi-residue analysis methodology was validated for determining the organophosphorus compounds chlorfenvinphos, chlorpyrifos, dichlorvos, dimethoate, ethion, ethoprophos, parathion-methyl and pirimiphos-methyl in lettuce, banana and tomato samples by using gas chromatography using thermionic specific detection. Experiments using solvent and matrix-matched calibration curves, blanks and spiked samples were performed. The methodology linearity ranged from 12 to 92 ng.mL⁻¹. Matrix effect was proved to the majority of the investigated analytes and matrices, excepting dimethoate in lettuce and chlorpyrifos in banana. The recovery averages, at the quantification range, varied from 81 to 104 %. The technique showed the acceptable precision with relative standard deviations under repetitivity conditions from 4.7 to 14.3 %, and the intermediary precision from 5.7 to 21.4 %. The detection and quantification limits were 5.0 µg.kg⁻¹ and 8.0 µg.kg⁻¹, respectively. Decision limits from 6.7 to 5.2 mg.kg⁻¹ and detection capabilities from 11.3 to 5.5 mg.kg⁻¹ were estimated. Of 309 analyzed samples, collected from the state of Minas Gerais, 18.4 % showed organophosphorus residues, being 17.2 % in disagreement with legislation in force.

Keywords. in-house validation, organophosphorus residues, gas chromatography, food analysis, occurrence.

INTRODUÇÃO

A utilização dos agrotóxicos na agricultura iniciou-se na década de 1920, época em que eram pouco conhecidos do ponto de vista toxicológico. Durante a Segunda Guerra Mundial, foram utilizados como arma química, tendo seu uso se expandido enormemente a partir de então, chegando a produção industrial mundial a atingir dois milhões de toneladas de agrotóxicos por ano. No Brasil, foram primeiramente utilizados em programas de saúde pública, no combate a vetores e controle de parasitas, passando a ser utilizados mais intensivamente na agricultura a partir da década de 1960¹.

O aumento da produção de alimentos nos países desenvolvidos, e em grande parte dos países em desenvolvimento, se deve à modernização das práticas agrícolas, incluindo a mecanização, a utilização de variedades melhoradas, de fertilizantes e agrotóxicos². A maior utilização dos agrotóxicos é na agricultura, especialmente nos sistemas de monocultura, em grandes extensões. Estes são também utilizados em saúde pública, na eliminação e controle de vetores transmissores de doenças endêmicas. E, ainda, no tratamento de madeira para construção, no armazenamento de grãos e sementes, na produção de flores, para combate a piolhos e outros parasitas, na pecuária¹.

Segundo dados fornecidos pelo Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola (Sindag), em 2009, o Brasil consumiu o equivalente a US\$ 6,6 bilhões em agrotóxicos. Deste valor, o mercado de herbicidas representou 38% (US\$ 2,5 bilhões), seguido por inseticidas e acaricidas com 31% (US\$ 2,1 bilhões), fungicidas com 27% (US\$ 1,8 bilhões) e outros com 4% (US\$ 0,3 bilhões). O emprego de agrotóxicos nos estados do Mato Grosso, São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás e Minas Gerais representa 79% do total utilizado no país³.

No programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), foram analisados resíduos de agrotóxicos em 206 amostras de maçã e 169 amostras de mamão, da safra 2009/2010. As porcentagens de amostras com irregularidades foram de 4,37% e 10,65% para maçã e mamão, respectivamente⁴. No âmbito do Programa Nacional de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), foram analisadas, em 2009, 3.130 amostras de 20 culturas, das quais 907 (29%) foram consideradas insatisfatórias. A avaliação

das irregularidades observadas permitiu concluir que o maior problema no Brasil, no tocante aos níveis de resíduos de agrotóxicos, não está na forma de aplicação dos produtos e, sim, na utilização de agrotóxicos não autorizados para as culturas analisadas⁵.

Dentre os agrotóxicos utilizados na agricultura, merecem destaque os inseticidas organofosforados (OF), ésteres do ácido fosfórico com diferentes substituintes⁶. Os inseticidas OF estão entre os agrotóxicos mais utilizados no mundo atualmente e são bastante utilizados na produção agrícola e horticultura no Brasil⁷.

A preocupação pública com o excesso de resíduos de agrotóxicos ganhou relevância na última década. Uma determinação exata dos resíduos de agrotóxicos em frutas, vegetais e matrizes relacionadas é certamente necessária e de grande importância⁸. Assim, a obtenção de dados analíticos comparáveis e confiáveis é essencial tanto no contexto de programas de monitoramento de níveis de resíduos em alimentos para proteção da saúde pública quanto para a eliminação de barreiras técnicas nas relações comerciais entre países.

Normas nacionais e internacionais de sistemas de gestão da qualidade destacam a importância da validação de métodos analíticos para a obtenção de resultados confiáveis e adequados ao uso pretendido⁹. Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões equivocadas e a prejuízos irreparáveis. Então, para assegurar que um método analítico forneça informações confiáveis com interpretações corretas sobre a adequação de amostras, ele deve passar por uma avaliação denominada validação¹⁰. Mesmo que o método analítico já tenha sido objeto de um estudo colaborativo, ainda assim, o analista deve validá-lo no seu laboratório por meio de teste de recuperação e avaliação da linearidade, sensibilidade, seletividade, exatidão, precisão, limites de detecção e quantificação^{11,12}.

Diante do uso considerável de OF na agricultura brasileira, da toxicidade deste grupo de compostos e da necessidade de métodos devidamente validados para subsidiar ações de promoção da saúde relativas a este escopo analítico, o presente trabalho foi desenvolvido com objetivos de validar um método para determinação de inseticidas OF clorpirifós, dimetoato, etiona, etoprofós, parationa-metílica e pirimifós-metílico em alface, banana e tomate por cromatografia gasosa (CG) com detector termiônico específico e aplicar o método validado para monitoramento dos níveis de resíduos de OF em hortícolas produzidas em Minas Gerais.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos de validação e avaliação da ocorrência foram conduzidos nas dependências do Laboratório de Análise de Resíduos e Agrotóxicos (LARA) do Laboratório de Química Agropecuária (LQA) do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), em Contagem, MG, Brasil.

Reagentes e padrões

Acetato de etila e diclorometano grau para análise de resíduos (par) foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Acetona grau para análise (pa) foi da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Acetona PAR e n-hexano PAR foram adquiridas da Tédia (Fairfield, OH, EUA), sulfato de sódio anidro PA foi da Spectrum (New Jersey, EUA). Os padrões analíticos de agrotóxicos OF (clorpirifós, dimetoato, etiona, etoprofós, parationa-metilica e pirimifós-metilico) foram fornecidos por Ehrenstorfer (Augsburg, Alemanha).

Método de ensaio

O método validado e utilizado para análise de resíduos de inseticidas OF foi o método de multirresíduos descrito por Netherlands¹³.

A extração de 15 g (balança analítica Gehaka modelo HR-200) das amostras trituradas foi realizada em homogeneizador do tipo *ultra turrax* (Marconi modelo modelo MA102E) com acetona, sulfato de sódio e, em seguida, com solução de diclorometano:n-hexano (1:1, v/v). Após a extração, foi realizada uma filtração com auxílio de uma bomba de vácuo (Marconi modelo MA057). O eluato obtido foi evaporado em evaporador rotatório (Büchi modelo W240N), sendo o resíduo retomado em acetato de etila e injetado no equipamento de CG.

Na análise de resíduos de OF, foi utilizado um CG da marca Varian, modelo CP3800, equipado com amostrador automático modelo CP8200, detector nitrogênio e fósforo (DNF), detector fotométrico de chama pulsado (DFCP) e colunas cromatográficas capilares CP-Sil 19CB (14% cianopropil-fenil e 86% dimetilsilano, com 30 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro externo, 0,25 mm de diâmetro interno e espessura do filme de 0,25 µm). O DFPCP foi utilizado para confirmação dos inseticidas OF analisados.

Amostras para a validação

As amostras-branco de alfaces, bananas e tomates foram adquiridas diretamente de produtores e de lojas que revendem produtos orgânicos certificados em Belo Horizonte (MG).

As amostras foram trituradas (triturador Skymssen modelo CR-4L) e homogeneizadas, acondicionadas em sacos plásticos devidamente identificados e armazenadas sob congelamento entre -14 °C e -25 °C, até o momento dos ensaios.

Validação do método de ensaio

Os parâmetros seletividade, linearidade, efeito do dia, efeito de matriz, exatidão, precisão, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), limite de decisão (CC α) e a capacidade de detecção (CC β) foram estabelecidos em ensaios com soluções padrão, amostras-branco e amostras-branco adicionadas de padrão dos analitos¹⁴. A adequação para uso do método foi avaliada em função dos parâmetros estudados e respectivos critérios de aceitabilidade definidos.

Para verificação da seletividade foram observadas as resoluções dos picos, a capacidade do método de detectar e quantificar os organofosforados testados e a ausência de interferentes nos tempos de retenção dos analitos.

A linearidade dos métodos foi avaliada conforme procedimento descrito por Souza e Junqueira¹⁵. A avaliação do efeito do dia foi baseada nas curvas de calibração, empregadas para os estudos de linearidade, obtidas em três dias diferentes. As estimativas das inclinações e das interseções das curvas foram comparadas pelo teste de t^{16} aplicado a dois contrastes ortogonais.

O efeito de matriz foi verificado pelo método de adição de padrão em duas curvas de calibração paralelas, nas mesmas concentrações do analito, uma preparada com o solvente e outra com extratos de amostras-branco das matrizes estudadas. As curvas foram avaliadas como no estudo da linearidade e a interferência da matriz foi investigada pela comparação das inclinações e interseções das curvas, pelo teste de t^{16} .

Para os estudos de exatidão (recuperação) e precisão em condições de repetibilidade e reprodutibilidade parcial, foram preparadas amostras adicionadas de padrão dos analitos, em cinco níveis de concentração, na faixa da curva de calibração. Para cada nível de concentração estudado, doze replicatas verdadeiras e independentes foram divididas

em quatro lotes de três replicatas, sendo cada lote analisado independentemente, em diferentes dias, por diferentes analistas, simulando condições de precisão intermediária¹⁴. Os valores adotados como referência para avaliação da recuperação foram os estabelecidos pela European Commission¹⁷. Os valores de referência para a precisão intermediária foram os obtidos pelas equações de Horwitz¹⁸ ou de Thompson¹⁹, em função da concentração do analito, sendo adotado 2/3 dos valores de referência para avaliação da precisão em condições de repetibilidade²⁰.

O limite de quantificação foi a menor concentração na qual o método pode operar com precisão e exatidão aceitáveis. O limite de detecção foi a concentração mais baixa do analito detectada, mas não necessariamente quantificada, diferente de zero (sinal/ruído ³ 3)¹⁴.

O limite de decisão e a capacidade de detecção foram estimados de acordo com Van Loco e Beernaert²¹.

Estudo da ocorrência de resíduos dos inseticidas em hortícolas de Minas Gerais

As análises foram conduzidas no período de fevereiro a dezembro de 2010. Foram coletadas 307 amostras de hortifrutícolas, sendo 10 de alface, 52 de banana, 6 de batata, 16 de cenoura, 14 de chuchu, 14 de jiló, 59 de morango, 12 de pepino, 15 de pimentão e 111 de tomate.

A amostra de 44 municípios do estado de Minas Gerais, seguindo o procedimento do *Codex Alimentarius*²²: Alfredo Vasconcelos, Araguari, Arapuá, Barbacena, Bom Repouso, Caeté, Cajuri, Capim Branco, Carandaí, Caratinga, Carmo do Cajuru, Coimbra, Curvelo, Estiva, Gouveia, Igarapé, Jaboticatubas, Jaíba, Jequitibá, Lagoa Formosa, Maravilhas, Nova Ponte, Nova União, Onça do Pitangui, Paracatu, Paraopeba, Patrocínio, Piedade de Caratinga, Pimenta, Pirapora, Pouso Alegre, Rio Manso, Rio Paranaíba, Sabará, Sacramento, Santa Rita de Minas, Santo Antônio da Serra, São Joaquim de Bicas, São José da Lapa, Sete Lagoas, Teófilo Otoni, Uberaba, Unai e Vespasiano.

Os ingredientes ativos analisados foram: acefato, azinfós etílico, azinfós-metilico, clorfenvinfós, clorpirifós, clorpirifós-metilico, diazinona, diclorvós, dimetoato, dissulfotom, etiona, etoprofós, etrinfós, fenitrotiona, fentoato, forato, malationa, metamidofós, metidationa, mevinfós, monocrotofós, parationa-etílica, parationa-metilica, pirimifós-metilico, profenofós, perbufós e triazofós. As análises foram conduzidas empregando o método validado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Escolha de matrizes representativas

A seleção das matrizes representativas para a validação foi baseada no *Codex Alimentarius*²³. Foram escolhidos: a alface (elevado conteúdo de água e clorofila), a banana (elevado conteúdo de açúcar) e o tomate (elevado conteúdo de água e conteúdo escasso ou ausência de clorofila). Além disso, também foi levado em consideração o fato de estas culturas serem expressivas no estado de Minas Gerais.

Seletividade

Cromatogramas obtidos das soluções padrão de OF, amostras-branco e amostras adicionadas encontram-se representados na Figura 1, indicando seletividade do método.

Nas amostras-branco analisadas, não foram detectados (sinal/ruído < 3) picos cromatográficos nos tempos de retenção do OF pesquisados. Os perfis dos cromatogramas obtidos para soluções matriz foram semelhantes àqueles obtidos para as soluções padrão de organofosforados de concentrações correspondentes. A resolução dos picos (> 3,2) indicou capacidade do método em determinar clorpirifós, dimetoato, etiona, etoprofós, parationa-metilica e pirimifós-metilico sem interferências mútuas.

Linearidade

Os dados dispersos (*outliers*) detectados pelo cálculo dos resíduos padronizados Jackknife (externamente estudatizados) foram removidos. Os coeficientes de correlação de Ryan-Joiner indicaram que os desvios da normalidade não foram significativos com $p > 0,05$. A autocorrelação dos resíduos da regressão não foi observada ($p > 0,10$), visto que as estatísticas de Durbin-Watson demonstraram independência dos mesmos. A variância dos erros ao longo dos níveis de concentração estimada pelo teste de Levene modificado também não foi significativa ($p > 0,05$), indicando homoscedasticidade. Os dados obtidos foram avaliados como bem ajustados ao modelo linear. Significância da regressão ($p < 0,001$) e desvios de linearidade não significativos ($p > 0,05$) indicaram linearidade na faixa de 12 a 92 ng.mL⁻¹ para as três curvas dos seis OF pesquisados.

O emprego do coeficiente de correlação é predominante na avaliação da linearidade em métodos

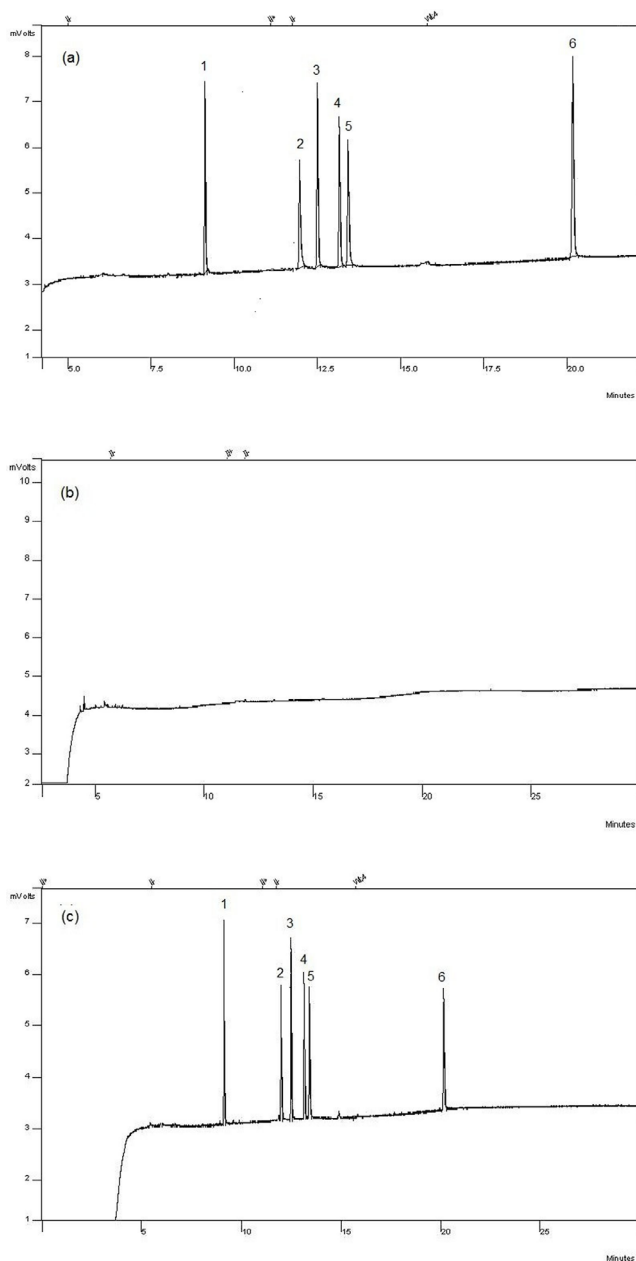


Figura 1. Cromatogramas típicos de soluções *pool* de padrões de organofosforados (a), amostras brancas (b) e soluções *pool* de padrões de organofosforados em solução matriz (c). Sendo: (1) etoprofos, (2) dimetoato, (3) pirimifós-metílico, (4) clorpirifós, (5) parationa-metílica e (6) etiona

Condições experimentais: temperatura do forno: 80 °C (espera 1 min), aquecimento de 30 °C.min⁻¹ até 200 °C (espera 3 min), aquecimento de 15 °C.min⁻¹ até 230 °C (espera 6 min), aquecimento de 5 °C.min⁻¹ até 250 °C (patamar 10 min); tempo total da corrida: 30 min; modo de injeção: *splitless*; temperatura do injetor: 230 °C, temperatura do detector: 300 °C, gás de arraste: hélio, fluxo do gás de arraste: 1,0 mL.min⁻¹, pressão: 12,8 psi e volume de amostra injetada: 1 µL.

para determinação de resíduos de agrotóxicos. Entretanto, este coeficiente não é adequado para demonstrar a linearidade^{15,24,25}.

Um método de microextração em fase sólida por “*headspace*” em combinação com CG ligado ao espectrometria de massas (EM) se mostrou eficiente para a extração e quantificação dos organofosforados diazinona, fenitrotiona, fentiona, parationa, bromofós-etílico e etiona em amostras de morango e ameixa. O método apresentou um coeficiente de correlação ($r > 0,986$) em uma faixa de linearidade de 50 a 500 µg.kg⁻¹.²⁶ Em um método de análise de OF por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de fluorescência e reação pós-coluna, assumiu-se uma relação linear entre a concentração do analito e a área dos picos dentro da faixa de 0,016 a 7,0 µg.mL⁻¹ com coeficiente de correlação de 0,9995²⁷. Um método multirresíduos para análise de OF utilizando DNF e captura de elétrons foi considerado linear com coeficientes da regressão de pelo menos 0,99²⁸.

Efeito do dia

Não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) quando as interseções foram comparadas, porém houve diferença significativa ($p < 0,001$) para a inclinação. Com base nestes resultados, foi possível observar que as curvas de solvente não forneceram as mesmas respostas nos três dias avaliados e, diante disso, novas curvas de padrões foram preparadas em cada análise para quantificação dos resíduos de inseticidas organofosforados.

Efeito de matriz

Nas três matrizes estudadas, as inclinações e interseções das curvas de solventes foram comparadas com aquelas estimadas para as curvas de matriz. Para alface, não houve diferença significativa entre as interseções, com exceção do etoprofos ($p < 0,05$); quanto à inclinação, não houve diferença para dimetoato ($p > 0,05$), enquanto os demais agrotóxicos apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$).

Nas matrizes de banana e tomate, não houve diferença significativa para interseções ($p > 0,05$); quanto à inclinação, não houve diferença para clorpirifós na matriz de banana, enquanto os demais agrotóxicos apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$). Diante disto, foi possível verificar que não há efeito de matriz para dimetoato em alface e clorpirifós em banana, enquanto os demais agrotóxicos apresentaram efeito de matriz.

Diante destes resultados, foi possível verificar que as curvas de solvente não fornecem as mesmas respostas que curvas com extrato de amostras contendo diferentes OF estudados, nas mesmas faixas de concentração, caracterizando efeito de matriz.

Segundo Ambrus²⁹, experiências práticas indicam que o efeito matriz varia de dia para dia durante o uso regular do método, dependendo das condições do sistema de CG (os injetores *on-column* induzem um menor efeito matriz que os injetores *split/splitless*). Conseqüentemente, a medida do efeito de matriz durante a validação do método fornece apenas uma indicação preliminar e este parâmetro deve ser reavaliado com uma certa frequência. Como alternativa, pode-se usar calibração com adição de padrão para demonstrar se o extrato branco da matriz disponível produz efeito idêntico ao extrato da amostra.

Foram testados os efeitos de matriz por meio da adição de padrão em método de multirresíduos, utilizando CLAE acoplada à EM. Produtos representativos foram escolhidos a fim de estudar a influência das várias matrizes. Os níveis de adição avaliados foram de 0,01 a 0,5 mg.kg⁻¹. Os pesquisadores concluíram que, como a influência da matriz pode ser muito variável de um dia para o outro, não é possível testar somente uma vez o efeito de matriz e, então, usar este resultado para cálculos futuros. Além disso, não é possível usar o efeito da matriz para um agrotóxico em uma matriz específica e prever o efeito da matriz de outros agrotóxicos na mesma matriz³⁰.

O efeito de matriz é maior em OF que contêm amidas, sulfonas, e/ou ligações P=O (por exemplo, dimetoato, ometoato, fosmete, dicrotofós, monocrotofós, malaxona e acefato). Os OF que não estiverem nestes grupos possuem menor efeito de matriz (exceto metamidofós). Os agrotóxicos que têm múltiplos de P=O ou amidas, tais como dicrotofós, monocrotofós e ometoato, foram afetados mais significativamente do que outros agrotóxicos com somente um único P=O ou amida. Fosmete e carbofentiona foram mais afetados devido às duas ligações =O. A quantidade do efeito relativo por grupo funcional pode ser observada comparando os resultados dos compostos com pequenas diferenças estruturais, tais como o dimetoato-ometoato, o parationa-paraoxona e o malationa-malaoxona. Terbufós e os pirazofós deram umas respostas mais elevadas na matriz em concentrações mais baixas³¹.

Recuperação e precisão

As médias de recuperação e desvios padrão relativos (DPR), sob condições de repetibilidade e precisão intermediária, obtidos para amostras de alface, banana e tomate adicionadas de resíduos de OF em níveis de concentração entre 8 a 62 µg.kg⁻¹ estão demonstrados na Tabela 1. Médias de recuperação e desvios aceitáveis foram atingidos para todos os OF avaliados. Estes resultados sinalizaram adequada recuperação e precisão do método validado, considerando os critérios de aceitabilidade determinados.

Um método analítico de multirresíduos para análise OF e piretróides equipado com colunas *narrow-bore* com detectores de captura de elétrons foi otimizado e validado, apresentando recuperações em torno de 70% a 108% com níveis de adição de padrões de 0,04 a 0,10 mg.kg⁻¹ para amostras de cenoura, melão e tomate. A recuperação mais baixa foi a de clormefós de 51,5%³².

Médias de recuperações entre 70% e 116% foram obtidas para os níveis de adição de 0,01 e 0,1 mg.kg⁻¹ com valores associados de DPR ≤ 20 % na maioria dos casos. As estimativas do desvio padrão da reprodutibilidade parcial (DPR_R) foram determinadas com base nas estimativas da incerteza associadas com a recuperação média observando valores de DPR³³.

Um método multirresíduos para análise de OF, utilizando DNF e captura de elétrons, apresentou uma recuperação de 80% a 108% para amostras adicionadas de uva e vinho²⁸.

Na validação de um método para determinação dos OF diazinona, fenitrotiona, fentiona, quinafós, triazofós, fosadona e pirazofós em frutas e sucos de frutas, os DPR, para análises em triplicata, das amostras fortificadas com 25 µg.kg⁻¹ de cada OF não eram maiores que 8,7%. Os testes de recuperação foram executados para concentrações entre 25 e 250 µg.kg⁻¹. As recuperações médias para cada agrotóxico foram de 75,9% a 102,6% para o suco e de 70% a 99% para a fruta, à exceção do pirazofós em fruta, com recuperação média de 53%³⁴.

Limites de detecção, quantificação, decisão e capacidade de detecção

O LD de OF para as três matrizes estudadas foi estabelecido como 5 µg.kg⁻¹ visto que foram detectadas com médias de sinal/ruído ≥ 3 nas amostras adicionadas. O LQ, correspondente ao menor nível de concentração no quais os experimentos indicaram exatidão e precisão

Tabela 1. Médias de recuperação e desvios padrão relativo, sob condições de repetitividade e reprodutibilidade parcial, obtidos para amostras de alface, banana e tomate adicionadas de organofosforados em diferentes níveis de concentração

Nível ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	Estatística	Ingrediente ativo					
		Clorpirifós	Dimetoato	Etiona	Etoprofós	Parationa	Pirimifós
Alface							
8	MR	92	104	104	87	93	93
	DPR _r	9,4	6,5	12,8	10,4	11,5	10,2
	DPR _R	10,1	9,5	12,8	17,6	15,4	12,0
35	MR	91	96	96	94	94	95
	DPR _r	9,7	13,0	14,3	7,2	8,9	8,5
	DPR _R	9,8	13,0	14,3	7,5	9,3	8,7
62	MR	93	98	92	93	96	94
	DPR _r	6,2	6,3	11,2	6,6	5,8	5,3
	DPR _R	6,4	7,3	13,1	7,8	6,0	5,7
Banana							
8	MR	96	91	95	95	92	89
	DPR _r	10,0	12,9	8,7	9,3	13,3	9,0
	DPR _R	10,7	20,6	9,3	13,5	17,8	13,1
40	MR	92	90	98	90	89	91
	DPR _r	11,8	14,1	9,7	8,4	12,4	11,5
	DPR _R	11,8	14,5	11,8	14,4	12,4	11,5
62	MR	88	90	95	90	90	89
	DPR _r	7,4	5,2	5,5	4,7	8,6	7,8
	DPR _R	13,1	10,9	21,4	10,1	19,4	14,0
Tomate							
8	MR	85	93	81	88	88	83
	DPR _r	12,8	13,3	9,9	6,3	8,2	8,8
	DPR _R	19,3	17,2	20,7	16,9	17,7	17,4
35	MR	90	94	88	88	93	93
	DPR _r	11,4	10,1	10,8	13,1	11,5	12,9
	DPR _R	14,7	11,8	16,5	13,8	13,1	16,2
62	MR	87	85	85	89	86	88
	DPR _r	12,9	12,4	10,2	10,4	10,3	11,0
	DPR _R	12,9	14,7	10,3	10,4	10,3	11,0

MR = média de recuperação, DPR_r = desvio padrão relativo de repetitividade, DPR_R = desvio padrão relativo da precisão intermediária. Critérios de aceitabilidade para MR: 70% a 110% (para 8 $\mu\text{g.kg}^{-1}$), 80% a 110% (para 35, 40 e 62 $\mu\text{g.kg}^{-1}$). Critério de aceitabilidade para DPR_r: $\leq 14,7\%$. Critério de aceitabilidade para DPR_R: $\leq 22\%$.

do método, foi de 8 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ nas matrizes alface, banana e tomate.

Os valores de $CC\alpha$ e $CC\beta$ encontrados para os analitos OF estudados nas diferentes matrizes foi de 6,7 a 5,2 mg.kg^{-1} e de 11,3 a 5,5 mg.kg^{-1} , respectivamente. O LMR adotado no cálculo destes parâmetros foi o estabelecido na legislação³⁵.

Um método para a determinação de OF (diazinona, fenitrotiona, fentiona, quinalfós, triazofós, fosadona e pirazofós) em peras e em amostras do suco de fruta foi desenvolvido e validado. Os LD do método para matrizes da fruta e do suco de fruta estavam abaixo de 2 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ para todos os OF³⁴.

Análise de resíduos dos inseticidas em hortifrutícolas

Das 309 amostras analisadas, 57 apresentaram resíduos de OF, o que significa 18,4% do total, sendo: 1 (10%) amostra de alface, 3 (50%) de batata, 1 (6,25%) de cenoura, 4 (28,6%) de jiló, 8 (13,6%) de morango, 2 (16,7%) de pepino, 4 (26,7%) de pimentão e 34 (30,6%) de tomate. Nas amostras de banana e chuchu, não foram detectados resíduos dos OF (resultados abaixo do LD) (Tabela 2).

Foram consideradas amostras em desacordo com a legislação vigente quando apresentaram presença de resíduos acima do LMR e resíduos de uso não autorizado para a cultura³⁵.

Das amostras que apresentaram resíduos, 53 estavam em desacordo com a legislação vigente,

representando 17,2% em relação ao total analisado. As amostras que apresentaram percentuais acima de 20% de resíduos em desacordo, em ordem decrescente, foram as culturas de tomate, jiló e pimentão. Na avaliação dos resultados obtidos, resíduos de uso não autorizado foram identificados nas culturas de alface, cenoura, jiló, morango, pepino, pimentão e tomate e resíduos acima do LMR foram identificados nas amostras de tomate. Assim, nas amostras de tomate, foram detectados resíduos de uso não autorizado e acima do LMR.

Tabela 2. Perfil dos resultados obtidos para as amostras analisadas do estado de Minas Gerais

Matriz	Números de amostras			Resíduos não autorizados
	Total analisado	Nível ≤ LMR	Nível > LMR	
Alface	10	-	-	1
Banana	52	-	-	-
Batata	6	3	-	-
Cenoura	16	-	-	1
Chuchu	14	-	-	-
Jiló	14	-	-	4
Morango	59	-	-	8
Pepino	12	-	-	2
Pimentão	15	-	-	4
Tomate	111	1	3	30
Total	309	4	3	50

LMR: Limite Máximo de Resíduo³⁵, (-): não detectado.

Entre as amostras analisadas, o ingrediente ativo encontrado em uma amostra de alface, foi acefato na concentração de 0,54 mg.kg⁻¹, sendo este agrotóxico não autorizado para a cultura. Das seis amostras de batata analisadas, três apresentaram resíduos de clorpirifós nas concentrações de: 0,01, 0,02 e 0,10 mg.kg⁻¹, abaixo do limite permitido, que é de 1,0 mg.kg⁻¹. Das 16 amostras analisadas de cenoura, uma apresentou clorpirifós na concentração de 0,01 mg.kg⁻¹, sendo este não autorizado para a cultura. Para o produto jiló, das 14 amostras analisadas, uma apresentou clorpirifós na concentração de 0,02 mg.kg⁻¹, duas metamidofós na concentração de 0,02 e 0,18 mg.kg⁻¹ e uma acefato na concentração de 0,18 mg.kg⁻¹, todos não autorizados para a cultura. Das 12 amostras de pepino analisadas, uma apresentou clorpirifós e outra acefato, ambos não autorizados para a cultura, na concentração de 0,02 mg.kg⁻¹. Das 15 amostras de pimentões, três apresentaram metamidofós nas concentrações de 0,05, 0,02 e 0,03 mg.kg⁻¹ e uma apresentou acefato na concentração de 0,04 mg.kg⁻¹, agrotóxicos não autorizados para a cultura.

Nas amostras de morangos, todos os ingredientes ativos encontrados eram autorizados para a cultura. As concentrações de acefato foram de 0,40 e 1,05 mg.kg⁻¹, de clorpirifós 0,01 e 0,04 mg.kg⁻¹, de metamidofós 0,02, 0,06 e 0,61 mg.kg⁻¹ e parationa-metilca 0,04, 0,06 e 0,19 mg.kg⁻¹.

Em monitoramento prévio, realizado em Minas Gerais em amostras coletadas na Ceasaminas, também foram encontrados resíduos de inseticidas OF não autorizados para a cultura do morango. Em 2003, foram detectados acefato em 4 amostras e metamidofós em 5 amostras. Em 2004, acefato, clorpirifós, dimetoato e metamidofós foram detectados em 3, 1, 1 e 4 amostras, respectivamente³⁶. Das 371 amostras de morango coletadas em 5 províncias no sudeste da Polônia, 76,1% não apresentaram resíduos e 23,9% apresentaram resíduos com níveis abaixo do permitido³⁷. Na Turquia, resíduos dos inseticidas OF foram pesquisados em 32 amostras de morangos, sendo que 71,9% apresentaram resíduos e 53,1% excederam o LMR e os ingredientes ativos encontrados foram diazinona, metidationa, parationa e clorpirifós. 21 amostras apresentaram resíduos de diclorvós, sendo que 15 excederam o LMR³⁸. Deve-se notar que, embora os resíduos de parationa e clorpirifós encontrados nas amostras de morango de Minas Gerais também tenham sido detectados nas amostras de morango da Turquia, o tipo de infração foi diferente, uma vez que estes agrotóxicos não são proibidos na Turquia para esta cultura. E também que continuam sendo encontrados resíduos de OF não autorizados.

Para a amostra de tomate, os ingredientes ativos encontrados variaram de 0,06 a 1,08 mg.kg⁻¹ para acefato, sendo 0,5 mg.kg⁻¹ o LMR. A concentração clorpirifós foi de 0,01 a 0,07 mg.kg⁻¹ e para metamidofós de 0,04 a 0,14 mg.kg⁻¹, sendo estes dois ingredientes não autorizados para cultura. Foram também encontrados 0,2 mg.kg⁻¹ de fentoato, cujo o LMR é de 0,1 mg.kg⁻¹ e 0,14 mg.kg⁻¹ de profenofós com LMR de 1,0 mg.kg⁻¹.

Entre as infrações constatadas nas amostras coletadas para análise de OF, o maior número se deveu à presença de produtos não autorizados para as culturas. Das 309 amostras coletadas, 16,2% apresentaram resíduos de OF não autorizados para a cultura e 1,0% apresentaram limites acima do permitido.

Os resultados apresentados neste trabalho não diferem de outros estudos de monitoramento existentes no Brasil. Nos resultados de 2009 do PARA, dos 29% de amostras que estavam em desacordo com a legislação,

23,8% eram de agrotóxicos não autorizados para a cultura e 2,8% estavam com níveis acima dos LMR permitidos⁵. Em monitoramento realizado em São Paulo com amostras coletadas no período de julho de 2009 a junho de 2010 na Ceagesp, das 450 amostras analisadas, 6% apresentaram resíduos de ingredientes ativos não registrados para a cultura e 4% acima dos LMR³⁹.

CONCLUSÃO

Os parâmetros de desempenho avaliados indicaram adequação para uso na análise de resíduos de OF em produtos agrícolas, atendendo aos limites regulamentados pela Anvisa³⁵.

Das 309 amostras analisadas, 18,4% apresentaram resíduos de OF, sendo que 17,2% em desacordo com a legislação vigente. Entre as amostras em desacordo, 94,3% apresentaram resíduos de OF não autorizados para a cultura e 5,7% apresentaram limites acima do permitido. Estes resultados sugerem a necessidade de maior orientação aos produtores tanto quanto à aplicação de agrotóxicos autorizados para as culturas como sobre a adoção de boas práticas agrícolas no emprego de doses seguras e do respeito ao período de carência. Os resultados deste trabalho sinalizam ainda para uma necessidade de avaliação no processo de registro e autorização de agrotóxicos para culturas de pequeno porte (*minor crops*).

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq (578643/2008-1), e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Fapemig (APQ-00923-08), pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Saúde. Organização Pan-Americana da Saúde. Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos. Brasília: MS/OPAS; 1997.
2. Campanhola C, Rodrigues GS, Bettiol W. Evolução, situação atual, projeção e perspectiva de sucesso de um programa de racionalização do uso de agrotóxicos no Brasil. In: Rodrigues GS. Racionalización del uso de pesticidas en el Cono Sur. Montevideo: Procisur; 1998. p. 43-9.
3. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola - SINDAG. Dados do mercado: o setor de defensivos agrícolas no Brasil. [acesso 2011 jan 05]. Disponível em: [http://www.sindag.com.br/dados_mercado.php].
4. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA. Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC). [acesso 2011 mar 01]. Disponível em: [http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/camaras_setoriais/.../PNCRC.pdf].
5. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). [acesso 2011 mar 01]. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/home/agrotoxicotoxicologia/].
6. Pagliuca G, Gazzotti T, Zironi E, Sicca P. Residue analysis of organophosphorus pesticides in animal matrices by dual column capillary gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection. *J Chromatogr A*. 2005;1071:67-70.
7. Heudorf U, Butte W, Schulz C, Angerer J. Reference values for metabolites of pyrethroid and organophosphorous insecticides in urine for human biomonitoring in environmental medicine. *Int. J. Hyg. Environ. Health*. 2006;209:293-9.
8. Cuadros-Rodriguez L, Munõz JA, González LE, Garcia-Ayuso LE, Casado AG. A new approach to qualitative analysis of organophosphorus pesticide residues in cucumber using a double gas chromatographic system: GC-pulsed-flame photometry and retention time locking GC/mass spectrometry. *Talanta*. 2003;60:433-77.
9. Barros CB. Validação de métodos analíticos. *Biológico*, São Paulo, 2002;64(2):175-77.
10. Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSE, Melo LFC. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quím Nova*. 2004;27(5):771-80.
11. Eurachem. The Fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics. 1998.
12. Soares LMV. Como obter resultados confiáveis em cromatografia. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*. 2001;60(1):79-84.
13. Holanda, Ministério de Saúde Pública, Bem-Estar e Esporte. Analytical Methods for Pesticide Residues in Foodstuffs, 6. ed. Amsterdam: RIVM; 1996.
14. Souza SVC, Pinto CT, Junqueira RG. In-house method validation: Application in arsenic analysis. *J Food Composit Anal*. 2007;20:241-7.
15. Souza SVC, Junqueira RG. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. *Anal. Chim. Acta*. 2005;552:25-35.
16. Snedecor GW, Cochran WG. Statistical methods. 8. ed. Ames: Iowa State University; 1989.
17. European Commission. Method validation and quality control procedures for pesticide residue analysis in food and feed (doc. N° SANCO/10684/2009). *Off J Eur Comm*. 2010.
18. Horwitz W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method performance studies. *Pure Appl. Chem*. 1995;67:331-43.
19. Thompson M. Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing. *Analyst*. 2000;125:385-6.
20. European Commission – EC. Commission 554 decision 2002/657/EC, 12 ago 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of results. *Off J Eur Comm*. 2002;221/8.

21. Van Loco J, Beernaert H. *In: Proceedings of European Food Chemistry*, 12, 2003, Brugges, Bélgica. Proceedings... Brugges: European Food Chemistry; 2003. p. 91-4.
22. Codex Alimentarius. Recommended methods of sampling for the determination of pesticide residues for compliance with MRLs. FAO Rome. CAC/GL 33; 1999.
23. Codex Alimentarius. Guidelines on good laboratory practice in residue analysis. FAO Rome. CAC/GL 40-1993; Rev.1; 2003.
24. Burke S. Missing Values, Outliers, Robust Statistics & Non-parametric Methods. LC-GC Europe, January; 2001;19-24.
25. Thompson M, Ellison SLR, Wood R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure Appl Chem*. 2002;74:835-55.
26. Lambropoulou DA, Albanis TA. Headspace solid-phase microextraction in combination with gas chromatography-mass spectrometry for the rapid screening of organophosphorus insecticide residues in strawberries and cherries. *J Chromatogr A*. 2003;993:197-203.
27. Pérez-Ruiz T, Matínez-Lozano C, Tómas V, Martín, J. High-performance liquid chromatographic assay of phosphate and organophosphorus pesticides using a post-column photochemical reaction and fluorimetric detection. *Anal Chim Acta*. 2005;540:383-91.
28. Oliva J, Barba A, Vela N, Melendreras F, Navarro, S. Multiresidue method for the rapid determination of organophosphorus insecticides in grapes, must and wine. *J Chromatogr A*. 2000;882:213-20.
29. Ambrus A. Worked example for validation of a multi-residue method. *In: Fajgelp A, Ambrus A. Principles and practices of method validation. Workshop on the principles and practices of method validation*, nov. 1999, Budapeste: Royal Society of Chemistry; 2000. p. 157-75.
30. Jansson C, Pihlström T, Österdahl BG, Markides KE. A new multi-residue method for analysis of pesticide residues in fruit and vegetables using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *J Chromatogr A*. 2004;1023:93-104.
31. Schenck FJ, Lehotay SJ. Does further clean-up reduce the matrix enhancement effect in gas chromatographic analysis of pesticide residues in food?. *J Chromatogr A*. 2000;868:51-61.
32. Gelsomino A, Petrovicová B, Tiburtini S, Magnani E, Felici M. Multiresidue analysis of pesticides in fruits and vegetables by gas chromatography followed by gas chromatography with electron-capture and mass spectrometric detection. *J Chromatogr A*. 1997;782:105-22.
33. Patel K, Fussella RJ, Macarthur R. Method validation of resistive heating-gas chromatography with flame photometric detection for the rapid screening of organophosphorus pesticides in fruit and vegetables. *J Chromatogr A*. 2004;1046:225-34.
34. Simplicio AL, Vilas Boas L. Validation of a solid-phase microextraction method for the determination of organophosphorus pesticides in fruits and fruit juice. *J Chromatogr A*. 1999;833:35-42.
35. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Monografias de Produtos Agrotóxicos. [acesso 2010 set 1]. Disponível em: [<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/home/agrotoxicotoxicologia/>].
36. Amaral EH, Altoe IMFF. Monitoramento de resíduos de agrotóxicos no morango de Minas Gerais. Belo Horizonte: CeasaMinas; 2005. (Boletim do Morango: cultivo convencional, segurança alimentar, cultivo orgânico).
37. Rogozinska K, Rupař J, Szpyrka E. Occurrence of pesticide residues in strawberries of south eastern Poland in 1996-2000. *Pestycydy*. 2001;33(37):3-4.
38. Durmusoglu E. Market basket monitoring of some organophosphorus pesticides on apple and strawberry in Izmir Province, Turkey. *Archiv für Lebensmittelhygiene*. 2003;54(1):16-20.
39. Gorenstein O. Monitoramento de resíduos de agrotóxicos em frutas e hortaliças frescas comercializadas na Ceagesp. *In: 44º Congresso Brasileiro de Olericultura*, julho de 2004; Campo Grande, MS.

Validation of new analytical methodology for determining fenoterolhydrobromide by HPLC: application in pharmaceutical products

Validação de uma nova metodologia analítica para determinação de bromidrato de fenoterol por CLAE: aplicações em produtos farmacêuticos

RIALA6/1475

*Helena Miyoco YANO¹, Fernanda Fernandes FARIAS¹, Marcelo Beiriz DEL BIANCO¹, Pedro Lopez GARCIA²

*Endereço para correspondência: 1Núcleo de Ensaios Físicos e Químicos em Medicamentos, Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes, Instituto Adolfo Lutz, Av. Doutor Arnaldo, 355, CEP: 01246-902, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: heleyano@ial.sp.gov.br

²Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

Recebido: 31.10.2011 - Aceito para publicação: 20.04.2012

RESUMO

Bromidrato de fenoterol é um agente agonista adrenérgico β_2 -seletivo, utilizado para tratamento de asma e doenças pulmonares crônicas obstrutivas. A metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi desenvolvida e validada para a determinação quantitativa de bromidrato de fenoterol. A condição analítica empregada incluiu coluna em fase reversa C_{18} (150 mm \times 3,9 mm d.i., 5 μ m) Thermo[®], fase móvel composta de mistura de acetonitrila e água (30:70, v/v) com 0,1% de trietilamina e pH ajustado para 5,0 com ácido fórmico, vazão de 1,0 mL.min⁻¹ e detecção em UV a 276 nm. A faixa de linearidade foi de 0,025 a 0,15 mg.mL⁻¹; a curva analítica mostrou coeficiente de correlação > 0,999. O limite de detecção (LD) foi de 0,003 mg.mL⁻¹ e o limite de quantificação de 0,012 mg.mL⁻¹. A repetibilidade da técnica (desvio padrão relativo) foi \leq 2,0% e a exatidão revelou média percentual de recuperação de 99,53%. A metodologia proposta é de simples execução, rápida, precisa, exata e sensível. As vantagens sobre as demais técnicas são baixo custo e poucas condições poluentes. Demonstrou, ainda, simplicidade e resultados confiáveis para ser aplicada no controle de qualidade de produtos farmacêuticos contendo bromidrato de fenoterol como ingrediente ativo.

Palavras chave. bromidrato de fenoterol, teste de estresse, cromatografia líquida de alta eficiência, validação analítica.

ABSTRACT

Fenoterol hydrobromide is a β_2 -adrenergic agonist agent used for asthma and chronic obstructive pulmonary disease treatment. HPLC methodology was developed and validated for quantitative determination of fenoterol hydrobromide. The methodology was achieved by using a reversed-phase C_{18} column, (150 mm \times 3.9 mm i.d., 5 μ m) Thermo. The mobile phase was consisted of acetonitrile: water (30:70, v/v) with 0,1% triethylamine, pH adjusted to 5.0 with formic acid and flow rate of 1.0 mL.min⁻¹ with UV detection at 276 nm. The concentration range was from 0.025 to 0.15 mg.mL⁻¹, and the correlation coefficient of analytical curve was >0.999. The detection limit and the quantifying limit (QL) were 0.003 mg.mL⁻¹ and 0.012 mg.mL⁻¹, respectively. Intra- and interday relative standard deviations were \leq 2.0%. The methodology accuracy showed the percentage mean of 99.53%. The described technique was found to be simple, rapid, precise, accurate and sensitive; the advantages over the others current methodologies are the low-cost and low-polluting conditions. Owing to its simplicity and reliable results, this methodology is suitable to be used in quality control of pharmaceutical drugs containing fenoterol hydrobromide as active component.

Keywords. fenoterol hydrobromide, stress testing, high performance liquid chromatography, pharmaceutical drug validation.

INTRODUCTION

Fenoterol hydrobromide (FEN), 1-(3,5-dihydroxyphenyl)-2-(4-hydroxy-methylphenylamino) ethanol hydrobromide. The molecular formula as bromide is $C_{17}H_{21}NO_4HBr$ and its molecular weight 384.3 g.mol^{-1} . FEN is a direct-acting sympathomimetic with beta-adrenoceptor stimulant activity largely selective for beta₂ receptors (a beta₂ agonist). It has actions and uses similar to those of salbutamol and is used as a bronchodilator in the management of reversible airways obstruction, as occurs in asthma and in some patients with chronic obstructive pulmonary disease. On inhalation, acts within a few minutes and has duration of action of about three to five hours¹. The drug product is available as a dry powder inhaler in some countries, may also be given orally for the relief of bronchospasm at a dose of 2.5 to 5 mg three times daily.

Various analytical methods have been applied for the determination of FEN in raw material, pharmaceuticals and biological fluids. These methods include liquid chromatography²⁻⁷, gas chromatography⁸, voltammetry^{9,10}, fluoro-immunoassay¹¹, coulometry¹², colorimetric-flow injection¹³, electrophoresis¹⁴⁻¹⁶ and spectrophotometry¹⁷.

The aim of this work was to develop and validate an efficient method using high performance liquid chromatography and applied to pharmaceutical preparations marketed in Brazil.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and samples

FEN (100 % on a dry basis) was kindly supplied by Prati-Donaduzzi and was used as a reference standard without further purification. Acetonitrile (HPLC grade), triethylamine (analytical grade) and formic acid (analytical grade) were obtained from Merck. Ultrapure water was obtained from a Milli-Q Plus apparatus. The oral solutions (samples A, B and C) containing 5 mg.mL^{-1} FEN were obtained from three different pharmaceutical companies. Placebos were prepared using EDTA, sodium chloride, hydrochloric acid (0.01 mole.L^{-1}) and benzalkonium chloride (pharmaceutical grade).

Equipment and analytical conditions

The method was performed on a chromatographic system, consisted of a solvent delivery pump model

305 and 306 (Gilson), an UV-VIS detector model 118 (Gilson), an auto injector fitted with $10 \mu\text{L}$ loop. A reversed-phase C_{18} column, ($150 \text{ mm} \times 3.9 \text{ mm i.d.}, 5 \mu\text{m}$) Thermo, was used for the separation. The mobile phase was acetonitrile:water (30:70, v/v) with 0,1% triethylamine and pH adjusted to 5.0 with formic acid and was filtered through a $0,45\text{-}\mu\text{m}$ filter Millipore (Millex HV) hydrophilic membrane. The flow rate was 1.0 mL.min^{-1} . The injection volume was fixed at $10 \mu\text{L}$, and UV detection was at 276 nm. All analyses were at room temperature and the mobile phase was prepared at the beginning of the day.

Method validation

The method was validated according to the International Conference on Harmonization¹⁸ and AOAC International¹⁹ guidelines for validation of analytical methods.

Selectivity and Specificity

The selectivity was assessed by comparing the chromatograms obtained from excipients (placebo). An amount of placebo equivalent to sample containing 12.5 mg FEN was used. Ingredients to prepare the placebo were similar to those presented in the commercial formulations and in the same ratio. The systems responses were examined in triplicate for the presence of interference or overlaps with FEN responses.

Forced degradation studies were performed in order to provide an indication of specificity of the method. The chemical oxidation was made with 3% of hydrogen peroxide, the acid hydrolysis with 1 mole.L^{-1} of hydrochloric acid, and the alkaline hydrolysis with 1 mole.L^{-1} of sodium hydroxide. All the solutions were heated at 80°C for four hours. After the degradation treatments, the samples were allowed to equilibrate to room temperature, neutralized with acid or base (when necessary), and diluted with mobile phase (0.075 mg.mL^{-1} of FEN). The samples were analyzed against a freshly prepared control standard solution (with no degradation treatment).

Linearity

A series of solutions containing FEN from 0.025 to 0.15 mg.mL^{-1} was obtained by appropriate dilutions of the standard stock solution. Water was used as the solvent for dilution. The calibration graph was obtained by plotting mean peak area versus FEN concentrations. All analyses were performed in triplicate.

Precision

A stock solution was prepared and stored refrigerated until use. Standard solutions of FEN were obtained by dilutions at 0.05 mg.mL⁻¹ in water. For quantitative determination in pharmaceuticals, an amount of sample equivalent to 10 mg of FEN was used to obtain final sample solutions of 0.06 mg.mL⁻¹ in water. On three consecutive days, three and ten separate aliquots of stock standard and stock sample solutions were diluted and analyzed. Duplicate determinations were made with each solution in each day and a mean response was calculated.

Accuracy

Known amounts of FEN were added to the samples and analyzed by the proposed method. Three aliquots of the standard solutions were used to fortify 2.0 mL sample solutions, in three separate volumetric flasks. The final FEN concentration of these fortified solutions was 0.100, 0.125 and 0.150 mg.mL⁻¹. All solutions were prepared in triplicate and analyzed.

Limit of Detection (LOD) and Limit of Quantification (LOQ)

LOD and LOQ for the proposed analytical method were determined based on standard error and slope of the analytical curve¹⁸.

Robustness

This parameter was evaluated by variations on the established chromatography conditions. The mobile phase composition was increasing and decreasing 1%, the flow rate was changed in 0,1 mL.min⁻¹ and the UV detection was analyzed in 275 and 277 nm. Triplicate measurements were made for each variation and the RSD value was calculated.

RESULTS AND DISCUSSION

To achieve this percentage of mobile phase it was tested different concentrations of organic and aqueous phase such as (50:50, v/v, 40:60, v/v and 80:20, v/v, respectively). A satisfactory separation and peak symmetry were obtained with mobile phase consisting of acetonitrile and water (30:70, v/v) with 0.1% triethylamine and pH adjusted to 5.0 with formic acid. The pH of the mobile phase was adjusted with formic acid after addition of triethylamine. pH lower than 3.5 and greater than 7.0

showed poor efficiency and symmetry. Quantitation was achieved with UV detection at 276 nm on peak area.

Selectivity and specificity

Specificity is the ability of the method to accurately measure analyte response in the presence of potential sample components (excipients and degradation product). All related excipients were used to prepare placebo sample solutions, which were analyzed by using the proposed method (Figures 1 and 2). The results were compared with those obtained for the analysis of the standard FEN solutions at the same concentration level. No interference from excipients was observed.

Linearity

The linearity was evaluated by analyzing standard solutions at six different concentration levels of FEN ranging from 0.025 to 0.15 mg.mL⁻¹. The correlation coefficient was found to be >0.999 indicating excellent correlation¹⁸. Relevant data on the linearity of the proposed methods is presented in Table 1.

Table 1. Linear regression and LOD and LOQ data

Statistical parameter	HPLC
Concentration range, mg.mL ⁻¹	0.025 - 0.15
Regression equation	$y = 7^{E+7}x - 63726$
Correlation coefficient (r)	0.9996
LOD, mg.mL ⁻¹	0.003
LOQ, mg.mL ⁻¹	0.012

LOD = Limit of detection; LOQ = Limit of quantification

Precision

The method precision was evaluated by measuring inter- and intraday repeatability. The intraday repeatability was evaluated by analyzing a single concentration of FEN in replicate (ten times) and is expressed in terms of RSD with the respective confidence interval. The RSD values were found to be <2.0%, indicating good intraday repeatability¹⁸ (Table 2). The interday repeatability (reproducibility) was determined by analyzing sample solutions prepared from the same stock solution on 3 consecutive days (in triplicate), at the same concentration level. Interday repeatability is expressed in terms of RSD values with the respective confidence intervals. The RSD values were also below 2.0% indicating good reproducibility for the method (Table 2).

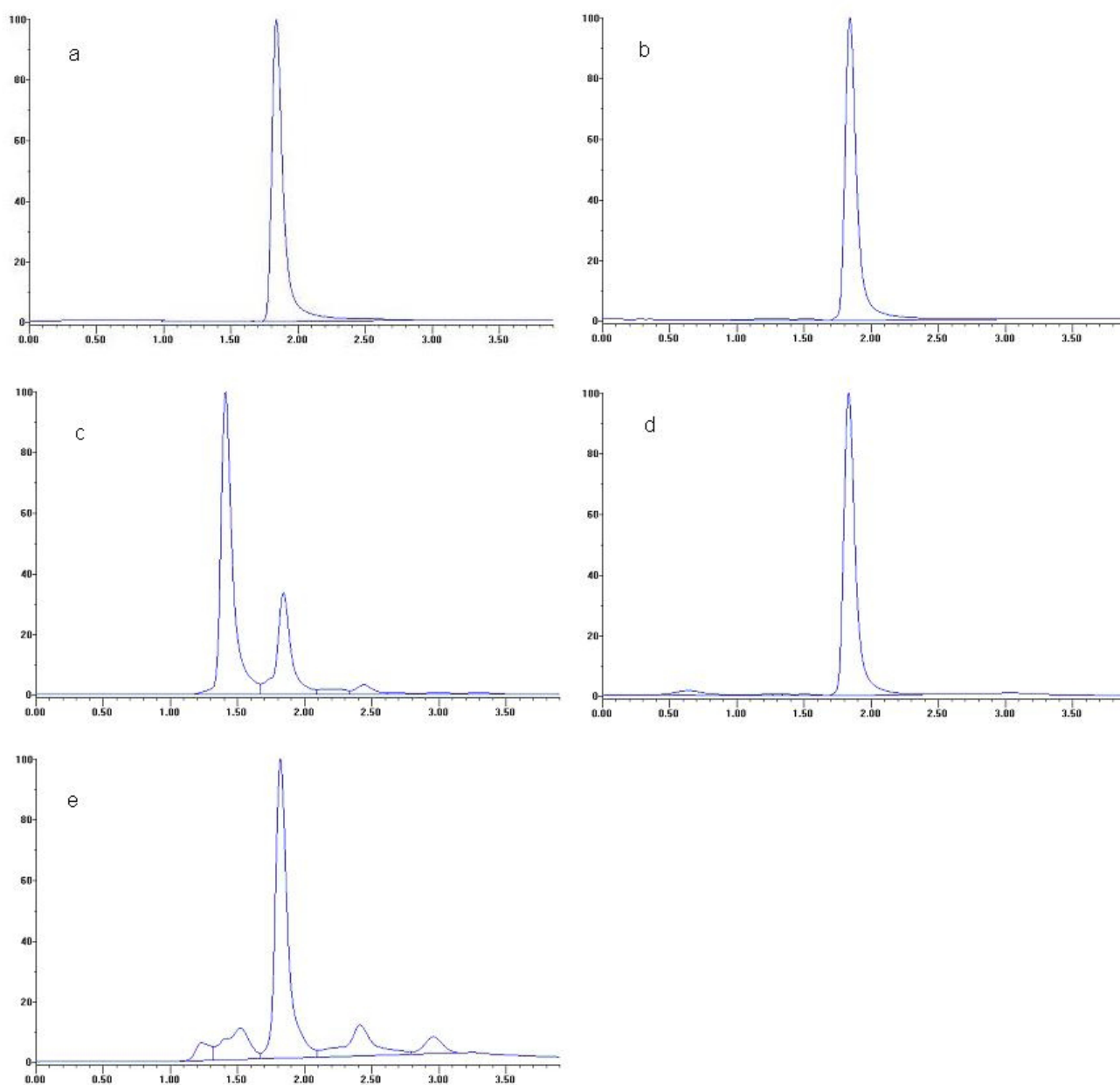


Figure 1. Representative chromatograms of FEN standard (a), neutral hydrolysis (b), chemical oxidation (c) acid hydrolysis (d) and alkaline hydrolysis (e). Concentration: $0.075 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Chromatographic conditions: Thermo C_{18} column (150 x 3.9 mm, 5 μm); mobile phase: acetonitrile:water (30:70, v/v) with 0,1% triethylamine and pH adjusted to 5.0 with formic acid; flow rate, $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, UV detection at 276 nm and temperature of $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$

Accuracy

Standard additions for fortification and recovery experiments were used to determine the accuracy of the proposed method. The accuracy of the method was checked at 3 concentration levels, 0.1, 0.125 and 0.15 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Triplicate analyses were performed with the

proposed method and the measurements were made at each concentration. Accuracy is expressed as the percentage of standard recovered from the sample matrix with the corresponding RSD and confidence interval. The mean recovery of FEN was excellent ranged from of 97.2% to 101.4%¹⁹, this data are showed in Table 3.

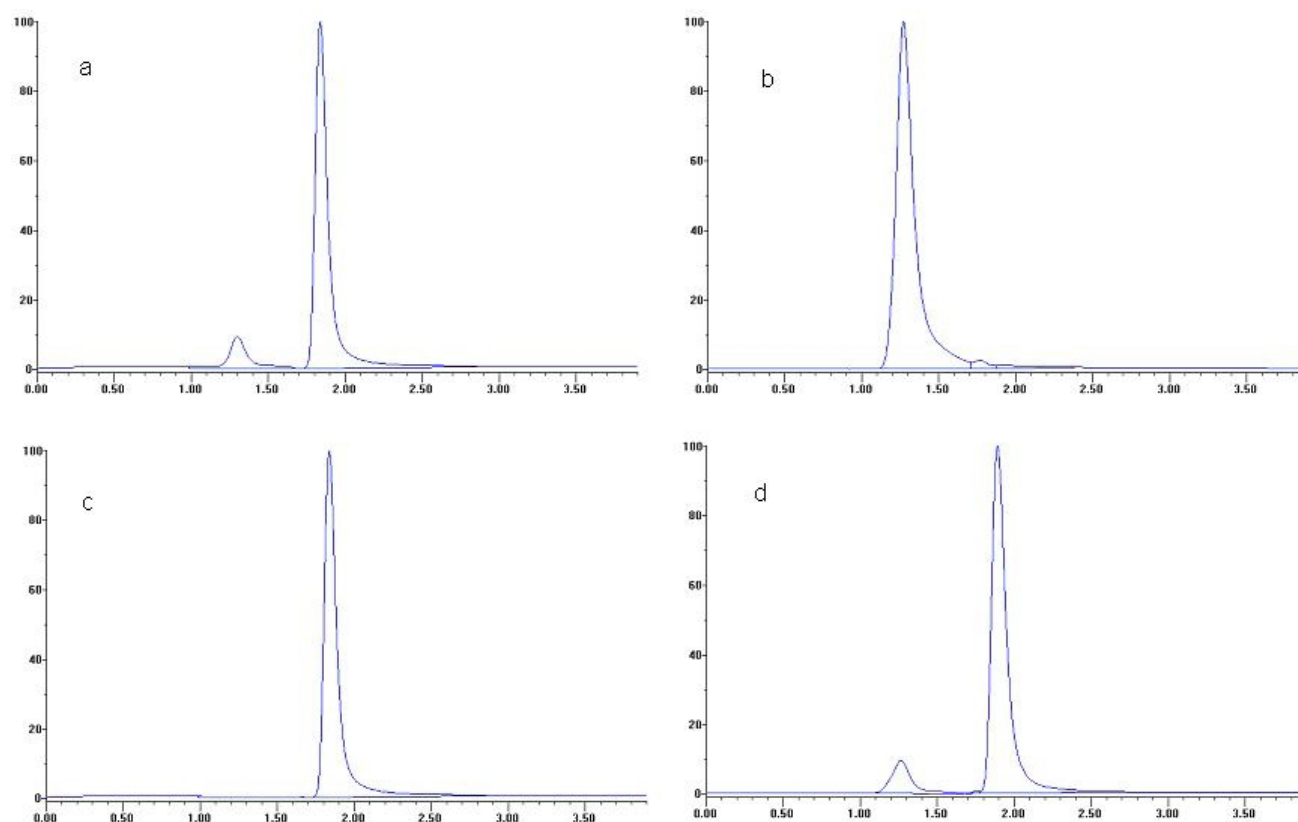


Figure 2. Representative chromatograms of sample A (a), placebo (b), FEN standard (c) and placebo with FEN standard added (d). Concentration: 0.1 mg.mL⁻¹ of FEN. Chromatographic conditions: Thermo C₁₈ column (150 x 3.9 mm, 5 µm); mobile phase: acetonitrile:water (30:70, v/v) with 0,1% triethylamine and pH adjusted to 5.0 with formic acid; flow rate, 1.0 mL.min⁻¹, UV detection at 276 nm and temperature of 20 ± 1 °C

Table 2. Precision results and statistical data obtained in the proposed method

Parameter	HPLC		
	Sample A	Sample B	Sample C
Intraday repeatability^a			
Day 1, mg.mL ⁻¹	5.21 ± 0.08	5.25 ± 0.06	5.01 ± 0.06
RSD, %	2.00	1.72	1.75
Day 2, mg.mL ⁻¹	5.12 ± 0.07	5.13 ± 0.07	4.89 ± 0.06
RSD, %	1.98	1.93	1.78
Day 3, mg.mL ⁻¹	5.19 ± 0.07	5.17 ± 0.07	4.94 ± 0.06
RSD, %	1.76	1.80	1.59
Interday repeatability^b			
Days 1-3, mg.mL ⁻¹	5.18 ± 0.04	5.19 ± 0.04	4.49 ± 0.04
RSD, %	2.00	1.99	1.96

^an = 10; calculated after statistical treatment by analysis of variance.

^bn = 30; calculation based on arithmetic mean.

Table 3. Results obtained for recovery of FEN added to sample A, B and C

Sample	HPLC		
	Added (µg.mL ⁻¹)	Found (µg.mL ⁻¹)	Recovery, % ^a
A	50.00	49.93	99.87%
	75.00	75.16	100.17%
	100.00	97.24	97.24%
B	50.00	50.37	100.5%
	75.00	74.69	99.58%
	100.00	97.92	97.92%
C	50.00	50.69	101.40%
	75.00	74.51	99.36%
	100.00	99.73	99.73%

^a = mean of three determinations

Limits of Detection and Quantitation

The limit of detection (LOD) and quantitation (LOQ) were determined for the proposed method. The limits were based on the standard deviation of the response and slope of the curve at the lowest concentrations¹⁸. The theoretical values obtained for LOQ were experimentally prepared and cross-checked by theoretical value. The LOD and LOQ were 0.003 and 0.012 mg.mL⁻¹, respectively (Table 1).

Stability

The standard of FEN was exposed to extreme conditions as acid and alkali solutions, oxidizing agents and temperature. After stress conditions, FEN was mainly degraded when was exposed to basic hydrolysis, the peak area was reduced in 45.4% to the standard not stressed and small unknown peaks were observed before and after of the FEN. In the exposure to chemical oxidation, the absorbance also revealed a decrease in 24.1% of the peak area, and for acid hydrolysis it was reduced in 5.8% in relation to the FEN standard.

Robustness

Robustness of analytical method is a measure of its capacity to remain unaffected by small but deliberate variations in method parameters and provides an indication of its reliability during normal usage¹⁸. This search evaluated the robustness under variations on the mobile phase, UV detection and the flow rate. Triplicate analyses were made for each variation and the values obtained showed that the changes with the mobile phase and UV detection was practically invariable, ranged from 98 to 102%. For the flow rate the recovery showed a variation slightly higher, but the method is still considered robust.

CONCLUSIONS

The proposed method for the determination of FEN in pharmaceutical formulations showed to be efficient and sensitive. Chromatographic parameters such as mobile phase, pH and flow rate can be modified to control FEN retention time on column. The excipients of the commercial samples assayed did not interference in the analysis and the absence of interference demonstrated the specificity of the method. The proposed method was found to be simple, rapid, precise, accurate, and sensitive. Once water was used as the solvent for dilution most of

the time it is a low-cost and low-polluting method. The method can be used for routine quality control of FEN in commercial samples. Factor such as mobile phase pH and acetonitrile concentrations should be controlled to obtain adequate resolution and separation.

REFERENCES

1. Gleiter CH. Fenoterol: Pharmacology and Clinical Use. *Cardiovasc Drug Rev*. 1999;17:87-106.
2. Jacobson GA, Peterson GM. High-performance liquid chromatographic assay for the simultaneous determination of ipratropium bromide, fenoterol, salbutamol and terbutaline in nebulizer solution. *J Pharm Biomed Anal*. 1994;12:825-32.
3. Poletini A, Montagna M, Hogendoorn EA, Dijkman E, van Zoonen P, van Ginkel LA. Applicability of coupled-column liquid chromatography to the analysis of β -agonists in urine by direct sample injection I. Development of a single-residue reversed-phase liquid chromatography-UV method for clenbuterol and selection of chromatographic conditions suitable for multi-residue analysis. *J Chromatogr A*. 1995;695:19-31.
4. Kramer S, Blaschke G. High-performance liquid chromatographic determination of the β_2 -selective adrenergic agonist fenoterol in human plasma after fluorescence derivatization. *J Chromatogr B*. 2001;751:169-75.
5. Meineke I, Steinmetz H, Kramer S, Gleiter CH. Determination of fenoterol in human plasma by HPLC with fluorescence detection after derivatization. *J Pharm Biomed Anal*. 2002;29:147-52.
6. Shen S, Ouyang J, Baeyens WRG, Delanghe JR, Yang Y. Determination of β_2 -agonists by ion chromatography with direct conductivity detection. *J Pharm Biomed Anal*. 2005;38:166-72.
7. Siluk D, Kim HS, Cole T, Wainer IW. HPLC-electrospray mass spectrometric assay for the determination of (R,R)-fenoterol in rat plasma. *J Pharm Biomed Anal*. 2008;48:960-4.
8. Henze MK, Opfermann G, Spahn-Langguth H, Schänzer W. Screening of β_2 -agonists and confirmation of fenoterol, orciprenaline, reproterol and terbutaline with gas chromatography-mass spectrometry as tetrahydroisoquinoline derivatives. *J Chromatogr B*. 2001;751:93-105.
9. Boyd D, Barreira-Rodriguez JR, Miranda-Ordieres AJ, Tunon-Blanco P, Smyth MR. Voltammetric study of salbutamol, fenoterol and metaproterenol at unmodified and Nafion-modified carbon paste electrodes. *Analyst*. 1994;119:1979-84.
10. Belal F, AL-Malaq HA, AL-Majed AA. Voltammetric determination of isoxsuprine and fenoterol in dosage forms and biological fluids through nitrosation. *J Pharm Biomed Anal*. 2000;23:1005-15.
11. Haasnoot W, Stouten P, Lommen A, Cazemier G, Hooijerink D, Schilt R. Determination of fenoterol and ractopamine in urine by enzyme immunoassay. *Analyst*. 1994;119:2675-80.
12. Nikolic K, Arsenijevec L, Bogavac M. Coulometric determination of some antiasthmatics. *J Pharm Biomed Anal*. 1993;11:207-10.
13. Tanabe S, Togawa T, Kawanabe K. Colorimetric flow injection determination of resorcinol-type β_2 -adrenergic drugs with phenanthro[9,10-d]imidazole-2-N-chloroimide. *Anal Sci*. 1989;5:513-6.

14. Wachs T, Sheppard RL, Henion J. Design and applications of a self-aligning liquid junction-electrospray interface for capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J Chromatogr B*. 1996;685:335-42.
15. Sirichaia S, Khanatharana P. Rapid analysis of clenbuterol, salbutamol, procaterol, and fenoterol in pharmaceuticals and human urine by capillary electrophoresis. *Talanta*. 2008;76:1194-8.
16. Ullrich T, Wesenberg D, Bleuel C, Krauss G, Schmid MG, Weiss M et al. Chiral separation of the β_2 -sympathomimetic fenoterol by HPLC and capillary zone electrophoresis for pharmacokinetic studies. *Biomed Chromatogr*. 2010;24:1125-9.
17. El-Shabrawy Y, Belal F, Sharaf El-Din M, Shalan S. Spectrophotometric determination of fenoterol hydrobromide in pure form and dosage forms. *Il Fármaco*. 2003; 58: 1033-8.
18. ICH Steering Committee, International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Q2(R1), novembro, Genebra, Suíça, 2005.
19. Association of Official Analytical Chemists International. *Official Methods of Analytical Chemists of AOAC International*, 17. ed., XX, 2003.

Tolerância de *Mycobacterium abscessus subsp. bolletii* a desinfetantes de alto nível

Tolerance of *Mycobacterium abscessus subsp. bolletii* to high-level disinfectants

RIALA6/1476

Aline da Silva Soares SOUTO¹, Bruna Peres SABAGH¹, Alessandra Oliveira de ABREU², Sérgio Alves da SILVA³, Daniella Cristina Rodrigues PEREIRA¹, Marta de Campos NEVES¹, Rodrigo Rollin PINHEIRO¹, Rafael Silva DUARTE⁴, Neide Hiromi Tokumaru MIYAZAKI¹ (im memoriam), Maria Helena Simões VILLAS BÔAS^{1*}

*Endereço para correspondência: ¹Setor de Saneantes, Departamento de Microbiologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4.365, CEP: 21040-900, Rio de Janeiro, Brasil. Tel.: +55 (21) 3865-5174, 3865-5103. Fax: +55 (21) 2290-0915. E-mail: maria.villas@incqs.fiocruz.br

²Secretaria de Estado de Educação, Governo do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

³Vice-Diretoria de Gestão da Qualidade, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil

⁴Laboratório de Micobactérias, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

Recebido: 31.08.2011 - Aceito para publicação: 04.05.2012

RESUMO

Mycobacterium abscessus subsp. *bolletii* (clone BRA100), entre outras micobactérias de crescimento rápido (MCR), tem sido isolada como agente etiológico de infecções localizadas e sistêmicas no Brasil. Neste estudo, foi avaliada a suscetibilidade de MCR pelo método confirmatório para Avaliação da Atividade Micobactericida de Desinfetantes frente a produtos à base de glutaraldeído, ácido peracético e ortoftalaldeído. Todos os produtos foram utilizados nas concentrações recomendadas pelos fabricantes. Foram avaliadas cinco cepas clínicas pertencentes ao clone BRA100, juntamente com as cepas de referência *M. abscessus* ATCC 19977, *M. chelonae* ATCC 35752, *M. fortuitum* ATCC 6841 e *M. abscessus* subsp. *bolletii* INCQS 00594. Os três desinfetantes à base de glutaraldeído não foram eficazes contra *M. abscessus* e *M. abscessus* subsp. *bolletii*. Os desinfetantes à base de ácido peracético demonstraram eficácia para todas as micobactérias empregadas, embora as cepas do clone BRA100 tenham demonstrado suscetibilidade reduzida ao ácido peracético B. O produto à base de ortoftalaldeído foi eficaz apenas frente a *M. chelonae*. Visando à redução de infecções nosocomiais, sugere-se que seja suspenso o uso de produtos à base de glutaraldeído como desinfetante de alto nível para quaisquer finalidades.

Palavras-chave. micobactérias de crescimento rápido, tolerância a desinfetantes, desinfetantes de alto nível, *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii*.

ABSTRACT

Mycobacterium abscessus subsp. *bolletii* (BRA100 clone), among others rapidly growing mycobacteria (RGM), has been isolated from patients with localized and systemic infections in Brazil. The aim of this study was to evaluate the RGM susceptibility to glutaraldehyde-, peracetic acid- and orthophtalaldehyde-based disinfectants by means of Confirmative Test for Determining Mycobactericidal Activity of Disinfectants. Five clinical strains belonging to the clone BRA100, and the reference strains *M. abscessus* ATCC 19977, *M. chelonae* ATCC 35752, *M. fortuitum* ATCC 6841, *M. abscessus* subsp. *bolletii* INCQS 00594 were evaluated. Three glutaraldehyde-based disinfectants were ineffective to *M. abscessus* and *M. abscessus* subsp. *bolletii*. The peracetic acid-based disinfectants showed effectiveness for all evaluated mycobacteria, although BRA100 isolates evidenced a reduced susceptibility to peracetic acid B. Orthophtalaldehyde-based product was effective to *M. chelonae* only. In order to reduce the nosocomial infections, it is suggested to discontinue the use of glutaraldehyde-based products, as high-level disinfectant, for any purpose whatever.

Keywords. rapidly growing mycobacteria, disinfectant tolerance, high level disinfectant, *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii*.

INTRODUÇÃO

As micobactérias pertencem ao gênero *Mycobacterium*, existindo atualmente 153 espécies e 11 subespécies com nomes aprovados¹.

As micobactérias ambientais (também chamadas de micobactérias atípicas, micobactérias não causadoras de tuberculose ou micobactérias outras que não tuberculosis) são consideradas oportunistas, já que se diferenciam dos membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (e de *M. leprae*) pelo fato de não serem patógenos obrigatórios, sendo encontradas como saprófitas, comensais e simbiontes. Nesse grupo de bactérias ambientais, estão presentes espécies de crescimento lento (observação de colônias após 7 dias ou mais de incubação) e espécies de crescimento rápido (quando são requeridos menos que 7 dias de incubação).

Runyon², em 1959, classificou as micobactérias atípicas com base no tempo de crescimento *in vitro* e na produção de pigmentos carotenóides em 4 grupos. Dentre as micobactérias de crescimento lento, no grupo I, encontram-se as fotocromogênicas, que produzem pigmento laranja ou amarelo quando expostas à luz; o grupo II é composto pelas escotocromogênicas semelhantes ao grupo anterior; porém, podem produzir os pigmentos mesmo na ausência de luz e no grupo III estão as acromogênicas que não produzem pigmentos. As micobactérias de crescimento rápido (MCR) formam o grupo IV, podendo apresentar-se pigmentadas ou não².

Entre as principais espécies de MCR relacionadas às doenças no homem, encontram-se *M. abscessus*, *M. chelonae* e *M. fortuitum*. Porém, essas infecções geralmente estão associadas a pessoas com fatores predisponentes ou imunocomprometidas, já que são micro-organismos que geralmente apresentam baixa virulência.

Há alguns anos as investigações e relatos de casos e surtos por MCR eram pouco frequentes no Brasil; porém, esse quadro foi sendo modificado ao longo do tempo. De 2003 a 2008, foram registrados vários surtos significativos por MCR após procedimentos invasivos em 22 diferentes estados brasileiros, com estimativa de mais de 2.000 casos suspeitos. O maior número de casos de infecções ocorreu no Rio de Janeiro, com quase 1.000 casos, seguido do Espírito Santo, onde foram notificados 363 casos. No estado do Pará, também foram notificados mais de 327 casos. Houve ocorrências também nos estados de Pernambuco, Roraima, Bahia, Mato Grosso do Sul, Piauí, Minas Gerais, Mato Grosso, Distrito

Federal, São Paulo, Goiás, Paraná, Rio Grande do Sul, entre outros. Entre os casos confirmados, cerca de 74% eram representados por pacientes do sexo feminino, em que a maioria havia sido submetida a cirurgias na região abdominal, sendo o vídeo a principal via de acesso do procedimento³.

Em 2007, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) publicou um alerta sobre infecções por micobactérias não causadoras de tuberculose após videocirurgia, informando dados sobre a presença, principalmente, de *M. abscessus* em estabelecimentos ligados à saúde, em várias localidades de norte a sul do país. A Rede Nacional de Investigação de Surtos e Eventos Adversos em Serviços de Saúde (Reniss) confirmou a ocorrência, em várias localidades dos Estados brasileiros, de infecções pós-cirúrgicas por MCR representados por *M. abscessus*, *M. chelonae* e *M. fortuitum* em pacientes submetidos a processos invasivos, devido principalmente à utilização de instrumentais ou artigos médicos que sofreram desinfecção de alto nível em solução de glutaraldeído, o que, na prática, clínica constitui uma das medidas para prevenir a disseminação de bactérias em ambientes relacionados à saúde⁴.

Em Belém, entre 2004 e 2005 foram isolados MCR de pacientes submetidos a procedimentos médicos invasivos, os quais foram inicialmente descritos como *M. abscessus* e mais recentemente caracterizados como *M. massiliense* e *M. bolletii*, que diferem apenas em 3 nucleotídeos, em relação ao gene *hsp65*⁷. Esse foi o primeiro surto significativo por *M. massiliense* no país, em que 58 isolados pertencentes ao mesmo clone, BRA100, foram detectados em pacientes submetidos a cirurgias de videolaparoscopia, em 16 hospitais privados. Já os isolados oriundos de biópsia após mesoterapia foram identificados como *M. bolletii*, pertencentes a vários clones⁵. As infecções foram caracterizadas por hiperemia local e formação de abscessos com aspecto inflamatório e secreções purulentas, além de não responderem à terapia antimicrobiana comum⁶.

Após este primeiro surto de infecções pós-cirúrgicas por *M. massiliense*, vários outros foram descritos e associados também a um único clone⁶. No estado do Rio de Janeiro, somente em 2006 e 2007, em 63 hospitais, foram identificados 1.051 casos suspeitos de infecções relacionadas a procedimentos videolaparoscópicos. Essas infecções acometeram principalmente a pele e o tecido celular subcutâneo e foram causadas por *M. massiliense*, pertencente ao clone BRA100, o mesmo encontrado no

surto de Belém. As principais manifestações clínicas eram a formação de abscessos, nódulos e ulcerações nos sítios de incisão^{6,7}.

Apesar de *M. massiliense* ter sido reconhecida como uma nova espécie em 2004, dentro do grupo *M. chelonae* – *M. abscessus*^{8,9}, devido a estudos genéticos realizados recentemente, esse micro-organismo foi renomeado como *M. abscessus* subsp. *bolletii*¹⁰.

Foi observado que o aspecto comum em todos os surtos foi o relato de que diferentes cirurgiões utilizaram seu próprio equipamento de laparoscopia desinfetado em solução de glutaraldeído a 2% entre uma cirurgia e outra⁵. Esse procedimento pode se tornar um grande problema, já que as MCR podem sobreviver sobre equipamentos desinfetados de forma inadequada, que, posteriormente, sendo utilizados em diagnósticos clínicos ou em cirurgias, podem consequentemente causar infecções nosocomiais.

Na tentativa de conter os surtos, várias resoluções foram publicadas pela Anvisa. Entre elas a resolução RDC nº 51, de 21 de outubro de 2009, que estabeleceu critérios para comprovação de eficácia de esterilizantes e desinfetantes hospitalares para artigos semicríticos frente à micobactéria *M. massiliense*¹¹.

Outra medida implantada pela Anvisa foi a adoção da RDC nº 33, de 16 de agosto de 2010, que proibiu o registro de novos produtos saneantes na categoria esterilizantes para aplicação sob a forma de imersão¹².

Os recentes surtos de infecções por MCR no país junto à falta de elucidação sobre a fonte real de contaminação por esses micro-organismos demonstram a necessidade urgente de estudos que analisem o comportamento dessas MCR envolvidas nos casos de infecções, principalmente o clone BRA100, pertencente à espécie *M. abscessus* subsp. *bolletii*, já que este é o clone predominante em todo o território nacional. Além disso, esta MCR foi inserida como micro-organismo de referência na legislação pertinente à comprovação da eficácia de desinfetantes de alto nível a fim de auxiliar na prevenção e no controle dessas doenças. Portanto, esse estudo tem como objetivo analisar o perfil de suscetibilidade de cepas de *M. abscessus* subsp. *bolletii*, provenientes de surto e pertencentes ao mesmo clone, assim como de outras MCR de referência frente a desinfetantes à base de glutaraldeído, ácido peracético e ortoftalaldeído por meio do Método Confirmatório para Avaliação da Atividade Micobactericida preconizado pela *Association of Official Analytical Chemist* e conforme POP INCQS nº 65.3210.004.

MATERIAL E MÉTODOS

Cepas bacterianas

Para avaliação da atividade micobactericida dos produtos desinfetantes utilizados no estudo, segundo a RDC nº 33, de 16 de agosto de 2010¹², foram utilizadas as cepas de referência *M. bovis* INCQS 00062 (BCG Moreau) e *M. abscessus* subsp. *bolletii* INCQS 00594.

Nos ensaios realizados visando à avaliação da suscetibilidade das MCR, foram utilizadas as cepas de referência da *American Type Culture Collection* (ATCC) de *M. abscessus* ATCC 19977, *M. chelonae* ATCC 35572 e *M. fortuitum* ATCC 6841. Além das cinco cepas clínicas de *M. abscessus* subsp. *bolletii* estudadas, pertencentes ao mesmo clone, BRA100 (CRM 0001, CRM 0002, CRM 0018, CRM 0019 e CRM 0020). Todas as cepas clínicas foram provenientes de surto epidêmico ocorrido em hospitais do Rio de Janeiro, entre 2006 e 2007, e foram caracterizadas e identificadas por meio de métodos fenotípicos e genotípicos pelo Laboratório de Micobactérias, do Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes (IMPPG/UFRJ) e pelo Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC/Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz). As cepas de referência de MCR e as cinco cepas clínicas do clone BRA100 foram cedidas pelo Laboratório de Micobactérias do IMPPG/UFRJ.

Produtos desinfetantes

Foram utilizados sete produtos desinfetantes de alto nível distribuídos entre três diferentes princípios ativos, sempre na concentração recomendada pelo fabricante do produto. Três produtos à base de glutaraldeído, sendo dois da mesma marca com lotes diferentes, denominados Glutaraldeído A e Glutaraldeído A1, os quais foram ativados imediatamente antes do ensaio. O terceiro produto pertencente à outra marca foi denominado Glutaraldeído B e é comercializado pronto para uso. Três produtos contendo ácido peracético em suas formulações, sendo dois pertencentes à mesma marca com lotes distintos, denominados Ácido Peracético A e Ácido Peracético A1. O produto com marca diferente foi denominado Ácido Peracético B. E um produto à base de ortoftalaldeído.

Avaliação do teor dos produtos desinfetantes

A avaliação do teor dos produtos à base de glutaraldeído foi realizada de acordo com o POP INCQS nº 65.3110.026¹³, tendo como princípio a reação entre o

glutaraldeído e cloridrato de hidroxilamina, liberando ácido clorídrico, que será neutralizado pela adição de trietanolamina em excesso. O restante de trietanolamina será titulado com solução de ácido sulfúrico e o volume obtido será utilizado para calcular o teor de glutaraldeído.

As metodologias utilizadas para avaliação do teor dos produtos à base de ácido peracético e ortoftalaldeído foram realizadas segundo metodologias utilizadas pelos fabricantes.

Método confirmatório para avaliação da atividade micobactericida dos produtos desinfetantes

Preparo das culturas teste

A partir das culturas estoque de *M. bovis* INCQS 00062 (BCG Moreau) e *M. abscessus* subsp. *bolletii* (INCQS 00594), foram inoculados, separadamente, tubos contendo caldo Proskauer-Beck modificado. Esses tubos foram incubados de acordo com a cultura teste a ser utilizada. Após esse período, o conteúdo foi homogeneizado em agitador de tubos e a suspensão ajustada a 20% de transmitância, no comprimento de onda de 650 nm, utilizando o mesmo meio de cultura. Essa suspensão bacteriana final foi utilizada para contaminar os cilindros de porcelana¹⁴.

Procedimento do ensaio

A avaliação da atividade micobactericida dos produtos desinfetantes à base de glutaraldeído, ácido peracético e ortoftalaldeído foi realizada por meio do Método Confirmatório para Avaliação da Atividade Micobactericida de Desinfetantes, segundo a AOAC¹⁵ e o POP INCQS nº 65.3210.004¹⁴. Resumidamente, 15-20 mL da suspensão a 20% de transmitância da cultura do micro-organismo teste, anteriormente preparada, foram empregados para contaminar 10-12 cilindros de porcelana com 8 ± 1 mm (diâmetro externo) x 6 ± 1 mm (diâmetro interno) x 10 ± 1 mm (comprimento) (Fisher Scientific Co. nº 7-907, Ceram Tec, North America). Essa contaminação foi realizada por imersão durante 15 minutos. Após esse tempo, os cilindros foram transferidos para placas de Petri forradas com duas folhas de papel de filtro e levados a incubação em estufa a 36 ± 1 °C durante 30 minutos para secagem. No ensaio propriamente dito, a intervalos de tempos de 1 minuto, cada um dos dez cilindros foi transferido, de forma cronometrada, para cada um dos 10 tubos contendo o desinfetante a ser testado. Após 30 minutos de contato com o desinfetante,

os cilindros foram transferidos, obedecendo ao mesmo intervalo de tempo (1 minuto entre cada transferência), para os respectivos tubos contendo 10 mL de soro de cavalo (Cecal, Fiocruz) e, depois, para os tubos contendo 20 mL de caldo Proskauer-Beck modificado (PB). A partir do tubo contendo soro de cavalo, foram retiradas alíquotas de 4 mL, das quais 2 mL foram transferidos para dois meios de subcultura adicionais: meio Middlebrook 7H9 (Difco) e meio de Kirchners (K), distribuídos em porções de 20 mL. Os tubos contendo os meios de cultura (caldo Proskauer-Beck modificado, meio Middlebrook 7H9 e meio de Kirchner) foram incubados inicialmente por 60 dias em estufa a 36 ± 1 °C e, no caso de ausência de crescimento ou crescimento tênue, os tubos foram reincubados por um tempo adicional de 30 dias¹⁴. Foram também realizados os controle da resistência do micro-organismo frente ao fenol por meio do método analítico adotado, controles de esterilidade (cilindros de porcelana, meios de cultura PB, K e 7H9, água purificada, lotes de pipetas e soro de cavalo) e viabilidade dos meios de cultura PB, K, 7H9. A leitura foi realizada por meio da presença ou ausência de crescimento microbiano. No caso de crescimento, este foi confirmado por meio da presença de BAAR (bacilos álcool – ácido resistentes), corando pelo Método de Ziehl-Neelsen. A interpretação dos resultados se baseia no critério que o desinfetante deve ser capaz de matar o micro-organismo teste sobre os dez cilindros carregadores presentes no meio PB, além de não poder ocorrer crescimento microbiano nas alíquotas de 2 mL do soro de cavalo inoculadas nos meios de cultura de K e 7H9¹⁴. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

Avaliação da suscetibilidade de micobactérias de crescimento rápido aos desinfetantes

Procedimento do ensaio

Foi realizado conforme descrito no item Método Confirmatório para Avaliação da Atividade Micobactericida dos Produtos Desinfetantes, porém foram utilizadas, como micro-organismos teste, as cepas de referência de *M. abscessus* ATCC 19977, *M. chelonae* ATCC 35572 e *M. fortuitum* ATCC 6841, e as cepas clínicas de *M. abscessus* subsp. *bolletii* CRM 0001, CRM 0002, CRM 0018, CRM 0019 e CRM 0020. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

De acordo com o número de tubos que apresentou crescimento nos ensaios de avaliação da

atividade micobactericida dos desinfetantes frente às cepas de MCR estudadas, foi estabelecido um critério de classificação em que as cepas foram consideradas fracamente tolerantes (1-10 tubos), médio tolerantes (11-20 tubos) e altamente tolerantes (21-30 tubos)¹⁶.

RESULTADOS

Análise química do teor

Dos 7 produtos desinfetantes analisados, apenas 2 (Glutaraldeído B e Ácido Peracético B) se encontravam dentro da faixa de aprovação do teor dos produtos. Todos os outros apresentavam desvio de qualidade, sendo que o Ácido Peracético A1 estava com teor 2 vezes acima do declarado. Não foi possível avaliar o teor do produto Ácido Peracético A (Tabela 1).

Tabela 1. Dados sobre a análise do teor dos produtos estudados

ANÁLISE QUÍMICA DO TEOR*			
Produtos	Concentração de uso	Teor	Faixa de aprovação
Glutaraldeído A	2%	81%	± 15%
Glutaraldeído A1	2%	83%	± 15%
Glutaraldeído B	2%	89%	± 15%
Ácido Peracético A1	0,2%	250%	± 15%
Ácido Peracético B	0,1%	102%	± 10%
OPA	0,55%	22%	± 15%

* Realizada segundo POP INCQS nº 65.3110.026 e metodologias seguidas pelos fabricantes.
OPA, Ortoftalaldeído

Avaliação da atividade micobactericida dos desinfetantes à base de glutaraldeído, ácido peracético e ortoftalaldeído

Produtos à base de glutaraldeído a 2%

Os produtos Glutaraldeído A e A1 não foram capazes de eliminar o micro-organismo teste *M. bovis* INCQS 00062 (BCG Moreau) em nenhum ensaio realizado, mesmo quando esse micro-organismo apresentou-se sensível ao controle de resistência frente ao fenol. Não foi realizada a avaliação da atividade micobactericida do produto Glutaraldeído A frente a *M. abscessus* subsp. *bolletii* INCQS 00594, pois já não havia quantidade suficiente do produto do mesmo lote para realização deste experimento. Na avaliação da atividade micobactericida do produto Glutaraldeído A1 utilizando *M. abscessus* subsp. *bolletii* INCQS 00594, foi observado crescimento em todos os 30 tubos dos meios de cultura empregados.

Em contrapartida, apesar de o Glutaraldeído B ser o único desinfetante à base de glutaraldeído que apresentou resultado satisfatório em relação à análise do teor (89% do declarado), quando sua atividade micobactericida foi avaliada, o produto não foi capaz de eliminar *M. bovis* e muito menos *M. abscessus* subsp. *bolletii* INCQS 00594. Todos os controles de esterilidade e viabilidade foram realizados e apresentaram resultado satisfatório, de acordo com o preconizado pela metodologia.

Produtos à base de ácido peracético

Os desinfetantes à base de ácido peracético demonstraram eficácia frente a *M. bovis* cepa INCQS 00062 (BCG Moreau) e *M. abscessus* subsp. *bolletii* INCQS 00594, com exceção do Ácido Peracético A, cuja avaliação da atividade micobactericida não foi realizada com *M. abscessus* subsp. *bolletii*, pelo mesmo motivo exposto para o Glutaraldeído A. O Ácido Peracético A e o Ácido Peracético A1 pertencem à mesma marca; porém, provêm de lotes diferentes. A realização do estudo com outro produto de mesma marca ocorreu devido à falta de dados com relação ao teor do princípio ativo do primeiro produto e também porque todos os micro-organismos analisados se mostraram sensíveis frente às diluições de fenol, gerando incertezas sobre a real eficácia do produto, já que este poderia estar agindo devido à sensibilidade das cepas. Com relação ao Ácido Peracético B, foram realizados dois ensaios com *M. abscessus* subsp. *bolletii*. No primeiro ensaio, quando foi aplicado o tempo de contato determinado pelo fabricante de 30 min, foi observado crescimento desta micobactéria em cinco tubos de meio de cultura; então, um novo ensaio foi realizado, alterando o tempo de contato do micro-organismo com o produto para uma hora. Neste segundo experimento, o micro-organismo foi eliminado, não ocorrendo crescimento em nenhum tubo. Com relação à análise do teor desses produtos, somente o Ácido Peracético B foi satisfatório (102% do declarado); já o mesmo não ocorreu com o Ácido peracético A1 que apresentou um desvio da qualidade, com um resultado de 250% do declarado. Todos os controles de esterilidade e viabilidade foram realizados e apresentaram resultado satisfatório, de acordo com o preconizado pela metodologia.

Produto à base de ortoftalaldeído

O produto apresentou resultado insatisfatório na análise do teor do princípio ativo, com apenas 22% do declarado, e, mesmo assim, foi capaz de eliminar

Tabela 2. Número de tubos apresentando crescimento no ensaio de avaliação da suscetibilidade de micobactérias de crescimento rápido frente a desinfetantes de alto nível à base de glutaraldeído

AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE DE MICOBACTÉRIAS DE CRESCIMENTO RÁPIDO										
Micro-organismos	Tempo de incubação até a primeira leitura	Glutaraldeído A			Glutaraldeído A1			Glutaraldeído B		
		N. de tubos positivos			N. de tubos positivos			N. de tubos positivos		
<i>M. abscessus</i> ATCC 19977	60 dias	3	9	1	0	4	6	0	6	10
<i>M. chelonar</i> ATCC 35752	60 dias	8	0	3	0	0	0	0	0	0
<i>M. fortuitum</i> ATCC 6841	60 dias	0	0	0	0	0	0	1	1	1
CRM 0001	15-20 dias*	10	10	10	10	10	10	10	10	10
CRM 0002	15-20 dias*	10	10	10	10	10	10	10	10	10
CRM 0018	15-20 dias*	10	10	10	10	10	10	10	10	10
CRM 0019	15-20 dias*	10	10	10	10	10	10	10	10	10
CRM 0020	15-20 dias*	10	10	10	10	10	10	10	10	10

* Ensaio que apresentaram crescimento em todos os tubos antes dos 60 dias foram retirados da estufa e desprezados; PB, Proskauer-Beck; K, Kirchners; 7H9, Middlebrook 7H9.

M. bovis INCQS 00062 (BCG Moreau). Porém, esse micro-organismo não se comportou dentro do padrão no controle de resistência frente ao fenol, o que pode tornar esse resultado inconclusivo, já que não se pode determinar se o produto é eficaz ou se o micro-organismo é que está sensível. O mesmo não ocorreu no ensaio utilizando *M. abscessus* subsp. *bolletii* INCQS 00594, em que a micobactéria apresentou comportamento dentro do padrão frente às diluições do fenol; porém, o produto não eliminou a micobactéria, já que foi observado crescimento em alguns tubos de meio de cultura. Todos os controles de esterilidade e viabilidade foram realizados e apresentaram resultado satisfatório, de acordo com o preconizado pela metodologia.

Avaliação da suscetibilidade de micobactérias de crescimento rápido aos desinfetantes

Produtos à base de glutaraldeído

Quanto à verificação da suscetibilidade das MCR frente aos produtos à base de glutaraldeído, *M. chelonae* foi eliminado pelos três desinfetantes, enquanto *M. fortuitum* por apenas dois desses (Glutaraldeído A1 e B), se classificando como médio tolerante, já que, no ensaio utilizando o Glutaraldeído A, houve crescimento do micro-organismo em 3 tubos contendo caldo Proskauer-Beck modificado, em 9 contendo meio de Kirchners e em um tubo com meio Middlebrook 7H9. Já *M. abscessus* se mostrou médio tolerante ao Glutaraldeído A, fracamente tolerante ao Glutaraldeído

A1 e altamente tolerante ao Glutaraldeído B, de acordo com o número de tubos positivos. As cepas clínicas de *M. abscessus* subsp. *bolletii* pertencentes ao clone BRA100 apresentaram comportamento altamente tolerante aos três desinfetantes, uma vez que ocorreu crescimento nos trinta tubos de meios de cultura empregados no experimento, em um tempo de incubação inferior (15-20 dias) ao preconizado pela técnica para a primeira leitura. Na Tabela 2, está apresentado o número de tubos de meio de cultura com crescimento positivo de acordo com cada um dos micro-organismos utilizados neste estudo frente aos produtos à base de glutaraldeído. Todos os controles de esterilidade e viabilidade foram realizados e apresentaram resultado satisfatório, de acordo com o preconizado pela metodologia.

Produtos à base de ácido peracético

Com relação aos produtos contendo ácido peracético, todas as micobactérias empregadas no estudo foram eliminadas pelos produtos Ácido Peracético A, A1 e B. Porém, é importante ressaltar o resultado insatisfatório obtido pelo Ácido Peracético A1 na avaliação do teor de princípio ativo (250% do declarado). Todos os controles de esterilidade e viabilidade foram realizados e apresentaram resultado satisfatório, de acordo com o preconizado pela metodologia.

Produto à base de ortoftalaldeído

Na avaliação da suscetibilidade das micobactérias utilizando o produto contendo ortoftalaldeído (OPA), *M.*

fortuitum se mostrou fracamente tolerante ao produto, ocorrendo a presença de crescimento em dois tubos com Proskauer-Beck e em um contendo Middlebrook 7H9. *M. chelonae* se apresentou sensível frente ao desinfetante. Na verificação da suscetibilidade de *M. abscessus*, foi observado crescimento da micobactéria em um tubo contendo caldo Proskauer-Beck e em um tubo com Kirchners, classificando-se como fracamente tolerante ao desinfetante. Quanto às cepas clínicas de *M. abscessus* subsp. *bolletii*, a CRM 0001 foi classificada como altamente tolerante ao produto, enquanto as cepas CRM 0002 e CRM 0020 se mostraram médio tolerantes, visto que foi observado crescimento em alguns tubos contendo os meios de cultura em um período de 30 dias após a incubação do ensaio. As cepas CRM 0018 e CRM 0019 também se apresentaram altamente e médio tolerantes, respectivamente. Todos os controles de esterilidade e viabilidade foram realizados e apresentaram resultado satisfatório, de acordo com o preconizado pela metodologia.

DISCUSSÃO

Recentemente, vários casos e surtos causados por MCR foram registrados no Brasil, relacionados em sua maioria com procedimentos cirúrgicos e estéticos, como videocirurgias, lipoaspiração, injeções subcutâneas de compostos sem registro com finalidade na área estética, implante de próteses mamárias e mesoterapia.

Diante dos surtos ocorridos no país de infecções por *M. abscessus* subsp. *bolletii* pertencentes ao mesmo clone BRA100, prevalente em todo território nacional, surtos esses relacionados principalmente às falhas nos processos de limpeza e desinfecção de produtos médicos³, houve a necessidade da realização deste estudo com objetivo principal de avaliar a suscetibilidade dessas cepas clínicas frente a três diferentes tipos de desinfetantes de alto nível.

No presente estudo, as cepas de *M. abscessus* subsp. *bolletii* clone BRA100 apresentaram comportamento altamente tolerante às soluções de glutaraldeído a 2%, quando aplicado o método analítico adotado. Tal tolerância foi observada frente aos três produtos à base de glutaraldeído, sendo detectado crescimento em todos os tubos contendo os diferentes meios de cultura em um tempo curto (20 dias ou menos) de incubação do ensaio.

Desinfetantes à base de glutaraldeído são ainda amplamente utilizados na desinfecção de alto nível

de artigos médicos; porém, vários relatos têm sido divulgados alertando sobre a tolerância de micobactérias a esse biocida¹⁸.

Mais recentemente, estudos mostraram que cepas de *M. abscessus* subsp. *bolletii* pertencentes ao clone BRA100 apresentaram resistência a altas concentrações de glutaraldeído, em um tempo que variou entre 30 minutos e 10 horas de exposição à solução comercial do produto, o que pode estar contribuindo para a disseminação do micro-organismo tolerante ao biocida em diferentes hospitais^{6,7}.

Fato semelhante ocorreu quando a cepa de referência *M. abscessus* subsp. *bolletii* INCQS 00594 foi testada frente aos produtos Glutaraldeído A1 e B, e esses produtos não foram capazes de eliminar a micobactéria.

Lorena et al.¹⁹ indicaram que a tolerância a altas concentrações de glutaraldeído é uma característica peculiar de *M. abscessus* subsp. *bolletii* pertencente ao clone BRA100, sugerindo que esse clone específico pode conter um mecanismo biológico de resistência não encontrado em outras cepas ou até mesmo em outras espécies.

Nos testes realizados no presente trabalho, a única cepa que se comportou de forma sensível frente aos três produtos à base de glutaraldeído a 2% foi *M. chelonae* ATCC 35572. O mesmo não ocorreu com *M. abscessus* ATCC 19977 e *M. fortuitum* ATCC 6841, já que não foram eliminados totalmente, como determina o método analítico adotado.

O mecanismo de tolerância dessas micobactérias ao glutaraldeído não está elucidado; porém, um fator relacionado à resistência pode ser as mudanças na superfície da parede celular bacteriana, resultando na diminuição da ligação ou penetração do biocida na mesma. E o uso difundido de glutaraldeído em ambientes hospitalares pode resultar na seleção de bactérias resistentes a drogas e desinfetantes²⁰.

O glutaraldeído a 2% sempre foi muito utilizado para desinfecção de endoscópios e, na prática, segundo Phillips e von Reyn²¹, faz-se o reuso da solução por até 14 dias, o que pode gerar uma diminuição de até 50% da concentração e, conseqüentemente, uma menor atividade micobactericida. Além disso, sem uma limpeza adequada, os equipamentos médicos podem acumular material orgânico, possibilitando a formação de biofilmes e, assim, prejudicar a ação do biocida⁵.

Sabe-se também que o uso regular de um mesmo desinfetante pode selecionar e, conseqüentemente,

possibilitar a proliferação de micobactérias que sejam resistentes a esse agente. Além disso, problemas relacionados à formulação dos produtos foram observados no presente estudo, já que foi detectado um desvio na qualidade com relação ao teor de princípio ativo dos desinfetantes Glutaraldeído A e A1, para os quais resultados insatisfatórios foram obtidos.

Tais resultados se apresentam em concordância com vários estudos citados anteriormente, sugerindo que cepas altamente tolerantes ao glutaraldeído estão disseminadas em ambientes hospitalares e estão presentes, principalmente, nos surtos de infecções por *M. abscessus* subsp. *bolletii* após procedimentos invasivos, já que o clone BRA100 se apresenta altamente tolerante a esse desinfetante^{6,18}.

Cepas tolerantes a glutaraldeído representam situação de emergência em saúde pública, já que essas cepas estão relacionadas ao desenvolvimento de resistência cruzada a vários antibióticos, inclusive aos que são usados no tratamento de infecções por MCR²⁰. Apesar disso, essa técnica de desinfecção com glutaraldeído ainda é empregada, já que a RDC nº 8, de 27 de fevereiro de 2009, não suspendeu o uso desse produto para o instrumental óptico utilizado nos procedimentos endoscópicos²².

Outros dois desinfetantes hospitalares indicados para desinfecção de artigos semicríticos são o ácido peracético e o OPA^{23,24}. Um estudo recente sugere como alternativa imediata para a prevenção de novos surtos a substituição do glutaraldeído por um desses dois produtos no processo de desinfecção de alto nível, já que foi observada suscetibilidade das cepas clínicas de *M. abscessus* subsp. *bolletii* do clone BRA100 aos desinfetantes à base de glutaraldeído, quando um teste em suspensão foi aplicado com tempos de 15 e 30 minutos de contato do micro-organismo com o desinfetante¹⁸. Walsh, Maillard e Russell²⁵ já haviam também sugerido essa substituição, uma vez que o OPA conseguiria inativar cepas resistentes ao glutaraldeído.

Outro estudo também comparou a atividade micobactericida do OPA e do glutaraldeído e concluiu que o primeiro produto se mostrou mais eficiente contra micobactérias, quando comparado ao glutaraldeído, em um teste quantitativo em suspensão na concentração de 0,5% (p/v)³². O OPA apresenta molécula de caráter lipofílico, o que sugere facilitar a penetração do biocida na parede celular, diminuindo a probabilidade de uma redução na concentração efetiva do produto e, conseqüentemente, sua ação²⁶.

Micro-organismos teste em outros trabalhos têm se mostrado suscetíveis ao OPA a 0,5%, quando é utilizado o teste em suspensão, em que o produto entra em contato direto com a bactéria. Quando o teste com carreador é aplicado, o mesmo não ocorre²⁵. No teste com carreador, as bactérias permanecem mais aderidas a uma superfície, se tornando menos acessíveis aos biocidas quando comparadas a uma suspensão homogênea, composta pelo produto analisado e o micro-organismo, como ocorre no teste em suspensão²⁶.

Esse fator poderia explicar os diferentes resultados obtidos no presente estudo. Já que todas as cepas clínicas de *M. abscessus* subsp. *bolletii* testadas foram tolerantes ao OPA. Cabe ressaltar que pertencem ao mesmo clone analisado por Lorena et al.¹⁹, clone BRA100. Por outro lado, o lote do produto utilizado apresentou um desvio significativo na qualidade, em que o teor do princípio ativo real era de apenas 22% do declarado pelo fabricante. O que pode representar uma forma de ameaça à saúde coletiva, já que lotes de desinfetantes que se apresentam fora dos padrões de qualidade exigidos podem estar sendo utilizados em ambientes ligados à saúde.

Desenvolver novas estratégias para desinfecção de alto nível é importante para evitar o surgimento de novas cepas resistentes. Uma possível alternativa que alguns estudos têm sugerido é a utilização de desinfetantes que contenham ácido peracético em suas formulações. Para Phillips e Von Reyn²¹, o ácido peracético é um agente que tem se apresentado eficiente na desinfecção de equipamentos médicos, como os endoscópios.

Estudos mostram que o tratamento diário de instrumentos com solução de glutaraldeído a 2% induz ao acúmulo e/ou a fixação de proteínas presentes no artigo a sofrer desinfecção. Situação similar foi observada com o uso de desinfetantes à base de ortoftalaldeído, porém em um menor grau. Já para os produtos que contêm ácido peracético, a fixação ou acúmulo de proteínas pode ocorrer; porém, são incomparáveis aos outros dois desinfetantes, sendo muito inferior. Devido a esses dados, na França, é recomendada a substituição de desinfetantes à base de glutaraldeído por aqueles que contêm ácido peracético e foi sugerido que se destaque a importância da completa limpeza prévia dos artigos²⁷.

No presente estudo, de acordo com os resultados apresentados, tanto as cepas de MCR de referência como as cepas clínicas de *M. abscessus* subsp. *bolletii* se mostraram sensíveis frente aos desinfetantes que contêm ácido peracético em suas formulações. Porém,

no primeiro ensaio da avaliação da qualidade do produto denominado Ácido Peracético B, utilizando a cepa de referência *M. abscessus* subsp. *bolletii* INCQS 00594, foi observado crescimento do micro-organismo em 3 tubos contendo caldo Proskauer-Beck e em um tubo de cada meio adicional (Kirchners e Middlebrook 7H9). Na repetição deste ensaio, houve variação no tempo de contato para uma hora e, então, não foi observado crescimento. Vale ressaltar que, dentre os três produtos testados, somente este último (Ácido peracético B) apresentou resultado satisfatório durante a avaliação do teor. Na análise do Ácido peracético A1, o teor foi de 250% do declarado pelo fabricante, gerando dúvidas quanto a sua real eficácia frente às micobactérias.

Stanley²⁸ testou cinco cepas de micobactérias resistentes a glutaraldeído isoladas de endoscópios, e dentre essas, duas cepas demonstraram um comportamento tolerante frente ao ácido peracético.

Os resultados aqui apresentados correspondem ao primeiro estudo utilizando o teste oficial de avaliação da eficácia de desinfetantes no Brasil e mostram propriedades biológicas muito diferentes de *M. abscessus* subsp. *bolletii* frente ao glutaraldeído, principalmente, quando comparado ao *M. bovis*, a cepa de referência usada na metodologia oficial da AOAC.

A inclusão de *M. abscessus* subsp. *bolletii* INCQS 00594 na legislação referente à comprovação da eficácia de desinfetantes de alto nível para artigos semicríticos, seguindo o POP INCQS nº 65.3210.004, por meio da Resolução RDC nº 51, de 21 de outubro de 2009¹¹, foi uma das alternativas encontradas na tentativa de prevenir infecções por micobactérias de crescimento rápido.

Uma pesquisa mais abrangente seria necessária, já que o número de cepas clínicas de *M. abscessus* subsp. *bolletii* utilizadas não foi extenso. Porém, algumas sugestões podem ser avaliadas para a adaptação da técnica, como a variação no tempo de incubação do ensaio, que atualmente é de 60 dias inicialmente e mais 30 dias em casos de não ser observado crescimento ou este se apresentar tênue. Esse tempo poderia ser reduzido para 30 dias de incubação em ensaios realizados com *M. abscessus* subsp. *bolletii*, já que a cepa de referência e todas as cepas clínicas dessa micobactéria testadas neste trabalho apresentaram crescimento dentro de um mês ou menos, dependendo do produto analisado. Essa redução seria favorável na obtenção de respostas mais rápidas em nível de vigilância sanitária; assim, medidas poderiam ser tomadas visando à promoção da saúde da população.

CONCLUSÃO

Visando a redução de infecções nosocomiais e, conseqüentemente, a promoção da saúde da população, sugere-se que o uso de produtos à base de glutaraldeído seja suspenso para quaisquer fins no que diz respeito à desinfecção de alto nível, já que todas as cepas de *M. abscessus* subsp. *bolletii* provenientes de surto e pertencentes ao clone prevalente no país foram tolerantes a esse desinfetante. E que uma possibilidade para substituição seria os produtos à base de ácido peracético.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/FIOCRUZ), pelo Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro (IM/UFRJ) e pela Organização Pan-Americana da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária (OPAS/ANVISA). Agradecemos o Laboratório de Saneantes e Cosméticos do INCQS pelas análises dos produtos saneantes

REFERÊNCIAS

1. Euzéby, JP. List of bacterial names with standing in nomenclature. Société de bactériologie systématique et vétérinaire. [acesso 2011 mar 31]. Disponível em: [<http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html>].
2. Fontana, RT. As micobactérias de crescimento rápido e a infecção hospitalar: um problema de saúde pública. *Rev Bras Enferm*. 2008;61(3):371-6.
3. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Relatório descrito de investigação de casos de infecções por Micobactérias Não Tuberculosas de Crescimento Rápido (MCR) no Brasil no período de 1998 a 2009. 2011. [acesso 2011 ago 25]. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/hotsite/hotsite_micobacteria/relatorio_descrito_mcr_16_02_11.pdf]
4. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Alerta sobre infecções por micobactéria não tuberculosa após videocirurgia. Informe técnico. 2007. [acesso 2009 abr 5]. Disponível em: [<http://www.anvisa.gov.br/divulga/informes/2007/070307.htm>].
5. Viana-Niero, C, Lima, CVBL, Lopes, ML, Rabello, MCS, Marsola, LR, Brilhante, VCR et al. Molecular characterization of *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* in isolates collected from outbreaks of infections after laparoscopic surgeries and cosmetic procedures. *J Clin Microbiol*. 2008;46:850-5.
6. Duarte, RS, Lourenço, MCS, Fonseca, LS, Leão, SC, Amorim, ELT, Rocha, ELL, et al. An epidemic of postsurgical infections caused by *Mycobacterium massiliense*. *J Clin Microbiol*. 2009;47(7):2149-55.
7. Lorena, NSO, Duarte, RS, Pitombo, MB. Infecção por micobactérias de crescimento rápido após procedimentos

- videocirúrgicos – a hipótese do glutaraldeído. *Rev Col Bras Cirurg*. 2009;36(3):266-7.
8. Adékambi T, Reynaud-Gaubert M, Greub G, Gevaudan MJ, Scola B, Raoult D et al. Amoebal coculture of “*Mycobacterium massiliense*” sp. nov. from the sputum of a patient with hemoptoic pneumonia. *J Clin Microbiol*. 2004;42(12):5493-501.
 9. Leão, SC, Tortoli, E, Viana-Niero, C, Ueki, SY, Lima, KV, Lopes, ML et al. Characterization of Mycobacteria from a Major Brazilian Outbreak Suggests that Revision of the Taxonomic Status of Members of the *Mycobacterium chelonae*-*M. abscessus* Group Is Needed. *J Clin Microbiol*. 2009;47(9):2691-8.
 10. Leão, SC, Tortoli, E, Euzéby, JP, Garcia, MJ. Proposal that the two species *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* be reclassified as *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* comb. nov., designation of *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* subsp. nov., and emendation of *Mycobacterium abscessus*. [acesso 2011 ago 25]. Disponível em: [<http://ijs.sgmjournals.org/content/early/2010/11/19/ijs.0.023770-0.long>] (*Int J Syst Evol Microbiol*. - online version).
 11. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 51, de 21 de outubro de 2009. Dispõe sobre a comprovação de eficácia de esterilizantes e desinfetantes hospitalares para artigos semicríticos frente à micobactéria *Mycobacterium massiliense* e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 21 out. 2009. [acesso 2010 set 29]. Disponível em: [http://bvsm.sau.gov.br/bvs/sau/legis/anvisa/2009/res_005121102009.html].
 12. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 33, de 16 de agosto de 2010. Dispõe sobre a proibição de registro de novos produtos saneantes na categoria “esterilizantes” para aplicação sob a forma de imersão, a adequação dos produtos esterilizantes e desinfetantes hospitalares para artigos semicríticos já registrados na ANVISA e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 18 ago 2010. p. 41-42.
 13. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (Rio de Janeiro – Brasil). Determinação do teor de glutaraldeído (POP 65.3110.026 Rev. 3). Rio de Janeiro: INCQS (Manual da Qualidade, Seção 4.3); 2009.
 14. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (Rio de Janeiro – Brasil). Método confirmatório para avaliação da atividade micobactericida de desinfetantes (POP 65.3210.004 Rev. 8). Rio de Janeiro: INCQS (Manual da Qualidade, Seção 4.3); 2009.
 15. Tomasino, S. Disinfectants. In: Horwitz W, Latimer G. Official Methods of Analysis of AOAC International. Texas: AOAC International; 2006. p. 28-29.
 16. Langsrud, S, Sundheim, G. Factors contributing to the survival of poultry associated *Pseudomonas* spp. exposed to a quaternary ammonium compound. *J Appl Microbiol*. 1997;82(6):705-12.
 17. Nomura K, Ogawa M, Miyamoto H, Muratani T, Taniguchi H. Antibiotic susceptibility of glutaraldehyde-tolerant *Mycobacterium chelonae* from bronchoscope washing machines. *Am J Infect Control*. 2004;32(4):185-8.
 18. Van Klingeren B, Pullen W. Glutaraldehyde resistant mycobacteria from endoscope washers. *J Hosp Infect*. 1993;25(2):147-9.
 19. Lorena NSO, Pitombo MB, Côrtes PB, Maya MCA, Silva MG, Carvalho ACS, et al. *Mycobacterium massiliense* BRA100 strain recovered from postsurgical infections: resistance to high concentrations of glutaraldehyde and alternative solutions for high level disinfection. *Acta Cirurg Bras*. 2010;25(5):455-9.
 20. Svetlíková, Z, Skovierová, H, Niederweis, M, Gaillard, JL, McDonnell, G, Jackson, M. Role of porins in the susceptibility of *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium chelonae* to aldehyde-based disinfectants and drugs. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(9):4015-8.
 21. Phillips MS, von Reyn CF. Nosocomial infections due to nontuberculous mycobacteria. *Clin Infect Dis*. 2001;33:1363-74.
 22. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 8, de 27 de fevereiro de 2009. Dispõe sobre as medidas para redução da ocorrência de infecções por Micobactérias de Crescimento Rápido – MCR em serviços de saúde. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 27 fev. 2009.
 23. Block SS. Peroxygen compounds. In: *Disinfection, Sterilization and Preservation*. Filadélfia: Lippincott Williams & Williams; 2001. p. 185. Disponível em: [http://bvsm.sau.gov.br/bvs/sau/legis/anvisa/2009/res0008_27_02_2009.html].
 24. McDonnell GE, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1999;12(1):147-79.
 25. Walsh SE, Maillard JY, Russell AD. Ortho-phthalaldehyde: a possible alternative to glutaraldehyde for high level disinfection. *J Appl Microbiol*. 1999;86(6):1039-46.
 26. Fraud S, Maillard JY, Russell AD. Comparison of the mycobactericidal activity of ortho-phthalaldehyde, glutaraldehyde and other dialdehydes by a quantitative suspension test. *J Hosp Infect*. 2001;48(3):214-21.
 27. Pineau L, Desburgois C, Marchetti B, Luu Duc D. Comparison of the fixative properties of five disinfectant solutions. *J Hosp Infect*. 2008;68(2):171-7.
 28. Stanley PM. Efficacy of peroxygen compounds against glutaraldehyde-resistant mycobacteria. *Am J Infect Control*. 1999;27(4):339-43.

Bifenilos policlorados em soro de homens e sua relação com o nível de antígeno prostático específico

Polychlorinated biphenyls in serum samples from male individuals and their relationship with the prostatic specific antigen levels

RIALA6/1477

Joseane de Oliveira MOZZAQUATRO¹, Susana MOHR², Marta Maria Medeiros Frescura DUARTE³, Ijoni Hilda COSTABEBER^{4*}

*Endereço para correspondência: ⁴Departamento de Morfologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil, Av. Roraima, 1.000, CEP: 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. Fone: (55) 3220-9375. E-mail: ijonicostabeber@gmail.com

¹Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil

²Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil

³Centro de Ciências da Saúde, Universidade Luterana do Brasil, Santa Maria, RS, Brasil, e Labimed – Análises Clínicas

Recebido: 31.08.2011 - Aceito para publicação: 29.06.2012

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi de determinar a concentração dos bifenilos policlorados (PCBs) 28, 52, 138, 153 e 180 em amostras de soro de indivíduos do sexo masculino, e de relacionar estes valores com os índices de antígeno prostático específico (APE) previamente pesquisado na população de estudo. A extração dos compostos foi realizada por hidrólise ácida, seguida da determinação e quantificação por meio de GC- μ ECD. Os PCBs 28 e 52 apresentaram-se abaixo do limite de quantificação em todas as amostras analisadas. Dentre os compostos detectados, o PCB 138 foi o mais frequente (75%) e de maior valor médio (2,05 ng.mL⁻¹); o PCB 153 foi detectado em 62,50% e o PCB 180, em 54,17% das amostras. Em relação aos níveis de APE, estes não apresentaram correlação significativa com as concentrações de PCBs nas amostras analisadas. Há escassez de trabalhos de análise desses compostos em amostras de soro de indivíduos humanos realizados no Brasil. Por conseguinte, realização de estudos adicionais são sugeridos para determinar os fatores causadores dessa contaminação, bem como novas investigações sobre a influência da concentração de PCBs sobre as taxas de APE nas amostras de soro de indivíduos do sexo masculino.

Palavras-chave. bifenilos policlorados, antígeno prostático específico, soro sanguíneo.

ABSTRACT

This study aimed at determining the polychlorinated biphenyls (PCBs) 28, 52, 138, 153 and 180 concentrations in serum samples from male individuals, and their relationship with the prostatic specific antigen levels which were previously determined. The compounds were extracted by acid hydrolyze methodology followed by gas chromatography with micro-electron-capture detection. PCBs 28 and 52 concentrations were lower than the quantification limit in all of analyzed samples. Among the detected compounds, the PCB 138 was mostly frequent (75%) and it showed the highest mean (2,05 ng.mL⁻¹); PCB 153 was detected in 62.50%, and PCB 180 in 54.17% of samples. Regarding to the prostatic specific antigen, no significant correlation with PCB concentration was found in the analyzed samples. No study on these compounds detection in the human serum sample has been reported in Brazil. Thus, the additional investigations might be conducted for determining the causes of this contamination, and also about the effect of PCB concentrations on the prostatic specific antigen levels in men sera.

Keywords. polychlorinated biphenyls, prostatic specific antigen, blood serum.

INTRODUÇÃO

A população humana está exposta a uma magnitude de compostos químicos, sejam eles naturais ou sintéticos, os quais são encontrados no meio ambiente. Nos últimos tempos, chama-se a atenção para os compostos químicos persistentes, que apresentam propriedades toxicológicas em humanos e são capazes de originar efeitos adversos no meio ambiente e, conseqüentemente, afetam diretamente a saúde. Os bifenilos policlorados (PCBs) são compostos organoclorados sintéticos, de alta persistência e toxicidade¹. Por este motivo, a sua produção e comercialização foram proibidas a partir de 1976 nos EUA, mas apenas em 1981 no Brasil², embora ainda seja permitida a utilização de equipamentos eletroeletrônicos que os contenham, até sua substituição. No entanto, casos de contaminação ambiental e intoxicação ainda são relatados pelos meios de comunicação, como conseqüência de incidentes em várias regiões.

Como os PCBs são persistentes e estão amplamente distribuídos no meio ambiente, acumulam-se na cadeia alimentar. A exposição humana aos PCBs é resultado desta contaminação ambiental. A ingestão por meio de alimentos contaminados é considerada a principal fonte³, mas estes compostos também podem ser transmitidos pela inalação e absorção dérmica em ambientes de trabalho⁴, por processos de combustão inadequados de resíduos industriais e urbanos⁵, e por acidentes com transformadores elétricos que contaminam a água⁶. Os compostos persistentes, em geral, se agregam aos tecidos e órgãos de onde são liberados lentamente para a corrente sanguínea, saturando o organismo com sua presença⁷. A pele e o fígado são os locais de maior ocorrência de patologias, mas o trato gastrointestinal, o sistema imunológico e o sistema nervoso são também afetados¹.

O mecanismo e a cinética da biotransformação dos PCBs dependem de inúmeros fatores, incluindo a capacidade metabólica do organismo e a estrutura do congêneres de PCB⁸. Os compostos mais clorados são mais persistentes, sendo absorvidos pelo sistema intestinal, acumulando-se principalmente nos tecidos gordurosos e fígado, em que podem permanecer por diversos anos. Já as formas menos cloradas entram na circulação hepática portal, são submetidas a um metabolismo primário e podem ser metabolizadas e excretadas^{6,9}. As principais rotas de eliminação dos PCBs são as fezes, a urina e o leite materno¹⁰.

Como conseqüência de sua alta persistência e alta tendência à bioacumulação, os PCBs continuam a ser detectados rotineiramente em amostras de tecido humano e animal. O soro e o plasma sanguíneo são as amostras mais frequentemente utilizadas para quantificar os biomarcadores da exposição humana aos poluentes orgânicos persistentes, tais como os PCBs¹¹. Estudos demonstram que a concentração dos PCBs no soro aumenta conforme a idade, devido ao seu grande poder de bioacumulação^{12,13}. Além da idade, o aumento de sua concentração também pode estar associado com o hábito de fumar e com o fato de residir em áreas de maior risco de contaminação^{14,15}.

O interesse público e científico por contaminantes ambientais, suas aplicações e a incidência de enfermidades neoplásicas em humanos tem aumentado nos últimos anos. Diversos estudos sugerem que a exposição humana aos PCBs está associada ao aumento da ocorrência de câncer de mama^{16,17,18}, câncer do trato biliar¹⁹, câncer de cólon²⁰, câncer de fígado, estômago, intestino e próstata²¹. Em estudo realizado com homens nos Estados Unidos, o aumento dos níveis de PCBs no soro sanguíneo foi associado com a baixa concentração de testosterona, comprovando a ação destes compostos tóxicos como disruptores endócrinos²².

Em relação ao câncer de próstata, este se sobressai como um grande problema de saúde pública mundial, tendo sido observado um aumento progressivo de sua incidência em vários países a partir de 1960²³. Porém, o número de mortes por câncer de próstata diminuiu, o que foi atribuído por alguns ao uso disseminado de estratégias de detecção baseadas no antígeno prostático específico (APE)²⁴. O APE é uma glicoproteína monomérica da família das proteases, a qual causa liquefação do líquido seminal, adicionando mobilidade ao espermatozóide e criando condições que o levam à fertilização. É produzido pelas células epiteliais, malignas ou não, sendo específico da próstata, e não do câncer de próstata. Seus níveis podem apresentar-se aumentados quando houver a presença de prostatite ou câncer de próstata. Segundo Fauci et al.²⁴, um homem com menos de 60 anos que apresentar um valor de APE superior a 2,6 ng/mL, deve realizar biópsia da próstata. Já homens que apresentarem APE superior a 4,0 ng/mL, com taxas de aumento maiores que 0,75 ng/mL ao ano, sugerem a presença de câncer de próstata, independente da idade. Embora exaustivamente pesquisado, o papel dos fatores ambientais na gênese do câncer de próstata

permanece, ainda, não muito bem compreendido, sendo enfatizada em alguns estudos a associação desta doença com componentes específicos da dieta, como o consumo de gorduras e carnes²⁵. No Brasil, pesquisas têm sido desenvolvidas na tentativa de esclarecer a relação entre câncer de próstata, além de outros tipos de câncer, e fatores ambientais e/ou ocupacionais^{26,27}.

Embora alguns estudos recentes tenham constatado a redução no nível de PCBs em seres humanos, estes ainda continuam a ser detectados com bastante frequência, devido ao seu alto poder de bioacumulação. O maior número de pesquisas encontra-se nos países da Europa, pois são os que possuíam fábricas de PCBs. Em geral, os congêneres 138, 153 e 180 são os que possuem as maiores concentrações de resíduos detectadas^{28,29,30}. Estes três congêneres, juntamente com os congêneres 28, 52, 101 e 118, são denominados “os sete indicadores”, responsáveis pela maior parte da contaminação ambiental.

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi determinar a concentração dos PCBs indicadores 28, 52, 138, 153 e 180 em amostras de soro de homens, relacionando os resultados encontrados com os níveis de APE.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Para a realização do presente estudo, foram coletadas 24 amostras de sangue venoso de homens residentes na região central do Rio Grande do Sul. Para a determinação dos congêneres de PCBs, utilizou-se o soro, obtido por centrifugação do sangue. Após a centrifugação, as amostras foram armazenadas até o momento das análises a uma temperatura de -20 °C. Os níveis de APE foram determinados por um laboratório de análises clínicas de Santa Maria, por meio do método de quimioluminescência. O protocolo aplicado foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFSM por meio da Carta de Aprovação número 043/04.

Padrões e reagentes

Uma solução estoque de PCBs contendo 10 µg mL⁻¹ dos congêneres 28 (2,4,4'-triclorobifenil), 52 (2,2',5,5'-tetraclorobifenil), 138 (2,2',3,4,4',5'-hexaclorobifenil), 153 (2,2',4,4',5,5'-hexaclorobifenil) e 180 (2,2',3,4,4',5,5'-heptaclorobifenil) foi utilizada na

identificação e nas etapas de validação dos métodos. Os padrões foram adquiridos de SUPELCO, Inc. (Bellefonte, Pensilvânia, EUA), com certificado de pureza superior a 99%. O solvente utilizado nas extrações e ensaios cromatográficos foi *n*-hexano Nanograde[®] com certificação para análises de resíduos de pesticidas (Mallinckrodt Baker, Inc., NJ, USA). Foram também utilizados ácido sulfúrico PA (Vetec Química Fina Ltda, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil) e nitrogênio grau analítico (White Martins, Praxair Inc.).

Análises dos PCBs

Para a extração dos PCBs, utilizou-se método publicado anteriormente por Mohr et al. (2011)³⁰. As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo a gás HP 6890 *Plus* equipado com micro detector de captura de elétrons (GC-µECD) (Agilent, Palo Alto, USA). A amostra extraída (1 µL) foi introduzida em um injetor *splitless*, o qual manteve temperatura constante de 280 °C. A separação dos analitos foi realizada em uma coluna capilar de sílica fundida HP-5 (30 m × 0,32 mm × 0,25 µm), utilizando o nitrogênio como gás de arraste sob pressão constante de 7,2 psi, fornecendo uma vazão inicial de 1,5 mL.min⁻¹. A programação da temperatura do forno foi: 60 °C (2 min), 30 °C/min até 190 °C (5 min), 5 °C/min até 220 °C (5 min), e 20 °C/min até 300 °C (1 min). A temperatura do detector foi mantida a 320 °C. A identificação e quantificação dos compostos foram realizadas pela comparação dos tempos de retenção dos picos encontrados nas amostras com os tempos de retenção individuais dos padrões de bifenilos policlorados em estudo, sob as mesmas condições de trabalho.

A eficiência do método utilizado foi avaliada por meio dos seguintes parâmetros analíticos: linearidade (>0,99), precisão (<12,55%), recuperação (72,9 a 119,1%), limite de detecção (0,1 ng.mL⁻¹ para todos os PCBs) e limite de quantificação (0,25 ng.mL⁻¹ para o PCB 28 e 0,5 ng.mL⁻¹ para os demais PCBs).

Análises estatísticas

As concentrações que ficaram abaixo do limite de quantificação (LQ) foram consideradas como a metade do limite de detecção (LD) para o cálculo das médias e da mediana. Os dados foram analisados pelo software *Statistica* 6.0. O teste *t* de Student foi utilizado para comparar as médias dos resíduos de PCBs entre grupos que apresentaram níveis de APE menores ou maiores do que 2,6 ng mL⁻¹. Os efeitos dos níveis de PCBs em soro

Tabela 1. Frequência de determinação e concentrações dos PCBs em ng mL⁻¹ (média, desvio-padrão, média geométrica, mediana, mínimo e máximo) em soro de homens (n = 24)

Congêneres	n > LQ	% > LQ	Média	DP	Média geométrica	Mediana	Mínimo	Máximo
PCB 28	0	0,0	0,05	0,00	0,05	0,05	< LQ	< LQ
PCB 52	0	0,0	0,05	0,00	0,05	0,05	< LQ	< LQ
PCB 153	15	62,50	1,04	1,30	0,39	0,87	< LQ	5,86
PCB 138	18	75,00	2,05	1,74	0,90	1,68	< LQ	5,50

n: Número de amostras. DP: Desvio Padrão. Valores abaixo do Limite de Quantificação (LQ) foram considerados como metade do Limite de Detecção (LD) para o cálculo da média e mediana. LD: 0,1 ng.mL⁻¹ de soro. LQ: 0,25 ng.mL⁻¹ de soro (PCB 28) e 0,5 ng.mL⁻¹ de soro (PCBs 52, 153, 138 e 180).

Tabela 2. Concentrações de PCBs (ng.mL⁻¹) em soro de seres humanos de diferentes países

País/Ano	Nº amostras	Média	Média geométrica	Mediana	Referência
Brasil, 2011	24	4,32 ^a	1,72 ^a	3,36 ^a	Este estudo
EUA/Canadá, 2011	152	0,23 ^a	-	-	Gallo et al. (2011)
EUA, 2010	2.194	-	0,45 ^d	-	Jain & Wang (2010)
Espanha, 2009	953	3,17 ^c	2,79 ^c	2,72 ^c	Agudo et al. (2009)
EUA, 2008	277	1,31 ^c	-	0,79 ^c	Goncharov et al. (2008)
EUA, 2007	133	-	1,38 ^b	-	Fitzgerald et al. (2007)
Itália, 2006	164	2,44 ^a	-	-	Turci et al. (2006)
Itália, 2005	311	3,90 ^c	-	3,06 ^c	Apostoli et al. (2005)

^a Somatório dos PCBs 28, 52, 138, 153 e 180

^b Somatório dos PCBs 28, 138, 153 e 180

^c Somatório dos PCBs 138, 153 e 180

^d Somatório dos PCBs 28, 52, 101, 118, 138, 153 e 180

de homens sobre níveis de APE foram avaliados por teste de correlação linear simples, utilizando-se o coeficiente de Spearman. As diferenças foram consideradas com, no mínimo, $p \leq 0,05$ de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1, apresentam-se os resultados obtidos após a análise das amostras de soro de homens.

Conforme pode-se observar, os PCBs 28 e 52 não foram detectados nas amostras acima do limite de quantificação. Dentre os compostos detectados, o PCB 138 foi o que obteve a maior frequência (75%), sendo também o que obteve a maior média (2,05 ng.mL⁻¹), média geométrica (0,90 ng.mL⁻¹) e mediana (1,68 ng.mL⁻¹). Os PCBs 153 e 180 tiveram uma frequência semelhante entre eles, sendo detectados em 62,50% e 54,17% das amostras, respectivamente. Porém, o PCB 180 obteve maior média (1,13 ng.mL⁻¹) que o PCB 153 (1,04 ng.mL⁻¹), mas apresentou valores menores para a média geométrica (0,33 ng.mL⁻¹) e a mediana (0,71 ng.mL⁻¹). O PCB 153 foi o que apresentou o valor mais elevado para a máxima concentração detectada (5,86 ng.mL⁻¹) em uma das amostras analisadas.

Comparando-se os resultados encontrados no presente estudo com outros realizados nos Estados Unidos, Canadá, Espanha e Itália (Tabela 2), verifica-se que este estudo obteve o maior valor para o somatório das médias dos PCBs 28, 52, 138, 153 e 180, com uma concentração de 4,32 ng.mL⁻¹. Em relação à média geométrica, o maior valor foi encontrado na Espanha³¹, com 2,79 ng.mL⁻¹, valor este referente somente ao somatório dos congêneres 138, 153 e 180, enquanto o valor no presente estudo (1,72 ng.mL⁻¹) remete-se ao somatório dos cinco congêneres já citados. Em relação à mediana, os valores deste e do estudo realizado na Itália³² foram semelhantes, com 3,36 ng.mL⁻¹ e 3,06 ng.mL⁻¹, respectivamente, valor este também relacionado ao somatório dos congêneres 138, 153 e 180, enquanto o somatório das medianas no presente estudo foi realizado com os valores dos cinco congêneres estudados. Porém, estudos mais recentes realizados nos Estados Unidos e Canadá^{33,34} reportam valores de médias bem inferiores a todos os demais, demonstrando que há uma tendência a ocorrer um declínio nos níveis de PCBs em seres humanos com o passar dos anos.

Em relação a estudos realizados no Brasil, somente um trabalho foi encontrado dentre a literatura consultada. Este foi realizado com 33 pessoas residentes na

Tabela 3. Concentrações médias dos PCBs (ng.mL⁻¹) em soro de homens que apresentaram índices de antígeno prostático específico (APE) < 2,6 ng.mL⁻¹, entre 2,6 e 4,0 ng.mL⁻¹ e > 4,0 ng.mL⁻¹

PCBs	APE < 2,6 (n=16)		APE 2,6 < x < 4,0 (n=3)		APE > 4,0 (n=5)	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
28	0.05	0.00	0.05	0.00	0.05	0.00
52	0.05	0.00	0.05	0.00	0.05	0.00
153	0.40	1.51	0.59	0.94	1.04	0.68
138	0.89	1.76	2.57	2.16	1.85	1.78
180	0.35	1.65	0.47	0.74	1.31	1.20
ΣPCBs	1.74		3.73		4.30	

DP: Desvio-padrão

região metropolitana do Rio de Janeiro, não encontrando amostras contaminadas com PCBs³⁷. Porém, o limite de detecção do método utilizado foi de 2 ng.mL⁻¹, valor superior ao do presente estudo (0,1 ng.mL⁻¹).

Na Tabela 3, apresentam-se as concentrações médias dos PCBs em soro de homens segundo a concentração de APE detectada, em que observa-se que os níveis de PCBs aumentaram na mesma proporção dos valores de APE. No grupo com APE > 4,0, a concentração de PCBs apresentou-se maior do que o dobro da apresentada no grupo com APE < 2,6. Estes dados, porém, devem ser vistos com cautela, pois as diferenças não foram estatisticamente significativas.

Como não foram encontrados outros estudos na bibliografia consultada relatando diretamente a contaminação de amostras de soro e sua relação com níveis de APE e câncer de próstata, uma maior discussão a respeito dessa associação torna-se difícil. Todavia, pode-se constatar que as concentrações de PCBs encontradas estão próximas das reportadas nos estudos realizados na Itália^{32,36} e Espanha³¹, países estes que tinham fábricas de PCBs e apresentam, teoricamente, uma maior probabilidade de contaminação da população. As elevadas concentrações de PCBs reportadas no presente estudo podem estar relacionadas, em especial, aos hábitos alimentares desses homens, pois, na mesma região de obtenção das amostras de sangue, foram realizadas pesquisas que relataram concentrações de PCBs em leite, queijo e produtos cárneos. O somatório das médias dos PCBs 28, 52, 138, 153 e 180 foi de 24,85 ng/g de gordura para queijos³⁸, de 15,5 ng/g de gordura para leites pasteurizados³⁹ e de 31,19 ng/g de gordura para salsichas *hot dog*⁴⁰. Mais estudos são necessários para determinar as causas desta contaminação, assim como novas investigações a respeito da influência da concentração de PCBs nos níveis de APE em soro de homens.

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. Polychlorinated Biphenyls and Terphenyls. Environmental Health Criteria, 140. 2. ed. Genebra: WHO; 1993.
2. Brasil. Portaria Interministerial n° 19, de 29 de janeiro de 1981. [acesso 2011 ago 28]. Disponível em: [http://faolex.fao.org/docs/pdf/bra15389.pdf].
3. Ross, G. The public health implications of polychlorinated biphenyls (PCBs) in the environment. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2004;59:275-91.
4. Xing GH, Liang Y, Chen LX, Wu SC, Wong MH. Exposure to PCBs, through inhalation, dermal contact and dust ingestion at Taizhou, China: a major site for recycling transformers. *Chemosphere*. 2011;83:605-11.
5. Zhang T, Fiedler H, Yu G, Ochoa GS, Carroll Jr WF, Gullett BK, et al. Emissions of unintentional persistent organic pollutants from open burning of municipal solid waste from developing countries. *Chemosphere*. 2011;84:994-1001.
6. Costabeber I, Emanuelli T. Aspectos toxicológicos de los bifenilos policlorados: una recopilación. *Bol SBCTA*. 2003;37:1-10.
7. Herrero M, Waliszewski SM, Martínez PCC. *Rev Salud Pública Nutr*. 2009;10(2). [acesso 2011 ago 28]. Disponível em: [http://www.respyn.uanl.mx/x/2/ensayos/ensayo-moduladores_hormonales.htm].
8. Maervoet J, Covaci A, Schepens P, Sandau CD, Letcher RJ. A reassessment of the nomenclature of polychlorinated biphenyl (PCB) metabolites. *Environ Health Perspect*. 2004;112(3):291-4.
9. ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile of polychlorinated biphenyls (PCBs). Atlanta: Agency for Toxic Substances and Disease Registry; 2000.
10. World Health Organization. Polychlorinated Biphenyls: Human Health Aspects. (Concise International Chemical Assessment Document 55). Genebra: WHO, 2003. [acesso 2011 ago 28]. Disponível em: [http://www.inchem.org/documents/cicads/cicads/cicad55.htm].
11. Rylander L, Nilsson-Ehle P, Hagmar L. A simplified precise method for adjusting serum levels of persistent organohalogen pollutants to total serum lipids. *Chemosphere*. 2006;62:333-6.
12. Kalantzi OI, Geens T, Covaci A, Siskos PA. Distribution of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and other persistent organic pollutants in human serum from Greece. *Environ Int*. 2011;37:349-53.
13. Hardell E, Carlberg M, Nordström M, van Bavel B. Time trends of persistent organic pollutants in Sweden during 1993-2007

- and relation to age, gender, body mass index, breast-feeding and parity. *Sci Total Environ*. 2010;408:4412-9.
14. Cerná M, Malý M, Grabic R, Batáriová A, Smíd J, Benes B. Serum concentrations of indicator PCB congeners in the Czech adult population. *Chemosphere*. 2008;72:1124-31.
 15. Bachelet D, Truong T, Verner MA, Arveux P, Kerbrat P, Charlier C, et al. Determinations of serum concentrations of 1,1-dichloro-2,2-bis (*p*-chlorophenyl)ethylene and polychlorinated biphenyls among French women in the CECILE study. *Environ Res*. 2011;111:861-70.
 16. Lucena RA, Allam MF, Costabeber IH, Villarejo MLJ, Navajas RFC. Breast cancer risk factors: PCB congeners. *Eur J Cancer Prev*. 2001;10:117-9.
 17. Charlier CJ, Albert AI, Zhang L, Dubois NG, Plomteux GJ. Polychlorinated biphenyls contamination in women with breast cancer. *Clin Chim Acta*. 2004;347:177-81.
 18. Recio-Veja R, Velazco-Rodriguez V, Ocampo-Gómez G, Hernandez-Gonzalez S, Ruiz-Flores P, Lopez-Marquez F. Serum levels of polychlorinated biphenyls in Mexican women and breast cancer risk. *J Appl Toxicol*. 2011;31:270-8.
 19. Adenugba A, Khan SA, Taylor-Robinson SD, Cox IJ, Toledano MB, Thillainayagam AV, et al. Polychlorinated biphenyls in bile patients with biliary tract cancer. *Chemosphere*. 2009;76:841-6.
 20. Howsam M, Grimalt JO, Guinó E, Navarro M, Martí-Ragué J, Peinado MA, et al. Organochlorine exposure and colorectal cancer risk. *Environ Health Perspect*. 2004;112(15):1460-6.
 21. Prince MM, Ruder AM, Hein MJ, Waters MA, Whelan EA, Nilsen N, et al. Mortality and exposure response among 14,458 electrical capacitor manufacturing workers exposed to polychlorinated biphenyls (PCBs). *Environ Health Perspect*. 2006;114(10):1508-14.
 22. Goncharov A, Rej R, Negoita S, Schymura M, Santiago-Rivera A, Morse G, et al. Lower serum testosterone associated with elevated polychlorinated biphenyl concentrations in native American men. *Environ Health Perspect*. 2009;117(9):1454-60.
 23. Quinn M, Babb P. Patterns and trends in prostate cancer incidence, survival, prevalence and mortality. Part II: individual countries. *BJU Int*. 2002;90(2):174-84.
 24. Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SLV, Dan L, Jameson JL, et al. *Harrison Medicina Interna*. 17. ed. Rio de Janeiro, RJ: McGraw-Hill Interamericana do Brasil; 2008.
 25. Parkin DM, Bray FI, Devesa SS. Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur J Cancer*. 2001;37(8):S4-66.
 26. Koifman S, Koifman R. Environment and cancer in Brazil: an overview from a public health perspective. *Mutat Res*. 2003;544(2-3):305-11.
 27. Meyer A, Chrisman J, Moreira JC, Koifman S. Cancer mortality among agricultural workers from Serrana Region, state of Rio de Janeiro, Brazil. *Environ Res*. 2003;93(3):264-71.
 28. Goncharov A, Haase RF, Santiago-Rivera A, Morse G, McCaffrey RJ, Rej R, et al. High serum PCBs are associated with elevation of serum lipids and cardiovascular disease in a Native American population. *Environ Res*. 2008;106:226-39.
 29. Park JS, Bergman A, Linderholm L, Athanasiadou M, Kocan A, Petrik J, et al. Placental transfer of polychlorinated biphenyls, their hydroxylated metabolites and pentachlorophenol in pregnant women from eastern Slovakia. *Chemosphere*. 2008;70:1676-84.
 30. Mohr S, Schwanz T, Wagner R, Soldatelli L, Costabeber IH. Determinação de bifenilos policlorados em soro de cordão umbilical através de extração por hidrólise ácida seguida de cromatografia a gás acoplada a um microdetector de captura de elétrons. *Quim Nova*. 2011;34(3):444-9.
 31. Agudo A, Goñi F, Etxeandia A, Vives A, Millán E, López R et al. Polychlorinated biphenyls in Spanish adults: Determinants of serum concentrations. *Environ Res*. 2009;109:620-8.
 32. Apostoli P, Magoni M, Bergonzi R, Carasi S, Indelicato A, Scarcella C, et al. Assessment of reference values for polychlorinated biphenyl concentration in human blood. *Chemosphere*. 2005;61:413-21.
 33. Jain RB, Wang RY. Regression models to estimate total polychlorinated biphenyls in the general US population: 2001-2002 and 2003-2004. *Chemosphere*. 2010;79:243-52.
 34. Gallo MV, Schell LM, DeCaprio AP, Jacobs A. Levels of persistent organic pollutant and their predictors among young adults. *Chemosphere*. 2011;83:1374-82.
 35. Fitzgerald EF, Belanger EE, Gomez MI, Hwang S, Jansing RL, Hicks HE. Environmental exposures to polychlorinated biphenyls (PCBs) among older residents of upper Hudson River communities. *Environ Res*. 2007;104:352-60.
 36. Turci R, Finozzi E, Catenacci G, Marinaccio A, Balducci C, Minoia C. Reference values of coplanar and non-coplanar PCBs in serum samples from two population groups. *Toxicology Letters*. 2006;162:250-5.
 37. Delgado IF, Barretto HHC, Kussumi TA, Alleluia IB, Baggio CA, Paumgarten FJR. Serum levels of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls among inhabitants of Greater Metropolitan Rio de Janeiro, Brasil. *Cad Saúde Pública*. 2002;18(2):519-24.
 38. Santos JS, Xavier AAO, Ries EF, Costabeber I, Emanuelli T. Assessment of polychlorinated biphenyls (PCBs) in cheese from Rio Grande do Sul, Brazil. *Chemosphere*. 2006;65:1544-50.
 39. Heck MC, Santos JS, Bogusz JS, Costabeber I, Emanuelli T. Estimation of children exposure to organochlorine compounds through milk in Rio Grande do Sul, Brazil. *Food Chem*. 2007;102:288-94.
 40. Costabeber I, Santos JS, Xavier AAO, Weber J, Leães FL, Bogusz JS, et al. Levels of polychlorinated biphenyls (PCBs) in meat and meat products from the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Food Chem Toxicol*. 2006;44:1-7.

Efeito inibitório de óleos essenciais do gênero *Citrus* sobre o crescimento de micro-organismos

Inhibitory effect of essential oils from the genus *Citrus* on the microorganisms growth

RIALA6/1478

Tamara Cubiaki PIRES*, Roberta Hilsdorf PICCOLI

*Endereço para correspondência: Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037. CEP: 37200-000, Lavras (MG), Brasil. Tel.: (35) 3829-1392. E-mail: tamarapires@bol.com.br

Recebido: 01.09.2011 - Aceito para publicação: 24.04.2012

RESUMO

Os óleos essenciais encontrados em plantas medicinais, aromáticas e condimentares têm interessado às indústrias alimentícias, pelas suas propriedades antimicrobianas contra bactérias deteriorantes e/ou patogênicas. No intuito de avaliar o efeito inibitório dos óleos essenciais da casca e da folha de *Citrus limonia* Osbeck (limão-cravo), *Citrus aurantifolia* (Chrst.) Swingle (limão-galego) e *Citrus latifolia* Tanaka (limão-tahiti), foram realizados experimentos, utilizando-se a técnica de cultura de difusão em placa de ágar com as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* e levedura *Candida utilis*. Para o fungo *Penicillium expansum*, foram realizadas culturas em placas-padrão com e sem a presença dos óleos. Nos ensaios *in vitro*, os óleos essenciais testados promoveram inibição de todos os micro-organismos testados, e os maiores halos ocorreram sobre a levedura *C. utilis*. Nas bactérias, os óleos induziram melhor inibição sobre *S. aureus* do que em *E. coli* e *P. aeruginosa*. O efeito inibitório dos óleos de citros foi eficaz sobre o fungo *P. expansum*, exceto o óleo de limão-cravo, que mostrou efeito estimulante de crescimento. Os óleos essenciais analisados demonstraram efeito inibitório sobre os micro-organismos avaliados.

Palavras-chave. essências vegetais, limão, bactérias, fungos.

ABSTRACT

The food industries show interest for the essential oils found in medicinal, aromatic and seasoning plants, as they contain antimicrobial activity against the decaying and/or pathogenic bacteria. In this study, the inhibitory properties of essential oils extracted from the rinds and the leaves of *Citrus limonia* Osbeck (Cravo-lemon), *Citrus aurantifolia* (Chrst.) Swingle (Galego-lemon) and *Citrus latifolia* Tanaka (Tahiti-lemon) were assessed on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, and *Candida utilis* yeast. This experiment was performed by means of agar dish diffusion technique; the culture in plates-standard technique with and without the presence of oils was used for *Penicillium expansum* fungus. In the agar diffusion assays, the analyzed essential oils promoted the inhibition of all of the tested microorganisms; and the major inhibition haloes were detected on *Candida utilis* yeast. As for bacteria, the oils induced better inhibition on *Staphylococcus aureus* than on *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. The inhibitory effect of the citros oils was effective on *Penicillium expansum* fungus; excepting Cravo-lemon oil which showed a growth-stimulating effect. The oils evaluated in this study showed to have inhibitory effect on the analyzed microorganisms.

Keywords. plant essences; lemon; bacteria; fungi

INTRODUÇÃO

O uso de óleos essenciais em alimentos vem ganhando importância devido ao fato de apresentarem componentes naturais, evitando-se o uso de aditivos sintéticos, deteriorações, oxidações e o desenvolvimento de micro-organismos, demonstrando eficiência nas funções antioxidantes, anti-radicaís, tais como: os carotenoides e diterpenos fenóis presentes em óleos como orégano, alecrim e coentro, e antimicrobianas em alimentos¹.

Os óleos essenciais apresentam atividade antimicrobiana sobre grande número de bactérias deteriorantes e patogênicas, incluindo espécies resistentes a antibióticos. Eles podem apresentar ação tanto sobre bactérias Gram-positivas, quanto Gram-negativas e, ainda, leveduras e fungos filamentosos micotoxigênicos e deteriorantes^{2,3}.

A produção do gênero *Citrus* (limão), além de destinar-se ao consumo *in natura* e à indústria de sucos, destina-se também à extração do óleo essencial contido em sua casca. Este óleo é comumente utilizado por indústrias de bebidas, refrigerantes, cosméticos, essências aromáticas e culinária, entre outras⁴.

Pesquisas limitadas têm sido realizadas sobre os óleos essenciais de espécies *Citrus*, em termos de seu uso como agente antimicrobiano em alimentos. Porém, esses compostos têm demonstrado possuir propriedades antimicrobianas potenciais não somente sobre leveduras e bactérias produtoras de esporos, mas também sobre bactérias que causam deterioração em alimentos⁵.

Os alimentos podem apresentar diversos micro-organismos, muitas vezes patogênicos, os quais poderão sintetizar substâncias tóxicas, prejudiciais se ingeridas pelo homem ou animal, ou também deteriorantes, causando diversos prejuízos para as indústrias.

Diante do exposto, objetivou-se avaliar o efeito inibitório dos óleos essenciais extraídos da casca e da folha de *Citrus limonia* Osbeck (limão-cravo), *Citrus aurantifolia* (Chrst.) Swingle (limão-galego) e *Citrus latifolia* Tanaka (limão-tahiti) sobre o crescimento de bactérias e fungos.

MATERIAL E MÉTODOS

Extração dos óleos essenciais

Os óleos essenciais de *Citrus limonia* Osbeck (limão-cravo), *Citrus aurantifolia* (Chrst.) Swingle

(limão-galego) e *Citrus latifolia* Tanaka (limão-tahiti) utilizados foram extraídos no Laboratório de Química Orgânica do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras (UFLA). As folhas e limões destinados à obtenção de óleos essenciais foram obtidos no pomar da UFLA. Os frutos foram descascados e as cascas e folhas foram picadas em quadrados pequenos.

Os óleos essenciais foram extraídos pelo método de hidrodestilação, empregando o aparelho de Clevenger modificado⁶. Utilizaram-se 500 gramas de folha e de casca, separadamente, para cada extração de cada variedade de limão. O material foi acondicionado em balões de 6 litros e mantido em ebulição, à temperatura constante, por 3 horas. Decorrido esse tempo, o hidrolato foi coletado e centrifugado em centrífuga de cruzeta horizontal a 965,36 x g, por 5 minutos. A fase aquosa foi retirada do hidrolato, adicionando-se sulfato de sódio anidro à fase orgânica e levando-se à centrifugação novamente para a obtenção do óleo puro. Os óleos essenciais foram armazenados protegidos da luz, a 4 °C.

Micro-organismos utilizados

As análises microbiológicas empregando-se óleos essenciais foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos da UFLA.

Para avaliação *in vitro* do efeito antimicrobiano dos óleos obtidos da casca e folha de *Citrus limonia* Osbeck (limão-cravo), *Citrus aurantifolia* (Chrst.) Swingle (limão-galego) e *Citrus latifolia* Tanaka (limão-tahiti), foram utilizadas as cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853, *Candida utilis* CCT 3469 e *Penicillium expansum* CCT 4680.

Preparação do inóculo

Foram utilizadas culturas das bactérias mantidas em meio de congelamento (glicerol 125 mL, extrato de levedura 1,5 g, peptona bacteriológica 2,5 g, NaCl 2,5 g, 1 litro de água destilada) e da levedura em meio YW (extrato de levedura 3 g, extrato de malte 3 g, peptona bacteriológica 5 g, glicose 10 g, ágar 15 g e 1 litro de água destilada), acrescidas de glicerol, ambas estocadas a 4 °C e do bolor em meio batata dextrose ágar (BDA), estocado a 25 °C.

As cepas de bactérias e levedura foram reativadas inoculando-se uma alçada em tubos contendo caldo infusão cérebro coração (BHI); as culturas de *S. aureus* e *E.*

coli foram incubadas, por 24 horas, a 37 °C e *P. aeruginosa* e *C. utilis*, a 28 °C, pelo mesmo período. Alíquotas de 1,0 mL das culturas foram transferidas para microtubos e centrifugadas, a 735 x g por 15 minutos (centrífuga modelo 5415 C). Após separação, 10 µL das células foram coletadas do pellet formado e inoculados em 200 mL de caldo BHI. O crescimento de cada cepa foi acompanhado pela determinação da densidade óptica, a 620 nm, a cada 2 horas, da cultura e do número de unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL), empregando-se a técnica de plaqueamento em microgota. As culturas de *S. aureus* e *P. aeruginosa* foram plaqueadas em ágar para contagem padrão (PCA), *E. coli* em ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) e *C. utilis* em ágar YW. Com os resultados obtidos de absorbância e UFC/mL de cada micro-organismo, foram elaboradas curvas padrões.

Efeito inibitório dos óleos essenciais sobre bactérias e leveduras

A atividade antimicrobiana dos óleos foi testada pelo método de difusão em ágar por cavidade em placa^{7,8}. Adicionou-se uma suspensão padronizada ($5,88 \times 10^8$ UFC/mL para *S. aureus*; $8,66 \times 10^8$ UFC/mL para *E. coli*; $3,31 \times 10^8$ UFC/mL para *P. aeruginosa*; 8×10^6 UFC/mL para *C. utilis*) dos micro-organismos a 10 mL de ágar Müeller Hinton (bactérias) e ágar YEFG (em g/L: extrato de levedura 10; peptona bacteriológica 20; glicose 20; ágar 15) (levedura), à temperatura de 45 °C, obtendo-se a concentração final de 10^8 UFC/mL para bactérias e 10^6 UFC/mL para levedura, homogeneizando-se a mistura depositada imediatamente sobre uma camada (10 mL) do mesmo ágar já solidificado. Os slots foram feitos na superfície do ágar, com auxílio de pérolas de vidro, retiradas previamente. Alíquotas de 8 µL de cada diluição dos óleos essenciais foram depositadas nos slots. Foram utilizadas as concentrações de 10, 20, 40, 80 e 160 µL/mL de cada óleo, diluídas em etanol. As placas foram vedadas com filme plástico e incubadas em BOD, a 37 °C (*S. aureus* e *E. coli*) e 28 °C (*P. aeruginosa* e *C. utilis*), por 48 horas. Foram medidos os diâmetros dos halos de inibição formados, com auxílio de um paquímetro, e o etanol foi utilizado como controle negativo. As análises foram realizadas em triplicata.

Efeito inibitório dos óleos essenciais sobre *Penicillium expansum*

Foram avaliados os efeitos fungicidas dos óleos essenciais de *Citrus* nas concentrações de 0,25, 0,5, 1, 2 e

4 µL/mL. Foram observados o crescimento e ou a inibição micelial da cultura fúngica, por meio de comparação com placa-padrão (sem óleo)⁹.

Foram adicionadas, em 10 mL de ágar BDA, as diferentes concentrações dos óleos essenciais, homogeneizando-se a mistura depositada imediatamente sobre uma camada (10 mL) do mesmo ágar já solidificado.

O inóculo, constituído por um disco de micélio com o fungo *P. expansum*, de 8 mm de diâmetro, foi transferido para o centro das placas. As placas foram vedadas com filme plástico e incubadas, em BOD, a 25 °C, por 7 dias.

As avaliações foram realizadas por meio de medições diametralmente opostas do crescimento micelial. As análises foram realizadas em triplicata.

Análise estatística

Para os micro-organismos, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *C. utilis*, foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC), em um esquema fatorial ($3 \times 2 \times 5$), sendo três óleos *C. limonia*, *C. aurantifolia* e *C. latifolia*, dois locais (casca e folha), cinco concentrações (10, 20, 40, 80 e 160 µL/mL) com três repetições e mais um tratamento adicional (testemunha), totalizando 108 observações.

Em se tratando do fungo *P. expansum*, a análise estatística foi conduzida considerando-se a natureza dos resíduos como aproximadamente normal, ou seja, violando-se a pressuposição de normalidade que garante a exatidão dos testes. Isso pode alterar as taxas de erro tipo I (probabilidade de rejeitar a hipótese nula, dado que ela é verdadeira e é representada por α) e as de erro tipo II (probabilidade de não rejeitar a hipótese nula, dado que ela é falsa e é representada por β) de forma negativa. Portanto, as conclusões tiradas para essa variável devem ser tiradas com ressalvas.

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado (DIC) em um esquema de análise fatorial ($3 \times 2 \times 5$), sendo três óleos (limão-cravo, limão-galego e limão-tahiti), dois locais (casca e folha), cinco concentrações (0,25, 0,5, 1, 2 e 4 µL/mL) com três repetições e mais um tratamento adicional (testemunha), totalizando 93 observações.

Os programas estatísticos utilizados foram o SAS[®] v.8.2¹⁰ e o Sisvar¹¹. Quanto à análise de variância, as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey e pelo teste F, a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito inibitório dos óleos essenciais de citros sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*

Os halos de inibição produzidos pelos óleos essenciais de *Citrus limonia* Osbeck (limão-cravo), *Citrus aurantifolia* (Chrst.) Swingle (limão-galego) e *Citrus latifolia* Tanaka (limão-tahiti), da casca e da folha, em placas contendo as bactérias *E. ATCC 8739*, *S. aureus ATCC 25923* e *P. aeruginosa ATCC 25853*, foram medidos, revelando efeito inibitório dos óleos.

Os óleos essenciais estudados foram mais eficazes em inibir o crescimento de *S. aureus* (Tabela 1). *E. coli* (Tabela 2) e *P. aeruginosa* (Tabela 3) se mostraram mais resistentes à atividade antimicrobiana dos óleos. Resultados encontrados por Fisher e Philips⁵ também mostram a maior eficiência dos óleos essenciais de *Citrus* sobre as bactérias Gram-positivas do que sobre as bactérias Gram-negativas nos testes *in vitro*. Resultados similares são encontrados para os mais diversos óleos essenciais e micro-organismos^{12,13,14}.

Vários trabalhos demonstraram que, embora os óleos essenciais sejam efetivos em inibir tanto bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas, a presença da membrana externa nas bactérias Gram-negativas as torna menos susceptíveis a algumas substâncias. Esse fato decorre do caráter hidrofóbico da membrana celular externa dessas bactérias, que atua como barreira à permeabilidade de várias substâncias ou devido ao tamanho de suas porinas, a qual varia entre os micro-organismos^{12,15}.

Com base nos resultados obtidos neste experimento, a análise de variância se mostrou

significativa para as concentrações e para a interação entre o óleo e o local de extração (casca e folha) ($p \leq 0,05$). Pelos dados descritos na Tabela 1, observa-se que, ao considerar os óleos obtidos da casca de limão-galego e do limão-tahiti, estes demonstraram maior inibição do crescimento bacteriano que o óleo de limão-cravo; porém, já os óleos obtidos da folha não apresentaram significativa variação em nenhum dos óleos, mas apresentaram sensibilidade aos óleos essenciais. Na Tabela 1, observa-se que, para o limão-cravo, o óleo obtido da folha promoveu maior halo de inibição que o da casca; para o óleo de limão-galego, tanto o da casca quanto o da folha não tiveram diferença estatística entre eles; já para o óleo de limão-tahiti, o óleo da casca promoveu maior inibição da bactéria que o óleo da folha ($P < 0,05$).

Changetal.¹⁶ verificaram a atividade antibacteriana do óleo da folha de *Cinnamomum osmophloeum* e seus constituintes sobre nove espécies de bactérias e observaram concentração inibitória mínima (MIC) para folha de 500 $\mu\text{L/mL}$ sobre *K. pneumoniae* e *Salmonella* sp., e 250 $\mu\text{g/mL}$ sobre as outras sete espécies de bactérias. Quando utilizou-se apenas o padrão de cinamaldeído, os MICs sobre *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, MRSA, *K. pneumoniae*, *Salmonella* sp. e *V. parahemolyticus* foram de 500, 1.000, 250, 250, 250, 250, 1.000, 500 e 250 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Pelos dados da Tabela 2, observa-se que, quando comparados os óleos obtidos da casca, o óleo da casca do limão-galego apresentou maior halo de inibição que os óleos da casca do limão-tahiti e do limão-cravo. Já para a folha, todos os óleos testados não apresentaram variação significativa, porém, todos promoveram formação do halo, segundo a análise de variância que se mostrou

Tabela 1. Resultados médios do efeito inibitório dos óleos essenciais de *Citrus* (casca e folha) sobre *Staphylococcus aureus*

Concentração ($\mu\text{L/mL}$)	Formação do halo de inibição (mm)					
	<i>C. aurantifolia</i> (limão-galego)		<i>C. limonia</i> (limão-cravo)		<i>C. latifolia</i> (limão-tahiti)	
	folha (médias*)	casca (médias*)	folha (médias*)	casca (médias*)	folha (médias*)	casca (médias*)
0	3,7 ^d	3,3 ^d	3,3 ^d	3,3 ^d	3,7 ^d	3,3 ^d
10	7,8 ^b	7,7 ^b	7,3 ^c	6,8 ^c	7 ^c	8,2 ^b
20	8,2 ^b	8,7 ^a	9 ^a	7,3 ^c	7,6 ^b	8,3 ^b
40	8 ^b	8,2 ^b	8,7 ^a	7,7 ^b	8,2 ^b	8,7 ^a
80	8,7 ^a	8,8 ^a	8,8 ^a	8,2 ^a	8,5 ^a	9 ^a
160	9 ^a	9,3 ^a	9,7 ^a	7,8 ^b	8,7 ^a	9,7 ^a

Zona de inibição em mm, incluindo o diâmetro do slot. Diâmetro do slot, 3 mm.

*médias seguidas da mesma letra minúscula, na coluna, são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 2. Resultados médios do efeito inibitório dos óleos essenciais de *Citrus* (casca e folha) sobre *Escherichia coli*

Concentração (µL/mL)	Formação do halo de inibição (mm)					
	<i>C. aurantifolia</i> folha (médias*)	<i>C. aurantifolia</i> casca (médias*)	<i>C. limonia</i> folha (médias*)	<i>C. limonia</i> casca (médias*)	<i>C. latifolia</i> folha (médias*)	<i>C. latifolia</i> casca (médias*)
0	3,3 ^c	3,7 ^c	3,7 ^c	3,3 ^c	3,3 ^c	3,3 ^c
10	6,2 ^b	6,8 ^a	6,3 ^b	5,7 ^b	6,2 ^b	6 ^b
20	6,3 ^b	7,8 ^a	6,8 ^a	5,8 ^b	6,3 ^b	7 ^a
40	6,7 ^a	7,3 ^a	7,8 ^a	6,3 ^b	6,7 ^a	6,5 ^a
80	7 ^a	7,8 ^a	7,3 ^a	7 ^a	7 ^a	6,7 ^a
160	7,5 ^a	8,2 ^a	8,5 ^a	7,5 ^a	7,2 ^a	6,3 ^b

Zona de inibição, em mm, incluindo o diâmetro do slot. Diâmetro do slot, 3 mm.

*médias seguidas da mesma letra minúscula, na coluna, são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

significativa para as interações entre o óleo e o local e o óleo e a concentração ($p \leq 0,05$).

Duarte et al.¹⁷ verificaram a atividade de óleos essenciais de folhas de 29 plantas medicinais normalmente usadas no Brasil sobre *E. coli* e observaram que o óleo de *Cymbopogon martinii* exibiu um amplo espectro de inibição e apresentou forte atividade (MIC entre 100 e 500 µg/mL) sobre 10 dos 13 tipos de *E. coli*, sendo três enterotoxigênicas, duas enteropatogênicas, três enteroinvasivas e duas produtoras de shiga toxina (STEC).

Pelos dados da Tabela 2, pode-se observar que os efeitos dos óleos essenciais obtidos das folhas para o limão-cravo e o tahiti foram maiores que os obtidos da casca. Para o limão-galego, a casca apresentou melhor resultado que a folha. Já em relação às concentrações, os óleos essenciais de limão-cravo, tahiti e galego não apresentaram significativa variação na indução de formação de halo nas concentrações de 10, 20, 40 e 80 µL/mL. Para a concentração de 160 µL/mL, os óleos essenciais de limão-tahiti e galego apresentaram melhores resultados de inibição do crescimento de *E. coli* que o óleo do limão-cravo.

A constância nos resultados observados entre os micro-organismos testados provavelmente ocorre devido ao etanol utilizado na diluição dos óleos. Esse solvente pode alterar a entrada do óleo na célula bacteriana, facilitando sua difusão em maiores diluições, porém, pouco se conhece a respeito da ação do óleo sobre a estrutura bacteriana¹⁸.

Com base nos resultados obtidos neste experimento, a análise de variância se mostrou significativa para os óleos, locais e concentrações e não foi significativa para nenhuma das interações ($P \leq 0,05$).

Nakamura et al.¹⁹ estudaram a atividade

antibacteriana do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* L. e verificaram que o mesmo inibiu *S. aureus* a uma concentração de 0,75 µg/mL. A concentração inibitória mínima (MIC) para *Shigella flexineri*, *Salmonella enteritidis*, *E.a coli*, *Klebsiella* sp. e *Proteus mirabilis* estavam em concentrações que variam de 3 a 12 µg/mL. O ponto final não foi alcançado para *P. aeruginosa* (≥ 24 mg/mL).

De acordo com os dados da Tabela 3, observa-se que o óleo essencial de limão-galego apresentou maior inibição sobre *P. aeruginosa* do que os demais óleos testados. Comparando-se a atuação inibitória dos óleos da folha e da casca, observa-se que os óleos essenciais obtidos da folha dos citros apresentaram maior inibição do crescimento de *P. aeruginosa*, quando comparados com os óleos obtidos da casca, o que pode ser explicado provavelmente pela maior variabilidade dos constituintes químicos presentes nas folhas em relação à casca²⁴.

Vários fatores influenciam os resultados obtidos. Dentre eles, podem ser citados a época de colheita da planta, a localização geográfica e o método de extração do óleo essencial. Outro fator que pode influenciar drasticamente nos resultados obtidos é a metodologia empregada para avaliação. Normalmente, os resultados diferem nessa metodologia; sendo assim, difícil a comparação entre os resultados^{13,14}. Uma outra metodologia empregada é a do disco difusão, e esse método é um dos mais adequados para se trabalhar com óleos extraídos com solvente orgânico.

Efeito inibitório dos óleos essenciais de citros sobre *Candida utilis*

Os óleos essenciais limão-cravo, limão-galego e limão-tahiti, casca e folha, apresentaram níveis significativos de inibição sobre o micro-organismo

Tabela 3. Resultados médios do efeito inibitório dos óleos essenciais de *Citrus* (casca e folha) sobre *Pseudomonas aeruginosa*

Concentração (µl/ml)	Formação do halo de inibição (mm)					
	<i>C. aurantifolia</i> folha (médias*)	<i>C. aurantifolia</i> casca (médias*)	<i>C. limonia</i> folha (médias*)	<i>C. limonia</i> casca (médias*)	<i>C. latifolia</i> folha (médias*)	<i>C. latifolia</i> casca (médias*)
0	3,3 ^c	3,7 ^c	3,3 ^c	3 ^c	3,7 ^c	3,7 ^c
10	5,3 ^b	5,3 ^b	4,7 ^b	3,7 ^c	5 ^b	4,3 ^b
20	5,7 ^b	5,7 ^b	5 ^b	4,3 ^b	6,2 ^a	5 ^b
40	6 ^a	6 ^a	5,3 ^b	4,7 ^b	6 ^a	5,3 ^b
80	6,3 ^a	6 ^a	5,7 ^b	5 ^b	5,5 ^b	5,7 ^b
160	7 ^a	7,3 ^a	6 ^a	5,3 ^b	5,3 ^b	6,2 ^a

Zona de inibição, em mm, incluindo o diâmetro do slot. Diâmetro do slot, 3 mm.

*médias seguidas da mesma letra minúscula, na coluna, são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Tabela 4. Resultados médios do efeito inibitório dos óleos essenciais de *Citrus* (folha e casca) sobre *Candida utilis*

Concentração (µL/mL)	Formação do halo de inibição (mm)					
	<i>C. aurantifolia</i> folha (médias*)	<i>C. aurantifolia</i> casca (médias*)	<i>C. limonia</i> folha (médias*)	<i>C. limonia</i> casca (médias*)	<i>C. latifolia</i> folha (médias*)	<i>C. latifolia</i> casca (médias*)
0	3 ^d	3 ^d	3 ^d	3 ^d	3 ^d	3 ^d
10	13,3 ^b	11 ^b	9,7 ^c	7,7 ^c	8,7 ^c	7,7 ^c
20	15,7 ^a	12,7 ^b	11 ^b	9 ^c	11,7 ^b	9,7 ^b
40	16,3 ^a	14,7 ^b	12,3 ^b	11 ^b	15 ^b	12 ^b
80	18 ^a	16 ^a	13 ^b	12,3 ^b	15,7 ^a	13,7 ^b
160	20 ^a	17,3 ^a	14,3 ^b	13,7 ^b	17,7 ^a	15,7 ^a

Zona de inibição, em mm, incluindo o diâmetro do slot. Diâmetro do slot, 3 mm

*médias seguidas da mesma letra minúscula, na coluna, são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

testado, confirmado pelos grandes diâmetros dos halos de inibição formados (Tabela 4).

Com base nos resultados obtidos neste experimento, constata-se que houve interação significativa entre os óleos, locais (folha ou casca) e concentrações ($p < 0,05$). O óleo de limão-galego, tanto da casca quanto da folha, apresentou os melhores resultados de inibição do crescimento entre os óleos em todas as concentrações testadas; porém, o óleo extraído das folhas apresentou melhor inibição do crescimento desta levedura.

Comparando-se a ação inibitória do óleo essencial de limão-cravo, observa-se que o óleo da folha promoveu melhor inibição do crescimento de *C. utilis* nas concentrações mais baixas (10, 20 e 40 µL/mL) que o óleo da casca do limão-cravo. Já para as concentrações mais altas (80 e 160 µL/mL), os óleos da casca e da folha do limão-cravo não diferiram estatisticamente entre si ($p < 0,05$).

O óleo essencial da folha do limão-tahiti apresentou os melhores resultados de inibição do crescimento para todas as concentrações, quando comparado com o óleo extraído da casca. Isto poderia ser explicado provavelmente em virtude dos constituintes

químicos majoritários presentes nesta variedade de limão estão em maior concentração na folha do que na casca²⁴.

Sacchetti et al.²⁰ verificaram que o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* promoveu notável inibição no crescimento das leveduras *Candida albicans* ATCC 48274, *Rhodotorula glutinis* ATCC 16740, *Schizosaccharomyces pombe* ATCC 60232, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 2365 e *Yarrowia lypolítica* ATCC 16617.

Tserennadmid et al.²⁵ trabalharam com alguns óleos essenciais, incluindo o limão (*Citrus lemon*), em leveduras deteriorantes de alimentos e obtiveram um efeito inibitório substancial sobre todas as leveduras estudadas, mostrando um grande halo de inibição do crescimento das leveduras *S. pombe*, *G. candidum*, *P. anomala* e *S. cerevisiae*.

Souza et al.²¹ trabalharam com o óleo de orégano (*Origanum vulgare* L.) e obtiveram um efeito inibitório substancial sobre todas as leveduras estudadas, mostrando um grande halo de inibição do crescimento das leveduras *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Pichia minuscula* e *Rhodotorula rubra*, com valores de MIC, para a maioria delas, de 20 e 0,6 µL/mL.

Efeito inibitório dos óleos essenciais de citros sobre *Penicillium expansum*

Com base nos resultados obtidos neste experimento, constata-se que houve interação significativa entre óleos, locais (folha ou casca) e concentrações ($p < 0,05$). Pelos dados descritos na Tabela 5, pode-se observar que o óleo da casca do limão-cravo promoveu o desenvolvimento micelial do fungo estudado, ou seja, estimulou o crescimento em relação ao controle. Resultados semelhantes foram observados por Pereira et al.²², que relataram que esse tipo de comportamento requer um estudo específico, por se tratar de vários fatores, tais como: tipo de substrato, reação do fungo ao substrato e diferentes tipos de compostos que podem interferir sobre o comportamento do fungo.

Comparando-se a atuação inibitória dos óleos obtidos da casca dos limões, observa-se que o óleo da casca do limão-galego apresentou maior inibição do crescimento micelial do fungo em todas as concentrações em relação aos demais óleos obtidos da casca. Apenas na concentração de 0,25 $\mu\text{L}/\text{mL}$, o óleo da casca do limão-cravo obteve resultado estatístico igual ao limão-galego ($P < 0,05$).

Pela Tabela 5, pode-se observar que, quando comparados os óleos obtidos da folha dos limões, na concentração de 0,25 $\mu\text{L}/\text{mL}$, o óleo da folha de limão-galego apresenta maior inibição do crescimento micelial que os demais óleos. Na concentração de 0,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, tanto o óleo da folha de limão-galego quanto o de limão-cravo apresentaram maior inibição do crescimento micelial que o óleo da folha do limão-tahiti. Nas concentrações de 1 e 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$, o óleo da folha do limão-cravo foi mais efetivo que os demais e, para a concentração de 4 $\mu\text{L}/\text{mL}$, os óleos não diferiram estatisticamente entre si; porém, promoveram inibição total do crescimento micelial do

fungo estudado.

O efeito inibitório dos óleos obtidos da folha foi maior que o efeito dos óleos obtidos da casca, em todas as concentrações testadas, para todos os óleos ($P < 0,05$), isso pode ser explicado pela maior variabilidade dos constituintes químicos presentes nas folhas em relação à casca²⁴.

Caccioni et al.² trabalharam com os componentes de óleos essenciais de frutos cítricos sobre *Penicillium italicum* e *Penicillium digitatum* e observaram que o citral é o componente mais ativo sobre *Penicillium digitatum*. Quando foi utilizado o óleo essencial de limão-siciliano, colhido em três épocas distintas, verificaram que o óleo do limão colhido em dezembro promoveu maior inibição dos fungos que os óleos dos limões colhidos em fevereiro e junho.

Sharma e Tripathi²³ verificaram que o óleo essencial da casca de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck sobre *Aspergillus niger* promoveu a inibição total do crescimento micelial do fungo, na concentração de 3 $\mu\text{L}/\text{mL}$, após 7 dias de incubação.

CONCLUSÃO

A atividade bactericida dos óleos essenciais testados foi evidenciada sobre *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*; todavia, o óleo da casca do *C. latifolia* (*S. aureus*), da casca do *C. aurantifolia* (*E. coli*) e o da folha do *C. aurantifolia* (*P. aeruginosa*) produziram um maior diâmetro dos halos de inibição.

Os óleos essenciais testados apresentaram efeito inibitório significativo sobre *Candida utilis*, tendo o óleo essencial da folha do *C. aurantifolia* promovido melhor inibição da levedura em estudo.

Tabela 5. Resultados médios do crescimento micelial do fungo *Penicillium expansum* pelos óleos essenciais de *Citrus*.

Concentração ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	Crescimento micelial (mm)					
	<i>C. aurantifolia</i> folha (médias*)	<i>C. aurantifolia</i> casca (médias*)	<i>C. limonia</i> folha (médias*)	<i>C. limonia</i> casca (médias*)	<i>C. latifolia</i> folha (médias*)	<i>C. latifolia</i> casca (médias*)
0	48 ^d	48 ^d	48 ^d	48 ^d	48 ^d	48 ^d
0,25	30 ^c	38 ^c	33 ^c	38 ^c	32 ^c	43 ^d
0,5	27 ^b	35 ^c	27 ^b	47 ^d	32 ^c	42 ^d
1	22 ^b	28 ^b	20 ^b	52 ^d	23 ^b	37 ^c
2	15 ^a	20 ^b	10 ^a	50 ^d	17 ^a	32 ^c
4	8 ^a	9 ^a	8 ^a	45 ^d	9 ^a	15 ^a

Crescimento micelial, em mm, incluindo o diâmetro do inóculo. Diâmetro do inóculo, 8 mm

*médias seguidas da mesma letra minúscula, na coluna, são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

O efeito fungicida dos óleos essenciais foi efetivo sobre o fungo *Penicillium expansum*; porém, os óleos essenciais das folhas dos *C. limonia* e *C. aurantifolia* apresentaram uma melhor inibição micelial do fungo. Entretanto, o óleo da casca do *C. limonia* estimulou o desenvolvimento micelial do fungo em estudo.

REFERÊNCIAS

1. Pereira AA. Efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de bactérias e fungos [dissertação de mestrado]. Lavras, MG: Universidade Federal de Lavras; 2006.
2. Caccioni DRL, Guizzardi M, Biondi DM, Renda A, Ruberto G. Relationship between volatile components of citrus essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *Int J Food Microbiol*. 1998;43:73-9.
3. Prashar A, Hili P, Veness RG, Evans CS. Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*. *Phytochem*. 2003;63:569-75.
4. Grassi Filho H, Penteado BB, Santos dos CH. Preparo de amostras e métodos para a determinação do teor de óleo essencial de frutos de limoeiro. *Rev Bras Frutic*. 2005;27:191-3.
5. Fisher K, Philips CA. The Effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. *J Appl Microbiol*. 2006;101:1232-40.
6. Craveiro AA, Fernandes AG, Andrade CHS, Matos FJ de A, Alencar JW, Machado MIL. Óleos essenciais de plantas do Nordeste. Fortaleza, CE: Universidade Federal do Ceará; 1981.
7. Deans SG, Ritchie G. Antibacterial properties of plant essential oils. *Int J Food Microbiol*. 1987;5:165-80.
8. Mendonça AT. Efeito dos óleos essenciais de condimentos sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* em ricota cremosa [tese de doutorado] Lavras, MG: Universidade Federal de Lavras; 2004.
9. Stangarlin JR, Schwan-estrada KRF, Cruz mês, Nozaki MH. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. *Biotechnol Ciênc & Desenvol*. 1999;11:16-21.
10. SAS Institute. SAS for Windows, Realese 8. Cary; 2000.
11. Ferreira DF. Análises estatísticas por meio do Sisvar para o Windows versão 4.0. Reunião anual da região brasileira da sociedade internacional de biometria. São Carlos: Programas e resumos; 2000. p. 255-8.
12. Smith-Palmer A, Stewart J, Fyfe L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Lett Appl Microbiol*. 1998;26:118-22.
13. Dorman HJD, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol*. 2000;8:308-16.
14. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. *Int J Food Microbiol*. 2004;94:223-53.
15. Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003;67:556-93.
16. Chang ST, Chen PF, Chang SC. Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *J Ethnopharmacol*. 2001;77:123-7.
17. Duarte MCT, Leme EE, Delarmelina C, Soares AA, Figueira GM, Sartoratto A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. *J Ethnopharmacol*. 2007;111:197-201.
18. Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warminton JR. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Meleuca alternifolia* (tea tree oil). *J Appl Microbiol*. 2000;88:170-5.
19. Nakamura CV, Nakamura TU, Bando E, Melo AFN, Cortez DAG, Filho BP. Antibacterial Activity of *Ocimum gratissimum* L. Essential Oil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1999;94:675-8.
20. Sacchetti G, Maietti S, Muzzoli M, Scaglianti M, Manfredini S, Radice M. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chem*. 2005;91:621-32.
21. Souza EL, Stamford TLM, Lima EO, Trajano VN. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. *Food Control*. 2007;18:409-13.
22. Pereira MC, Vilela GR, Costa LMAS, Silva RA, Soares AF, Fonseca EVN. Inhibition fungi growth through of utilization essential oils of spice. *Ciênc Agrotecnol*. 2006;30:731-8.
23. Sharman N, Tripathi A. Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. *Microbiol Res*. 2006;1-8.
24. Lota M, Serra DR, Tomi F, Jacquemond C, Casanova J. Volatile Components of Peel and Leaf Oils of Lemon and Lime Species. *J Agric Food Chem*. 2002;50:796-805.
25. Tserennadmid R, et al. Anti yeast activities of some essential oils in growth medium, fruit juices and milk. *Int J Food Microbiol*. 2011;144:480-6.

Essential oil from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf: a promising natural product against *Malassezia* spp.

Óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf: um produto natural promissor contra *Malassezia* spp.

RIALA6/1479

Egberto Santos CARMO^{1,2*}, Fillipe de Oliveira PEREIRA³, Ana Carolina Pessoa MOREIRA², Lizandro Leite BRITO³, Carla Wanderley GAYOSO³, José Galberto Martins da COSTA⁴, Edeltrudes de Oliveira LIMA²

*Endereço para correspondência: ¹Universidade Federal de Campina Grande, Olho D'Água da Bica, s/n, CEP: 58175-000. Tel.: +55 (83) 3372-1900. Fax: +55 (83) 3372-1935, Cuité, PB, Brasil. E-mail: egbertosantos@ufcg.edu.br

²Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil

³Departamento de Dermatologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil

⁴Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais, Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri, Crato, CE, Brasil

Recebido: 08.11.2011 - Aceito para publicação: 21.04.2012

ABSTRACT

This study evaluated the sensitivity of *Malassezia* spp. strains, the etiologic agent of pityriasis versicolor, to essential oil from *Cymbopogon citratus*. The chemical composition of the essential oil was analysed by GC-MS, and the major constituents were: geraniol (52.80%), neral (36.65%) and myrcene (3.73%). The minimum inhibitory concentration (MIC) of *C. citratus* essential oil on to 22 strains of *Malassezia* spp. were determined by agar dilution technique in the presence and absence of ergosterol (50-250 µg/mL) and sorbitol (0.8 M). Increased MIC values in the presence of ergosterol indicate an effect on fungal membrane, and the higher MIC values in the presence of sorbitol indicate a mechanism of action on the cell wall. The MIC ranged from 0.31 to 1.25 µL/mL and it increased fourfold in the presence of ergosterol, regardless of concentration tested; and this fact was most likely related to the occurrence of the oil and exogenous ergosterol complexes. No change in MIC values in the presence of sorbitol was found. These data infer that *C. citratus* essential oil causes an effect on *Malassezia* spp. plasma membrane synthesis by binding to ergosterol. This study contributes to the development of new antifungal drugs, especially against *Malassezia* spp.

Keywords. *Cymbopogon citratus*, *Malassezia*, pityriasis versicolor, fungal infection.

RESUMO

Este estudo avaliou a sensibilidade de cepas de *Malassezia* spp., agente etiológico da pitiríase versicolor, ao óleo essencial de *Cymbopogon citratus*. A composição química do óleo essencial, obtido por hidrodestilação, foi analisada por CG-EM. Os constituintes majoritários do óleo foram: geraniol (52,80%), neral (36,65%) e mircenol (3,73%). A concentração inibitória mínima (CIM) do óleo essencial de *C. citratus* foi determinada para 22 cepas de *Malassezia* spp. pela técnica de diluição em ágar, na presença e ausência de ergosterol (50-250 µg/mL) e sorbitol (0,8 M). Aumento nos valores de CIM na presença de ergosterol indica interferência na membrana fúngica; e valores mais elevados de CIM na presença de sorbitol indicam mecanismo de ação sobre a parede celular. A CIM variou de 0,31 a 1,25 µL/mL e aumentou quatro vezes na presença de ergosterol, independentemente da concentração testada, fato provavelmente relacionado à formação de complexo do óleo com ergosterol exógeno. Não houve alteração nos valores de CIM na presença de sorbitol. Em conclusão, sugere-se que o óleo essencial de *C. citratus* atue sobre a síntese da membrana plasmática de *Malassezia* spp. ligando-se ao ergosterol. Este estudo contribui no desenvolvimento de novos antifúngicos, especialmente contra *Malassezia* spp.

Palavras-chave. *Cymbopogon citratus*, *Malassezia*, pitiríase versicolor, infecção fúngica.

INTRODUCTION

In recent years, there was a significant increase in fungal infections worldwide, especially in immunocompromised patients. Among fungal infections that frequently appear are highlighted those produced by *Malassezia* spp.^{1,2}.

Malassezia spp. is a lipophilic yeast, which inhabits the human skin saprophytes, but may cause fungal infections in susceptible individuals, when using corticosteroids, transplant recipients, patients with cancer, diabetes and generally immunocompromised. As most common pathologies associated are cited pityriasis versicolor, dandruff, seborrheic dermatitis, atopic dermatitis, folliculitis and, less frequently may be involved in systemic infections, usually by colonization of intravascular catheters, especially in pediatric patient when using parental lipid-rich nutrition²⁻⁵.

The treatment of infections caused by *Malassezia* spp. varies with the seriousness they generally use imidazole derivatives such as fluconazole and itraconazole⁶. These skin diseases have been of concern to researchers and pharmaceutical industry worldwide. Besides the great problem of the many adverse reactions to medicines available in the market can cause, there are still two other problems: the emergence of resistant microorganisms arising from the indiscriminate use of antifungal agents and the issue of common relapses, for example, in people with pityriasis versicolor^{2,7,8}. Thus, it is evident that the development of new antifungal agents is a necessary strategy to overcome problems encountered in treating these diseases⁹.

In this regard, several studies aim new sources of substances with antimicrobial activity, with fewer side effects, low cost, greater safety and efficacy for the population. In part, this search is oriented to the use of medicinal plants and their respective isolate secondary metabolites^{10,11}. Among plants used for medicinal purposes herbs are a prominent group of plants, mainly for its essential oils¹².

Cymbopogon citratus (DC) Stapf is a perennial herb, popularly known in Brazil as “holy grass” and worldwide as “Lemongrass”. It is a plant native to India and cultivated in the tropics and subtropics. Several studies have reported the antimicrobial activities of its oil against different Gram positive and Gram negative pathogenic bacteria, yeasts and filamentary fungi^{10,13-16}. Some components of the essential oil of *C. citratus*

have been reported, such as myrcene and citral. Some authors attributed the oil's antimicrobial properties to the presence of citral in its composition¹⁷. Based on the information about antimicrobial properties of essential oil of *C. citratus*, this study evaluated its antifungal activity against *Malassezia* yeasts.

MATERIAL AND METHODS

Botanical Material

Essential oil of *C. citratus* acquired from Tekton Essential Oils LTDA, whose chemical analysis certificate was issued by the University of Caxias do Sul (Brazil), under no. 019/08.

Essential Oil analysis

Analysis of the oil was performed on Shimadzu GC-17A / MS QP5050A (GC/MS system): OV-5 capillary column (30 m × 0.25 mm id, 0.25 µm film thickness); carrier gas: helium 1,7 mL/min; column inlet pressure 48,7 kPa; linear velocity = 36.0 cm/sec; total flow 50 mL/min; carrier flow 24 mL/min; injector temperature 250 °C; detector temperature 280 °C; column temperature 40 (2 min) – 180 °C (1 min) at 4 °C /min, then 180-280 °C at 10 °C /min (10 min). Mass spectrometer operating conditions 70 eV ionization energy. Identification of Individual components was based on their mass spectral fragmentation using two computer library MS searches (wiley 229), retention indices and comparison with literature data¹⁸.

Synthetic antifungal agent

In the study on antifungal activity of essential oils the ketoconazole disc was used as the standard at 50 µg/mL concentration, obtained from the Center for Disease Control and Diagnostics Products – CECON/Sao Paulo.

Fungal species

Twenty two strains of *Malassezia* were isolated and identified from clinical samples from patients attending the dermatology clinic of University Hospital Lauro Wanderley, Federal University of Paraíba (ethics committee no. 0037), as described by Erchiga et al¹⁹. Identified species were maintained in Mycosel medium supplemented with olive oil and ox bile. Cultures were incubated and maintained at 32 °C²⁰.

Inoculum

From the recent crops and kept in the Mycosel medium with olive oil and ox bile for seven days at 32 °C, the inoculum was prepared and standardized in sterile saline solution. Initially a comparative suspension with tube 0.5 Scale of McFarland was prepared and cell count in a Neubauer chamber. It was adjusted in the spectrophotometer (Leitz-Photometer 340-800 nm) to contain about 10⁶ CFU/mL²¹.

Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

The MIC determination of essential oil of *C. citratus* was performed by the agar dilution technique proposed by Hadacek and Greger²² with some modifications. For the technique, originally Petri dishes were prepared (Petri-Dispo[®]) with 21 mL of culture medium (Mycosel, ox bile and olive oil), plus the essential oil of *C. citratus* at 20-0.16 µL/mL concentrations, according to Allegrini et al²³. Subsequently, 10 µL of fungal inoculums were inoculated on the surface of the solidified culture medium. The system was incubated at 32 °C for seven days. After the appropriate incubation time, the reading was carried out. MIC was defined as the lowest oil concentration able to inhibit fungal growth visually. Tests were performed in duplicate and the geometric mean of results was calculated. MIC₉₀ values were interpreted as the MIC at which there was 90% inhibition growth of strains tested²⁴. Feasibility controls were also performed, only with the microorganisms in the medium and positive, in which the organism was challenged with the antifungal drug ketoconazole at 50 µg/mL concentration.

Sorbitol Bioassay

The test to determine the MIC of essential oil of *C. citratus* was performed as previously described, but 0.8 M sorbitol was added to the medium as osmotic support. Plates were incubated for seven days at 32 °C²⁵. It is considered as mechanism of action of the compounds on fungal cell wall if the compounds MIC in the presence of sorbitol are higher than in its absence. Tests were performed in duplicate and the geometric mean of results was calculated²⁶.

Ergosterol Bioassay

Parallel to the determination of MIC, it is also determined the MIC in the presence of different ergosterol concentrations (50-250 µg/mL) from Sigma-Aldrich[®]. It

is considered as mechanism of action of the compounds on fungal plasma membrane when the compound's MIC in the presence of ergosterol is greater than in its absence. Tests were performed in duplicate and the geometric mean of results was calculated^{27,28}.

RESULTS AND DISCUSSION

The GC-MS analysis of *C. citratus* essential oil resulted in the identification of 8 components (Table 1). Geranial, neral and myrcene are the major components, representing over 90% of phytochemicals. These results confirm previous studies performed by Kasali et al.²⁹ and Andrade et al³⁰.

Table 1. Chemical Composition of the Essential Oil of *C. citratus*

Constituents	Rt*(min)	(%)
6-methyl-5-hepten-2-one	9.72	1.97
myrcene	10.00	3.73
α-terpinolene	13.94	0.80
Neral	19.12	36.65
trans-geraniol	19.63	2.15
Geranial	20.20	52.80
2-octanone	20.97	1.10
2-undecanone	27.75	0.79

*Retention time

Due to some difficulties related to the growth of *Malassezia* spp. using conventional media such as Sabouraud dextrose agar and RPMI – 1640, because of the lipophilic character of this yeast, the technique of agar dilution proposed by Hadacek and Greger²² was modified using the Mycosel medium plus oil 1% olive oil. In Table 2 are recorded the MIC results of the essential oil of *C. citratus* on strains of the genus *Malassezia* determined by the agar dilution technique. There was MIC₉₀ values ranging from 0.31 to 1.25 µL/mL, depending on the *Malassezia* species tested.

Results found for the oil of *C. citratus* corroborate previous studies on the antimicrobial potential of this plant product. Antimicrobial activities of the essential oil of *C. citratus* were attributed to citral in a study conducted by Guerra et al³¹. The myrcene did not show antimicrobial activity, but when combined with citral it has potentiated its effect³².

In 2003, Belém et al.³³ performed a chemical and antifungal evaluation of natural and synthetic products against *Malassezia furfur*. In this study, the oil of *C. citratus* inhibited strains of *M. furfur* in all concentrations.

Table 2. Antifungal activity of *C. citratus* essential oil on strains of *Malassezia* spp.

Microorganisms	MIC range (µL/mL)*	MIC ₉₀ (µL/mL)*	Control	
			Viability	Ket (50 µg/mL)
<i>M. sympodialis</i> (N=12)	1.25 – 0.15	1.25	+	-
<i>M. furfur</i> (N=6)	0.62 – 0.15	0.62	+	-
<i>M. globosa</i> (N=2)	0.62 – 0.31	0.62	+	-
<i>M. obtusa</i> (N=1)	0.62	0.62	+	-
<i>M. slooffiae</i> (N=1)	0.31	0.31	+	-

*Results expressed as geometric mean of two experiments; (+) presence of fungal growth; (-): absence of fungal growth; ket: ketoconazole.

Table 3. MIC values of *C. citratus* essential oil on strains of *Malassezia* spp in the presence and absence of sorbitol (0.8M).

Microorganisms	Essential oil (µL/mL)*	Essential oil + sorbitol*	Control	
			Sorbitol	Viability [#]
<i>M. sympodialis</i> LM-02	1.25	1.25	+	+
<i>M. furfur</i> LM-06	0.62	0.62	+	+
<i>M. obtusa</i> LM-01	0.62	0.62	+	+
<i>M. globosa</i> LM-02	0.31	0.31	+	+
<i>M. slooffiae</i> LM-01	0.31	0.31	+	+

*Results expressed as geometric mean of two experiments; (+) presence of fungal growth; [#]Viability without sorbitol.

The MIC was achieved at a 0.25% concentration with halos on average 10 mm in diameter and at this same concentration there was 80% inhibition of its strains.

The activity of the essential oil *C. citratus* was investigated against other yeasts, such as those of the genus *Candida* isolated from nosocomial infections. To conduct the study were analyzed 24 isolates of *Candida albicans* and 15 isolates of *Candida tropicalis* originated from patients with suspected nosocomial infection and a standard strain of *C. albicans* ATCC 10231, by agar diffusion technique. The essential oil of *C. citratus* showed antifungal activity against 100% of isolates at 25% concentrations¹⁴.

Confirming the antifungal potential of essential oil of *C. citratus*, we carried out a research to investigate possible mechanisms of action. Considering a possible interference of the essential oil in fungal cell wall, the essential oil was tested by the sorbitol bioassay. In Table 3, are exposed the MIC values of essential oil of *C. citratus* in the presence of 0.8 M sorbitol osmotic protector and as can be seen, sorbitol did not protect cells from the inhibitory effects of the essential oil, suggesting another mechanism.

This research the mechanism of antifungal action does not involved interaction with the cell wall and similar results using the same methodology were observed by Pereira³⁴ where it was ruled out the essential oil of *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor as acting on

the cell wall, whereas unchanged MIC values for oil in the presence and absence of sorbitol versus dermatophytes of the genus *Trichophyton*.

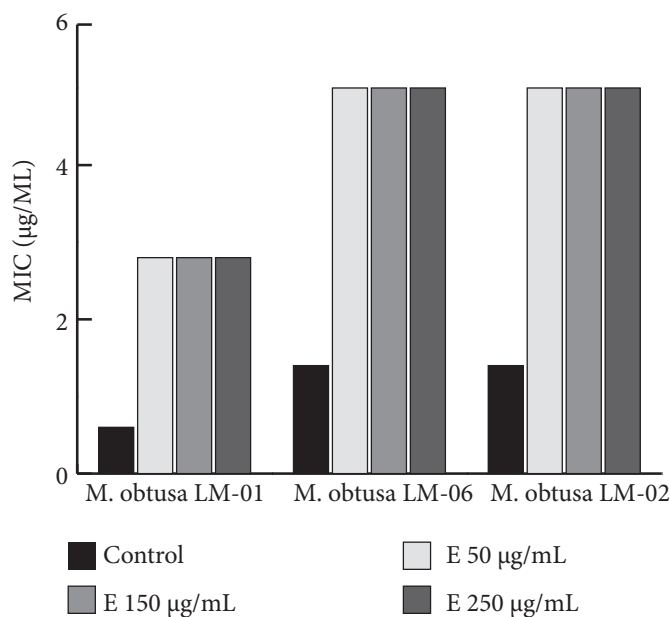


Figure 1. MIC values of *C. citratus* essential oil on strains of *Malassezia* spp in the presence and absence of several concentrations of ergosterol (E). The results are expressed as geometric mean of two experiments

Moreover, Frost et al.²⁵ evaluating the activity of inhibitors of cell wall as papulacandin B (inhibitor of

β -1, 3 glucan biosynthesis) against strains of *Candida albicans* in the absence and presence of sorbitol, found respectively, increased MIC from 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Similar phenomenon occurred with a chitin synthesis inhibitor, the Congo red, which had its MIC increased by one hundred fold in the presence of sorbitol.

Additionally the test of ergosterol was conducted to verify the effects of essential oil of *C. citratus* on cell membrane of *Malassezia* strains. The MIC_{90} before 0.31-1.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$, increased four times its value in the presence of ergosterol (see Figure 1), regardless of concentration tested. This fact can be associated with a complexation of the oil with the exogenous ergosterol, suggesting a possible mechanism of action on the ergosterol of fungal membrane.

Similar studies involving the test of ergosterol were conducted by other researchers, but with different results. For example, in a study by Escalante et al.²⁷ with B Phytolaccoside isolated from *Phytolacca tetramer* versus *Saccharomyces cerevisiae* it was observed that the MIC was unchanged in the presence of different concentrations of exogenous ergosterol (50-250 $\mu\text{g}/\text{mL}$), suggesting that the B Phytolaccoside would not act by binding to membrane's ergosterol, but by binding to other components of the fungal membrane whereas the amphipathic nature of the molecule tested.

Noting the possibility of ellagic acid has activity on fungal membrane ergosterol of *Saccharomyces cerevisiae*, Silva Junior et al.²⁸ observed MIC values in the presence of increased concentrations of ergosterol and, due to no changes in these values; it was suggested different mechanism of action. Then, by testing with sorbitol, it was found a MIC increase from 62 to 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in the presence of 0.8 M sorbitol, concluding a possible action of the acid on the synthesis of fungal cell wall.

Currently, there are drugs available for clinical use that directly interact with ergosterol, causing irreversible damage to the fungal cell membrane, like that of B amphotericin³⁵. The association of essential oil of *C. citratus* with ergosterol, the main sterol present in fungal membrane, can cause a disruption of their functions up to cause the release of their cell constituents⁹. The structure and function of plasma membrane in fungal cells is essential for fungus survival, whereas the occurrence of changes in the synthesis or maintenance of cell membranes usually results in lethality³⁶. Therefore, data found in this study prove to be quite promising.

It is observed that the essential oil of *C. citratus*

may be a promising antifungal agent to improve the treatment available, especially against *Malassezia* yeasts, whereas in addition to the antimicrobial activity observed, a possible mechanism of action on fungal plasma membrane ergosterol was observed.

REFERENCES

1. Quindos G. Las micosis en el amanecer del siglo XXI. *Rev Iberoam Micol*. 2002;19:1-4.
2. Tragiannidis A, Bisping G, Koehler G, Groll AH. Minireview: *Malassezia* infections in immunocompromised patients. *Mycoses*. 2009;53(3):187-95.
3. Batra R, Boekhout T, Gueho E, Cabañes FJ, Dawson TL, Gupta AK. *Malassezia* Baillon, emerging clinical yeasts. *FEMS Yeast Res*. 2005;5(12):1101-13.
4. Miranda KC, Araujo CR, Costa CR, Passos XS, Fatima LFO, Rosário RSM. Antifungal activities of azole agents against the *Malassezia* species. *Int J Antimicrob Agents*. 2007;29(3):281-4.
5. Ashbee HB. Update on the genus *Malassezia*. *Med Mycol*. 2007;45(4):287-303.
6. Baysal V, Yildirim M, Ozcanli C, Ceyhan AM. Itraconazole in the treatment of seborrheic dermatitis: a new treatment modality. *Int J Dermatol*. 2004;45(1):63-6.
7. Curtis L, Cali S, Conroy L, Baker K, Ou CH, Hershov R, et al. *Aspergillus* surveillance project at a large tertiary-care hospital. *J Hosp Inf*. 2005;59(3):188-96.
8. Barberán J, Mensa J, Fariñas C, Llinares P, Serrano S, Ménéndez R, et al. Recommendations of antifungal treatment in patients with low grade immunosuppression. *Rev Esp Quimioter*. 2008;21(2):127-42.
9. Odds FC, Brown AJP, Gow NAR. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol*. 2003;11(6):272-79.
10. Cimanga K, Kambu K, Tona L, Apers S, De Bruyne T, Hermans N, et al. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *J Ethnopharmacol*. 2002;79(2):213-20.
11. Ferreira TM, Silva FS, Teodoro GR, Costa ACBP, Maria A, Beltrame Junior M, et al. Atividade antifúngica do citral em leveduras do gênero *Candida* isoladas de pacientes hospitalizados. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2009;68(1):118-25.
12. Nunes XP, Maia GLA, Almeida JRGS, Pereira FO, Lima EO. Antimicrobial activity of the essential oil of *Sida cordifolia* L. *Braz J Pharmacogn*. 2003;16:642-4.
13. Lima EO, Gompertz OF, Giesbrecht AM, Paulo MQ. In vitro antifungal activity of essential oils obtained from officinal plants against dermatophytes. *Mycoses*. 1993;36(9-10):333-6.
14. Silva FS, Ferreira TM, Teodoro GR, Costa ACBP, Maria A, Beltrame Junior M, et al. Antifungal activity of *Cymbopogon citratus* essential oil on *Candida albicans* and *Candida tropicalis* strains isolated from nosocomial infections. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2009;68(3):434-41.
15. Irkin R, Korukluoglu M. Effectiveness of *Cymbopogon citratus* L. essential oil to inhibit the growth of some filamentous fungi and yeasts. *J Med Food*. 2009;12(1):193-7.

16. Naik MI, Fomda BA, Jaykumar E, Bhat JA. Antibacterial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against some selected pathogenic bacteria. *Asian Pacific J Trop Med*. 2010;3(7):535-8.
17. Schuck VJA, Fratini M, Rauber CS, Henriques A, Schapoval EES. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Cymbopogon citratus*. *Braz J Pharm Sciences*. 2001;37(1):45-9.
18. Adams RP. *Identification of essential oils components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy*. Chicago: Allured Publishing Corporation; 2001.
19. Erchiga VC, Palomo MC, Moyano EG. Diagnóstico de laboratorio de las levaduras del género *Malassezia*. *Piel*. 2008;23(10):570-6.
20. Neufeld PM. *Manual de micología médica: técnicas básicas de diagnóstico*. Rio de Janeiro: Programa Nacional de Controle de Qualidade; 1999.
21. Cleeland R, Squires E. Evaluation of new antimicrobials “in vitro” and in experimental animal infections. In: LORIAN, V. M. D. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Williams & Wilkins; 1991:739-788.
22. Hadacek F, Greger H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phyto Anal*. 2000;11(3):137-47.
23. Allegrini J, Bouchberg MS, Maillols H. Émulsions d’huiles essentielles fabrication et applications en microbiologie. *Soc Pharm Mont*. 1973;33(1):73-86.
24. Santos FA, Bastos EMA, Uzeda M, Carvalho MAR, Farias LM, Moreira ESA. Antibacterial activity of propolis produced in Brazil against *Actinobacillus acinomyetemcomitans*, *Fusobacterium* spp. and bacteria from the *Bacterioides fragilis* group isolated from human and marmoset hosts. *Anaer*. 1999;5:479-81.
25. Frost DL, Brandt KD, Cugier D, Goldman R. A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly. *J Antib*. 1995;48(4):306-10.
26. Svetaz L, Aguero MB, Alvarez S, Luna L, Feresin G, Derita M, et al. Antifungal activity of *Zuccagnia punctata* cav.: Evidence for the mechanism of action. *Planta Med*. 2007;73(10):1-7.
27. Escalante A, Gattuso M, Perez P, Zacchino S. Evidence for the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. *J Nat Prod*. 2008;71(10):1720-5.
28. Silva Junior IE, Raimondi M, Zacchino M, Cechinal Filho V, Noldin VF, Rao VS, et al. Evaluation of the antifungal activity and mode of action of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., Lythraceae, stem-bark extracts, fractions and ellagic acid. *Braz J Pharmacogn*. 2010;20(3):422-8.
29. Kasali AA, Oyedeji AO, Ashilokun AO. Volatile leaf oil constituents of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. *Flav Frag J*. 2001;16(5):377-8.
30. Andrade EHA, Zoghbi MGB, Lima MP. Chemical Composition of the Essential Oils of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf Cultivated in North of Brazil. *J Essential Oil Bear Plant*. 2009;12(1):41-5.
31. Guerra MJM, Badell JB, Albajes ARR, Perez HB, Meneses RF, Lainez AA. Evaluación toxicológica aguda de los extractos fluidos al 30 y 80% de *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf (Caña Santa). *Rev Cubana Plant Med*. 2000;5(3):97-101.
32. Onawunmi GO, Yisak WA, Ogunlana EO. Antibacterial constituents in the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. *J Ethnopharmacol*. 1984;12(3):279-86.
33. Belém LF, Lima EO, Barbosa Filho JM, Silva Filho RN, Lima JR, Casimiro GS. Atividade antifúngica de óleos essenciais “in vitro” contra cepas de *Malassezia furfur*. *Rev Bras Pl Med*. 2003;6(1):77-83.
34. Pereira FO. Antifungal activity of the essential oil of *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor on dermatophytes of the genus *Trichophyton* [dissertação de mestrado]. João Pessoa, PB: Universidade Federal da Paraíba; 2009.
35. Valgus JM. What’s new in antifungals?. *Curr Infect Dis Rep*. 2003;5(1):16-21.
36. Cihlar RL, Kellogg C, Broedel Junior S. Antifungal drugs targets: discovery and selection. In: Calderone RA, Cihlar RL. *Fungal pathogenesis: principles and clinical applications*. Nova York: Marcel Dekker; 2002.

Avaliação do efeito do uso de conservante e dos diferentes momentos de coleta para a determinação de iodo na urina

The effect of the use of preservative and of the different samples collection times on the iodine determination in urine

RIALA6/1480

Regina Maria CATARINO^{1*}, Juliana Martinez PEREIRA¹, Jerenice Esdras FERREIRA¹, Glaucia Cruzes DUARTE², Patrícia Emília BRAGA³, Marina Yoshiê Sakamoto MAEDA¹, Raimunda Telma de Macêdo SANTOS¹

*Endereço para correspondência: ¹Núcleo de Hematologia e Bioquímica, Centro de Patologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil. Tel.: 3068-2873. E-mail: rmcatarino@yahoo.com.br

²Fundação Faculdade de Medicina-Universidade de São Paulo

³Faculdade São Camilo, São Paulo

Recebido: 25.07.2011 - Aceito para publicação: 11.05.2012

RESUMO

A determinação do iodo é o marcador bioquímico mais utilizado para avaliar suas concentrações na urina e é indicador importante nos estudos epidemiológicos e clínicos. Neste trabalho, foi avaliado o efeito do uso de conservante na coleta de urina em frasco coletor, nos períodos antes (A) e após (B) o almoço, e nas amostras distribuídas em tubos com (C) e sem (S) conservante para determinar as concentrações de iodo e creatinina. A dosagem de creatinina foi utilizada para aferir a função renal. Foram analisadas amostras de 20 indivíduos entre 18 a 40 anos de ambos os sexos. Houve concordância nas concentrações de iodo no (A), sendo o coeficiente de correlação intraclasse (CCI) = 0,769 nos tubos (C) e CCI = 0,724 nos tubos (S), assim como entre (A) CCI = 0,941 e (B) CCI = 0,983. Não houve concordância nas concentrações de creatinina nos tubos (C) CCI = 0,369 e (S) CCI = 0,264 nos dois períodos e, também, entre (A) (CCI = 0,916) e (B) (CCI = 0,998). Por não terem sido detectadas variações nas concentrações de iodo nas amostras de urina, ambos os tubos, (C) ou (S), podem ser utilizados com igual confiabilidade. Não foi detectada variabilidade na determinação de iodo na amostras de urina coletadas nos períodos (A) e (B).

Palavras chave. iodo urinário, amostra de urina, creatinina urinária, tubos com conservante, tubos sem conservante.

ABSTRACT

Urinary iodine determination is the mostly useful biochemical marker for evaluating their concentrations, for conducting epidemiological and clinical studies. This investigation evaluated the effects of the preservatives use in the urine samples collected into collector flasks before (A) and after (B) breakfast, and in the samples distributed into tubes either containing (C) or without (S) preservative on determining iodine and creatinine concentrations. The creatinine determination was performed to assess the renal function. This analysis included urine samples from 20 male and female individuals aged from 18 to 40 years. Agreements in the iodine concentrations were found in samples (A) showing an intraclass correlation coefficient (ICC) = 0.769 and ICC = 0.724 in tubes (C) and (S), respectively, and besides between (A) CCI = 0.941 and (B) ICC = 0.983. No agreement on the creatinine concentrations in the tubes (C) ICC = 0.369 and (S) ICC = 0.264 at both periods was observed, and no correlation between (A) (ICC = 0.916) and (B) (ICC = 0.998) as well. No effects was detected on the iodine concentrations in urine samples collected at both periods (A) and (B), and using either tube (C) or (S).

Keywords. urinary iodine, urine samples, urinary creatinine, tube with preservative, tube without preservative.

INTRODUÇÃO

Uma adequada ingestão de iodo por meio da dieta é exigida para a produção do hormônio da glândula da tireóide e para manter um estado eutiróideo¹. As desordens causadas pela deficiência de iodo (DI) afetam potencialmente 2,2 bilhões de pessoas por todo o mundo². Por essa razão, o seguimento na medição da ingestão de iodo proveniente de alimentos e/ou medicamentos tem relevância clínica.

O estudo realizado por Duarte e colaboradores avaliou, por meio da ultrassonografia, a glândula tireóide e estudou a excreção de iodo na urina ou iodúria (IU) de 964 crianças em idade escolar, constatou valores médios de IU de 30 µg/dL ou 300 µg/L e 11,7%, desses escolares, apresentavam hipoecogenicidade do parênquima tireoidiano à ultrassonografia. Considerando que a hipoecogenicidade é um importante marcador de doença tireoideana autoimune, concluiu-se a clara relação entre o excesso de iodo e tireoidite³.

Em laboratório clínico, as medições de iodo são utilizadas para pesquisas ou estudos epidemiológicos^{4,5}, com o intuito de avaliar a ingestão deste micronutriente em uma determinada população^{6,7}.

O Conselho Internacional para Controle das Desordens por Deficiência de Iodo, da sigla em inglês International Council for the Control of Iodine Deficiency Disorders (ICCIDD), recomenda o método de determinação do iodo urinário (IU) como indicador epidemiológico mais utilizado para avaliar as concentrações de iodo na urina, as quais refletem o iodo ingerido na dieta^{1,5-7}.

Em muitos países, a adição adequada de iodo na alimentação é alcançada, principalmente, pela iodação de sal produzido para consumo humano, representando em alguns países desenvolvidos uma estratégia preventiva e mandatória^{8,9}. No Brasil, a Resolução RDC nº 130, de 26 de maio de 2003, estabelece o teor de iodo no sal para consumo humano, igual ou superior a 20 (vinte) miligramas até o limite máximo de 60 (sessenta) miligramas de iodo por quilograma de produto.

Alguns estudos consideram que o consumo excessivo de iodo pode conduzir inibição da síntese do hormônio da tireóide principalmente em indivíduos susceptíveis¹⁰, levando ao predomínio do aumento das tiroidites autoimunes^{11,12} e ao hipertireoidismo iodo-induzido e, como consequência da correção do iodo¹³, o bócio e o hipotireoidismo iodo-induzido, descrito em

população que apresentou um grande consumo dietético de iodo¹⁴.

O mecanismo de inibição do hormônio tiroideano pela excessiva ingestão de iodo ainda não foi amplamente elucidado¹⁵⁻¹⁷.

Em estudos populacionais, os níveis de excreção de IU refletem a dieta de iodo naquela determinada população¹⁸, e a melhor forma de se determinar a ingestão de iodo é na amostra de urina de 24 horas, o que, muitas vezes, é impraticável em estudos epidemiológico e clínico, que frequentemente ficam sujeitos a erros na coleta de urina por parte dos pacientes; por esse motivo, a utilização de amostra isolada¹⁹⁻²¹.

As concentrações de IU de uma micção para outra podem ser diferentes, e, quando a determinação de iodo se realiza em amostras isoladas de urina, estas diferenças são compensadas relacionando-as com a creatinina urinária, sendo expressa em iodo excretado µg (micrograma)/g (grama) de creatinina^{4,17}.

Informações recentes sugerem que o uso da relação (IU/Cr) ajustada por idade e sexo em uma amostra matinal, em jejum, é semelhante à IU de 24 horas se o estado nutricional, em modo geral, for adequado. Com isso, a excreção de iodo e de creatinina urinárias, sendo diferentes nos ciclos diurnos e sazonais consequentemente, a razão entre iodo/creatinina pode variar durante o dia ou época do ano²².

Mais recentemente, tem sido sugerido que a excreção de IU por possuir uma variação diurna com valores médios pela manhã ou das 8 às 12 horas e após o almoço, sugerindo que, para estudos epidemiológicos e no monitoramento do iodo, as amostras de urina deveriam ser coletadas durante esses períodos²².

Sabe-se também que existem variações na hidratação entre os indivíduos mesmo em um grande número de amostras, de modo que a mediana das concentrações das amostras se correlaciona bem com as amostras coletadas em 24 horas. Como existe uma variabilidade na concentração de IU de dia para dia²³, pode-se utilizar a dosagem de creatinina para estimar a excreção de iodo por dia, especialmente em indivíduos desnutridos, em que a concentração de creatinina é baixa.

Em estudos epidemiológicos, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que a excreção de IU deva ser expressa em µg de iodo por unidade de volume µg/dL (*micrograma/decilitro*) ou µg/L (*micrograma/litro*) de urina.

A ingestão de iodo é considerada ótima quando o iodo urinário está na faixa de 10-30 µg/dL ou 100-300 µg/L. Abaixo de 10 µg/dL ou 100 µg/L, a nutrição de iodo é considerada deficiente e acima de 300 µg/L é considerada excessiva com risco de morbidades associadas²⁴(Figura 1).

Concentração de iodo (µg/DL) na urina	
Suficiência	10,00 – 30,00
Deficiência leve	5,00 – 9,00
Deficiência moderada	2,50 – 4,90
Deficiência grave	< 2,50

Figura 1. Valores de referencia segundo o ICCIDD e a OMSS

Contudo, é importante salientar a realização do controle da fase pré-analítica para eliminar possíveis interferentes na reação de iodo seguindo determinados procedimentos de coleta e armazenamento destas amostras²⁵. Quanto à fase analítica, a reação de iodo é preconizada na temperatura ambiente (TA) de 20 ± 2 °C, segundo a OMS. É de fundamental importância à utilização de água ultrapura no preparo dos reagentes e soluções. Como também em todas as etapas da reação, deve-se rigorosamente tomar os devidos cuidados com a luz direta incidindo sobre os reagentes manipulados desde o preparo das soluções de trabalho até o momento da leitura no espectrofotômetro para obtenção da concentração do iodo.

A dosagem de IU tem uma importante utilidade na clínica médica: é empregada para avaliar a captação cervical do iodo radioativo (¹³¹I) após tireoidectomia total no tratamento de carcinoma papilífero de tireoide. É utilizada no tratamento das deficiências de iodo moderadas ocasionadas durante a gestação: materna e de seus recém-nascidos e também, considerando-se as características geográficas do território nacional, essa metodologia é utilizada em estudos de monitoramento do iodo em uma determinada população.

O presente estudo tem como objetivos avaliar o efeito do uso de conservante para determinar as concentrações de iodo na urina e comparar sua conservação de acordo com os diferentes períodos de coleta e os sistemas de armazenamento, principalmente em se tratando de amostras isoladas.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado no Núcleo de Hematologia e Bioquímica do Centro de Patologia

do Instituto Adolfo Lutz. As amostras isoladas foram obtidas de pacientes de consultório privado, com termo de consentimento livre e esclarecido pelos participantes, e o apoio clínico a todos foi provido por uma única profissional.

Seleção dos pacientes

Neste estudo, foram incluídos 20 indivíduos entre 18 a 40 anos, de ambos os sexos, sabidamente sem tiroidopatias, sem doenças renais ou alterações na taxa de infiltração glomerular (avaliada pela dosagem alterada de creatinina sérica), hematológicas, gastrointestinais ou hepáticas ou fazendo uso de medicações que continham iodo em sua formulação, ou dieta rica em alimentos contendo iodo nas últimas 72 horas.

De acordo com o protocolo desta pesquisa, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz sob o nº 004/2010, as coletas das amostras isoladas de urina foram previamente agendadas com dia e horários marcados. A coleta durou o tempo necessário para que o participante recebesse as instruções e realizasse a primeira micção no período das 8 às 11 horas (A = antes do almoço) e a segunda micção, no mesmo dia, no período de 12 às 14 horas (B = 2 horas após o almoço). O material utilizado para a coleta de urina foi em frasco coletor universal. O armazenamento das amostras de urina pós-coleta e o transporte das mesmas até Instituto Adolfo Lutz (IAL) foram realizados a temperatura entre +4 °C e +8 °C.

Do frasco coletor universal, foram transferidos 10 mL de urina para os tubos com conservante (C) [BD Vacutainer – UA Preservative Tube/BD, Franklin Lakes, NJ USA-Sterile/R] e sem (S) conservante, identificados: AC (A = antes do almoço/C = tubo com conservante), AS (A = antes do almoço/S = tubo sem conservante), BC (B = depois do almoço/C = tubo com conservante) e BS (B = depois do almoço/S = tubo sem conservante). O período de coleta até a transferência das amostras para os tubos levou aproximadamente 24 horas. Imediatamente foi dosada a creatinina na urina dos tubos AC, AS, BC e BS, pela reação cinética pelo método Jaffé²⁶ com kit comercial da Roche em sistema automatizado Cobas Integra 400 (Roche Diagnostics GmbH, Alemanha); logo após, os tubos foram armazenados a -20 °C para posterior análise do IU.

A determinação do IU foi obtida a partir da curva analítica, utilizando soluções de trabalho de 2 µg/dL, 5 µg/dL, 10 µg/dL e 15 µg/dL preparada com solução de

iodato de potássio para cobrir toda a faixa do ensaio, por meio da reação bioquímica colorimétrica recomendada pelo ICCIDD²⁷ também considerada de baixo custo e de execução relativamente simples, baseada na reação de Sandell-Kolthoff (1937)²⁸, modificada por Pino (1996)²⁹ e adaptada em nosso laboratório³⁰⁻³². A essas soluções de trabalho e amostras de urina, foi adicionado o persulfato de amônio com a finalidade de digerir os possíveis interferentes oxidantes e redutores contidos nessa fase da reação. A reação com esse reagente químico foi realizado em temperatura entre 94 °C por 30 minutos em capela química de exaustão ao abrigo da luz. Em seguida, as soluções foram colocadas em banho-maria a 37 °C e acrescidos os seguintes reagentes: ácido arsenioso 0,2N, ácido sulfúrico 2,5N, água milliQ e sulfato cérico amoniacal.

O princípio da reação se baseia na detecção indireta do iodo pela monitoração da redução do sulfato cérico amoniacal. O iodeto presente na amostra catalisa a redução do íon cérico (Ce^{4+}), amarelo, a íon ceroso (Ce^{3+}), transparente. O resultado da reação dá-se de forma indireta, ou seja, à medida que o iodeto presente na amostra é catalisado de íon cérico (amarelo) a íon ceroso (transparente), a absorbância apresentada é inversamente proporcional à concentração do iodo urinário. Para a leitura dos parâmetros, foi utilizado espectrofotômetro UV/VIS (HP 8453/Agilent-Modelo G1103) acoplado a um programa de computador para a técnica de determinação de iodo urinário em um comprimento de onda de 405 nm (Figura 2). Os resultados foram expressos em $\mu\text{g/dL}$ de iodo urinário.

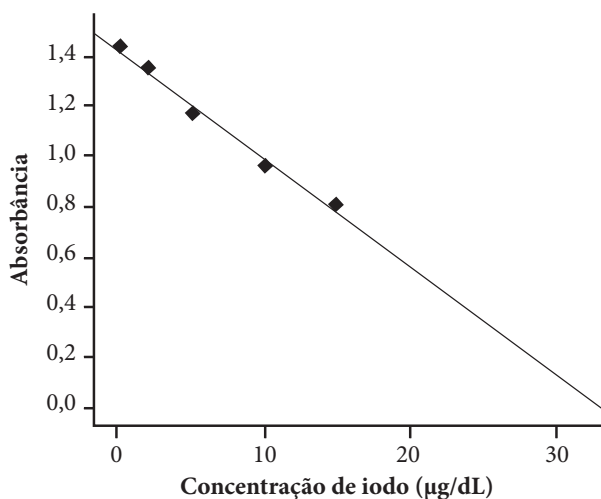


Figura 2. Curva de calibração do iodo urinário

O método da determinação de IU foi validado empregando-se os parâmetros de sensibilidade analítica encontrando-se 0,5 $\mu\text{g/dL}$ de iodo; especificidade analítica de 97,4%; exatidão de 1,03; precisão: coeficiente de variação (CV) de 4,86% para a reprodutibilidade e 3,18% para a repetibilidade e uma incerteza de medição de 0,307 $\mu\text{g/dL}$ ³³.

Todos os resíduos químicos provenientes da reação de iodo foram acondicionados seguindo as normas do Plano de Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde (PGRSS) da Instituição e atendendo aos requisitos da ANVISA – RDC/nº 306 de 12/2004 e CONAMA nº 358 de 04/2005, quanto ao armazenamento, descarte e destino final.

O período de armazenamento das amostras nos respectivos tubos para as dosagens de creatinina foi de aproximadamente 24 horas e, para as determinações do iodo urinário, três meses.

Análise estatística

Os dados foram inseridos e analisados no banco de dados dos programas estatísticos SPSS – versão 15 e STATA 9.0 (StataCorp LP, College Station, Texas, USA). Em seguida, realizaram-se as checagens de consistência com as correções pertinentes.

Inicialmente, efetuou-se a análise descritiva das variáveis do estudo. No que tange às variáveis quantitativas, foram feitas estimativas das medidas de tendência central e de dispersão.

Para análise de concordância entre os valores obtidos para a concentração de iodo nos dois tubos de coleta com (C) e sem (S) conservante antes (A) e após o almoço (B), calculou-se o coeficiente de correlação intraclass da concentração de iodo em ambos os métodos e períodos e seu intervalo com 95% de confiança. Da mesma forma, procedeu-se com as concentrações de creatinina.

Neste estudo, adotou-se nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Dentre os 20 participantes deste estudo, 11 (55%) eram mulheres. Em média, os indivíduos tinham 28,9 anos de idade (desvio-padrão = 5,2), mediana = 29 (mínimo = 21 e máximo = 37).

Cada participante coletou duas amostras casuais de urina: uma no período (A) e outra no período (B), sendo distribuídas em dois tubos (C) e (S) conservante e

perfazendo o total de 80 (oitenta) tubos, nos quais foram dosadas as concentrações de iodo e de creatinina.

Os valores normais de referência segundo o ICCIDD e a OMS para a iodúria é de 10,00 µg/mL a 30,00 µg/mL (Figura 1) e para a dosagem creatinina urinária em mulheres de 29-226 mg/dL e homens de 40-278 mg/dL segundo seu fabricante.

A Tabela 1 demonstra os valores encontrados das concentrações de iodo e de creatinina na urina. As médias das concentrações de iodo no período (A) nos tubos (C) e (S) conservante variaram de 26,8 a 27,7 µg/dL e, no período (B) nos tubos (C) e (S) conservante, variaram de 29,4 a 29,8 µg/dL. Quanto às médias das dosagens de creatinina no período (A), nos tubos (C) e (S) conservante, variaram de 103,8 a 109,1 mg/dL e, no período (B) nos tubos (C) e (S) conservante, variaram de 153,8 a 154,5 mg/dL.

Tabela 1. Análise descritiva dos valores das concentrações de iodo e de creatinina na urina

CONCENTRAÇÃO	n=80	média (DP) (µg/dL)	mediana (mín - máx)
Iodo			
<i>Período A</i>			
(C) conservante		27,7 (7,3)	29,4 (8,4 - 36,0)
(S) conservante		26,8 (9,3)	30,4 (1,4 - 36,0)
<i>Período B</i>			
(C) conservante		29,8 (6,4)	32,3 (16,0 - 37,9)
(S) conservante		29,4 (6,7)	31,7 (16,4 - 36,7)
Creatinina			
<i>Período A</i>			
(C) conservante		103,8 (47,4)	106,0 (30 - 228)
(S) conservante		109,1 (52,2)	104,5 (30 - 226)
<i>Período B</i>			
(C) conservante		153,8 (63,2)	154,0 (33 - 259)
(S) conservante		154,5 (64,1)	152,5 (33 - 260)

Período A: antes do almoço; Período B: após o almoço; (C)=com conservante; (S)=sem conservante

Verificou-se que houve concordância nas concentrações de iodo nos tubos (C) entre os dois períodos (A) e (B) [apresentando um coeficiente de correlação intraclassa (CCI)=0,769; e um Índice de Correlação (IC) 95%: 0,511-0,901]. O mesmo ocorreu com as concentrações das amostras nos tubos (S) conservantes (CCI = 0,724; IC de 95%: 0,430-0,880) nos dois períodos de coletas (A) e (B).

Analogamente, ao compararmos os resultados da concentração de iodo no período (A) entre os tubos (C) e (S) conservante, apresentou (CCI = 0,941; IC 95%:

0,860-0,976), o mesmo ocorreu no período (B) entre as amostras (C) e (S) conservante (CCI = 0,983; IC 95%: 0,958-0,993).

Quanto à dosagem de creatinina, não foi observada concordância nas concentrações dos tubos (C) nos dois períodos (A) e (B) apresentando (CCI = 0,369; IC95%: 0,000-0,690). Tampouco foi observada concordância nas concentrações nos tubos (S) obtidas em ambos os períodos (A) e (B) (CCI = 0,264; IC95%: 0,000-0,623). Entretanto, observou-se concordância entre os tubos nos períodos (A) (CCI = 0,916; IC95%: 0,803-0,965) e no (B) (CCI = 0,998; IC95%: 0,997-0,999).

Entretanto, não foi observada concordância nas concentrações nos tubos (C) conservante nos dois períodos (A) e (B), demonstrando (CCI=0,369; IC95%: 0,000-0,690). Tampouco foi observada concordância nas concentrações nos tubos (S) conservante obtidas em ambos os períodos (A) e (B) (CCI = 0,264; IC95%: 0,000-0,623).

Também foram demonstrados os resultados obtidos para as concentrações de iodo e de creatinina na urina nos diferentes sistemas de armazenamento (C) e (S) conservante segundo os períodos de coletas (A) e (B), em que foi observada uma distribuição homogênea das concentrações tanto para iodo quanto para a creatinina, considerando-se os valores normais para iodo e para creatinina na urina (Figuras 3 e 4).

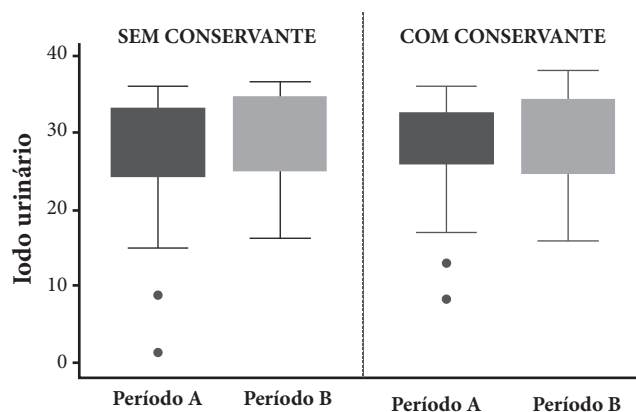


Figura 3. Valores da concentração de iodo urinário em (n = 40) amostras de urina coletadas de pacientes em diferentes períodos: (n = 20) antes do almoço (A) e (n = 20) após o almoço (B) distribuídas em (n = 20) tubos com conservante (C) e (n = 20) tubos sem conservantes (S). As caixas contêm dados entre 25% e 75% percentis com as medianas; e os limites estão representados por uma linha. Os valores fora das caixas representam os valores abaixo da normalidade para iodúria

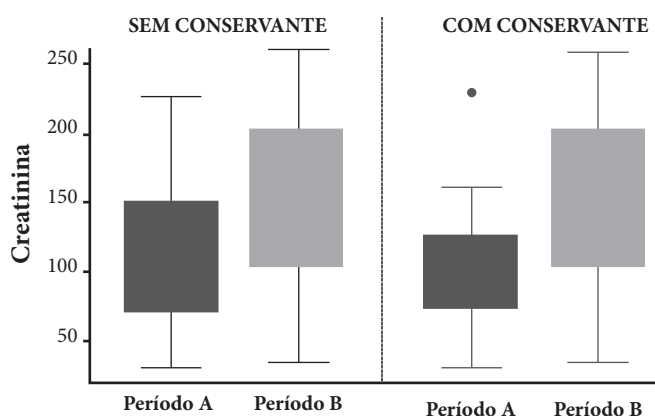


Figura 4. Valores da concentração de creatinina urinária em (n = 40) amostras de urina coletadas de pacientes em diferentes períodos: (n = 20) antes do almoço (A) e (n = 20) após o almoço (B) distribuídas em (n = 20) tubos com conservante (C) e (n = 20) tubos sem conservantes (S). As caixas contêm dados entre 25% e 75% percentis com as medianas; e os limites estão representados por uma linha. O valor fora da caixa representa o valor acima de creatinina urinária para mulheres

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Considerando a importância para a saúde pública das doenças causadas tanto pela carência como pelo excesso de iodo, o Instituto Adolfo Lutz como Laboratório de Saúde Pública, atualmente é o único no país a realizar a detecção de iodo na urina, e vem cada vez mais aprimorando essa técnica^{3,4,7,15,30-33}. A determinação de iodo na urina é o principal indicador bioquímico na avaliação epidemiológica da deficiência de iodo. O iodo urinário é considerado o indicador mais sensível para mudanças recentes no aporte de iodo, sendo sua dosagem implementada em programas de controle das Desordens por Deficiência de Iodo (DDI). O padrão ouro para medir a excreção urinária de iodo é a urina de 24 horas, porém a mesma torna-se difícil e não confiável para estudos epidemiológicos, por acarretar uma série de inconvenientes e dificuldades para o paciente na coleta de urina^{34,35}. É um dos métodos bioquímico mais utilizado, devido a seu baixo custo operacional e à simplicidade do procedimento³⁶.

Sendo assim, em estudos epidemiológicos, a ingestão diária de iodo é estimada por meio de uma amostra casual de urina, ajustada ou não para a creatinina urinária³⁷.

No presente estudo, procuramos analisar a variabilidade da concentração de IU em amostras casuais de urina armazenadas em tubos (C) e (S) conservante e nos períodos (A) e (B), como também avaliar as dosagens

de creatinina e a integridade dessas amostras.

Os resultados encontrados mostraram uma concordância estatística entre os diferentes tubos de armazenamento (C) e (S) conservante e nos períodos (A) e (B) em um mesmo indivíduo, podendo prever que a coleta casual da amostra urinária poderá ocorrer em qualquer um dos tempos ao longo do dia, viabilizando resultados confiáveis de valores para concentração de iodo, o que não foi observado para a creatinina urinária. Também foi observada uma concordância entre os valores das concentrações nos períodos de coletas (Tabela 1).

A medida da creatinina nessas amostras de urina foi realizada para aferir a função renal e se estimar a excreção de iodo no momento da coleta das amostras de urina. A adequação da excreção de iodo urinária pela creatinina é uma medida mais confiável para quantificar iodo urinário nos indivíduos, quando comparada com a concentração de UI/L, já que a creatinúria promove a adequação da amostra casual para urina de 24 horas³⁸.

A quantidade de iodo urinário em uma amostra casual de urina reflete a ingesta deste em curto período anterior à coleta³⁹. Importante lembrar que a excreção renal corresponde a mais de 90% das perdas e é equivalente à ingesta nutricional.

Também observou-se que os resultados de iodúria não variaram, quando comparados aos diferentes tubos de armazenamento (C) e (S) conservante, desde que sejam aplicadas as boas práticas de coleta e conservação de amostra (Tabela 1).

Em relação à dosagem de creatinina, foi observado, dentro do valor de normalidade independente do sexo, um discreto aumento após o almoço (B), quando comparada com as dosagens antes do almoço (A), sugerindo estar relacionado com a ingestão alimentar dos participantes naquele período. Observou-se também que houve uma concordância dos valores de creatinina entre os tubos (C) e (S) em cada período (Tabela 1).

Os resultados obtidos das concentrações de iodo e de creatinina na urina nos tubos de armazenamento (C) e (S) conservante, segundo os períodos de coletas (A) e (B), foram observados uma distribuição homogênea das concentrações tanto para a excreção de iodo quanto para a creatinina, considerando os valores normais tanto para iodo quanto para creatinina (Figuras 3 e 4).

Na Figura 3, observamos no período (A) 2 (duas) amostras de urina com valores abaixo da normalidade para iodo: primeira, nos tubos (S) = 1,4 µg/dL e (C) = 8,4 µg/dL; segunda, nos tubos (S) = 9,0 µg/dL e (C) = 13,0 µg/dL

dL). Na Figura 4, período (A) no tubo (C) conservante uma amostra de paciente apresentou a dosagem de creatinina urinária de 228 mg/dL, levemente acima do valor de normalidade para o sexo feminino (29-226 mg/dL), não representando significância. Após a liberação dos resultados, esses pacientes que apresentaram valores abaixo e acima da normalidade foram acompanhados para investigação clínica.

Com isso, esses achados vêm contribuir com a clínica-epidemiológica em dois pontos: a) as amostras armazenadas em tubos com e sem conservante, por não variarem as concentrações de iodo, mostraram que tanto um sistema de conservação quanto o outro poderá ser utilizado com igual segurança, possibilitando a escolha do sistema de menor custo; b) as concentrações de iodo urinário, por não apresentarem diferença significativa entre tubos com e sem conservantes independentes dos períodos de coleta (A) e (B), sugere-se que as concentrações de iodo possam ser coletas em diferentes períodos como uma amostra casual de urina, o que reitera os achados de Soldin, 2002³⁹.

REFERÊNCIAS

1. Abalovich M, Amino N, Barbour LA, Cobin RH, De Groot L, Glinoer D, et al. Management of thyroid dysfunction during pregnancy and postpartum: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(Suppl 8):S1-S47.
2. World Health Organization. Assessment of iodine deficiency: disorders and monitoring their elimination. A guide for programme managers. Genebra: WHO; 2008.
3. Duarte GC, Tomimori EK, de Camargo RY, Catarino RM, Ferreira JE, Knobel M, et al. Excessive iodine intake and ultrasonographic thyroid abnormalities in schoolchildren. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2009;22(4):327-34.
4. Duarte GC, Tomimori EK, Borioli RA, Ferreira JE, Catarino RM, Camargo RYA, et al. Avaliação ultrassonográfica da tireoide e determinação da iodúria em escolares de diferentes regiões do estado de São Paulo. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2004;48(6):842-8.
5. Hollowell JG, Staehling NW, Hannon WH, Flanders DW, Gunter EW, Maberly GF, et al. Iodine nutrition in the United States. Trends and public health implications: iodine excretion data from National Health and Nutrition Examination Surveys I and III (1971-1974 and 1988-1994). *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83:3401-8.
6. Benhaim Rochester D, Davies TF. Increased risk of Graves' disease after pregnancy. *Thyroid*. 2005;15:1287.
7. Maeda MYS, Santos RTM, Catarino RM, Ferreira JE, Minazzi-Rodrigues RS, Mello MRPA. Estudo da concentração de iodo na urina e no sal de cozinha na população do entorno do Polo Petroquímico de Capuava/Maúá-São Paulo. *Rev Bras Epidemiol*, número especial, versão eletrônica. set 2008.
8. Delange F, Benoist B, Pretell E, Dunn JT. Iodine deficiency in the world: Do we stand at the turn of the century? *Thyroid*. 2001;11(5):437-47.
9. Dunn JT. Iodine deficiency: the next target for elimination. *N Engl J Med*. 1992;326:267-8.
10. Smits G, Govaerts C, Nubourgh I, Pardo L, Vassart G, Costagliola S. Lysine 183 and glutamic acid 157 of the TSH receptor: two interacting residues with a key role in determining specificity toward TSH and human CG. *Molec Endocrinol*. 2002;16:722.
11. Pretell E, Delange F, Hostalek U, Corigliano S, Barreda L, Higa AM, et al. Iodine nutrition improves in Latin America. *Thyroid*. 2004;14(8):590-9.
12. International Council for the Control of Iodine Deficiency Disorders. Current IDD status database [acesso 2006 nov]. Disponível em: [http://www.icidd.org].
13. Dunn JT. Guarding our nation's thyroid health. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87:486-8.
14. Konno N, Makita H, Yuri K, Iizuka N, Kawasaki. Association between dietary iodine intake and prevalence of subclinical hypothyroidism in the coastal regions of Japan. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994;78:393-7.
15. Duarte GC, Tomimori EK, Borioli RA, Ferreira JE, Catarino RM, Camargo RYA, et al. Avaliação ultrassonográfica da tireoide e determinação da iodúria em escolares de diferentes regiões do estado de São Paulo. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2004;48(6):842-8.
16. Zimmermann MB, Ito Y, Hess SY, Fujieda K, Molinari L. High thyroid volume in children with excess dietary iodine intakes. *Am J Clin Nutr*. 2005;81:840-4.
17. Zimmermann MB. Iodine requirements and the risks and benefits of correcting iodine deficiency in populations. *J Trace Elem Med Biol*. 2008;22:81-92.
18. Burrow GN: Thyroid function and hyperfunction during gestation. *Endocr Rev*. 1993;14:194.
19. World Health Organization/International Council for the Control of the Iodine Deficiency Disorders/United Nations Children's Fund (WHO/ICCIDD/UNICEF). Assessment of the iodine deficiency disorders and monitoring their elimination. 2. ed. Genebra: WHO; 2007.
20. Pestalozzi MSC, Nussenzeig I, Bueno IDG, Barros RT, Bacci L, Machado MM. Índice proteína/creatinina em amostra isolada de urina para avaliação da proteinúria de 24 horas. *Rev Hosp Clin Fac Med Univ São Paulo*. 1989;44(2):58-62.
21. Bottini PV, Afaz SH, Silveira S, Garlipp CR. Utilização da relação albumina/creatinina no diagnóstico de microalbuminúria. *J Bras Patol Med Lab*. 2005;41(2):99-103.
22. Als C, Helbling A, Peter K, Haldimann M, Zimmerli B, Gerber H. Urinary iodine concentration follows a circadian rhythm: A study with 3,023 spot urine samples in adults and children. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85:1367-9.
23. Andersen S, Karmisholt J, Pedersen KM, Laurberg P. Reliability of studies of iodine intake and recommendations for number of samples in groups and in individuals. *Br J Nutr*. 2007;26:1-6.
24. World Health Organization. Recommended iodine levels in salt and guidelines for monitoring their adequacy and effectiveness. Fifth Report on World Nutrition. Genebra: WHO; mar 2004.

25. Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Comitê Brasileiro de Análises Clínicas e Diagnóstico *in vitro*. Laboratório clínico: requisitos e recomendações.
26. Jaffé, M. Über den Niederschlag, welchen Pikrinsäure in normalen Harn erzeugt und über eine neue Reaction des Kreatinins. *Z Phys Chem*. 1886;10:391-400.
27. ICCIDD: Iodine requirements in pregnancy and infancy. *IDD Newsletter*. 2007;23(1):1-2.
28. Sandell EB, Kolthoff IM. Micro determination of iodide by a catalytic method. *Mikrochim Acta*. 1937;1:9-25.
29. Pino S, Fang S-L, Braverman LE. Ammonium persulfate: A safe alternative oxidizing reagent for measuring urinary iodine. *Clin Chem*. 1996;42(2):239-43.
30. Borioli RA, Ferreira JE, Catarino RM. Importância da determinação de iodo urinário para Saúde Pública. *J Bras Patol*. 2002;38(3):82.
31. Ferreira JE, Catarino RM, Santos RTM. Comparison of the methodologies in tube and microplate for determination of urinary iodine. *Clin Chem Lab Med*. 2008;46(Suppl1):M118.
32. Freitas C, Grimaldi-Campos RA, Rodrigues-Silva MA, Panachão MRI, Moraes JC, Waissmann W, et al. Can living in the surroundings of a petrochemical complex be a risk factor for autoimmune thyroid disease?. *Env Res*. 2010;110(1):112-7.
33. Tonissi AP, Ferreira JE, Costa EAS, Catarino RM, Santos RTM. Estudo da validação do método de iodo urinário: resultados preliminares. *Bol Inst Adolfo Lutz*. 2007;17(1/2):1-100.
34. World Health Organization. Assessment of iodine deficiency: disorders and monitoring their elimination. A Guide for Programme Managers. Geneva: WHO; 2008.
35. Pardete LVH, Hardjowasito W, Gross R, Dillon DH, Totoprajogo OS, Yosoprawoto M. Urinary iodine excretion is the most appropriate outcome indicator for iodine deficiency at field conditions at district level. *J Nutr*. 1998;128(7):1122-6.
36. Dunn JT, Crutchfield HE, Gutekunst R, Dunn AD. Methods for measuring iodine in urine. Wageningen: International Council for Control of Iodine Deficiency Disorders; 1993.
37. Knudsen N, Christiansen E, Brandt-Christiansen M, Nygaard B, Perrild H. Age- and sex- adjusted iodine/creatinine ratio. A new standart in epidemiological surveys? Evaluation of three different estimates of iodine excretion based on casual urine samples and comparison to 24 h values. *Eur J Clin Nutr*. 2000;54:361-3.
38. Busnardo B, Nacamulli D, Zambonin L, Mian C, Piccolo M, Girelli ME. Restricted intraindividual urinary iodine concentration variability in nonfasting subjects. *Eur J Clin Nutr*. 2006;60(3):421-5.
39. Soldin OP. Controversies in urinary iodine determinations. *Clin Biochem*. 2002;35:575-79.

Temporalidade de amostras biológicas e de produtos no Instituto Adolfo Lutz

Temporality of biological samples and products at the Instituto Adolfo Lutz

RIALA6 1481

Luz Marina TRUJILLO*, Márcia Jorge CASTEJÓN, Luzia Setuko Umeda YAMAMOTO, Marilena OSHIRO, Lia Teixeira BASTOS, Maria de Fátima Henriques CARVALHO, Patrícia de Lima Vicente COLETA, Marisa Lima CARVALHO

*Endereço para correspondência: Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes, Instituto Adolfo Lutz, Avenida Dr. Arnaldo 355, Cerqueira César, São Paulo, SP, CEP: 01246 000. E-mail: ltrujillo@ial.sp.gov.br

Recebido: 13.12.2011 - Aceito para publicação: 16.05.2012

RESUMO

O Instituto Adolfo Lutz (IAL), instituição centenária na prestação de serviços, pesquisa e ensino para a solução de agravos em saúde, tem constituído um valioso repositório de materiais biológicos empregados em projetos científicos e de inovação tecnológica, bem como lhe cabe a guarda de produtos de análise fiscal ou pericial. Por iniciativa da administração central, criou-se um grupo técnico para elaborar critérios de temporalidade das amostras biológicas e dos produtos armazenados frente à legislação e às necessidades deste repositório institucional. Foram definidos os diversos tipos de amostras e, para cada modalidade, foram relacionados o estado físico, a finalidade – rotina ou pesquisa –, e as condições de armazenamento. Formulários específicos referentes às amostras ou produtos foram preenchidos pelos profissionais das diferentes áreas dos Laboratórios Central e Regionais. Os critérios de temporalidade das amostras biológicas e produtos foram propostos e apresentados ao conselho técnico e administrativo da instituição, o que resultou em publicação oficial em forma de Portaria da Diretoria Geral do IAL.

Palavras-chave. temporalidade, material biológico, produto para análise, armazenamento.

ABSTRACT

Instituto Adolfo Lutz (IAL) is centenary institution for conducting the public health utility, education and research aiming at solving health injuries. The IAL has constituted a valuable repository of biological materials used in the scientific projects and in the technology innovation, as well as to the safekeeping of products on which the fiscal analyses and control have been performed. On the initiative of the head administration, a technical group has been created to develop criteria of temporality of biological samples and products, both stored in accordance with pertinent legislations and the needs of this institutional repository. The samples types and characteristics were defined, and each one was related to the physical state, the use (routine or research purpose), and the storage conditions. The forms on the specific samples or products information have been completed by the responsible professionals from different areas of Central and Regional Laboratories. The criteria of temporality of biological samples and products were proposed and they were submitted to the administrative board and technical council, which resulted in the official publication as an Ordinance of the IAL General Director.

Palavras-chave. temporality, biological material, product for analysis, storage.

INTRODUÇÃO

Em 1940, os Institutos de Análises Químicas e Bacteriológico, dois grandes laboratórios públicos na cidade de São Paulo, se uniram e, como homenagem ao grande cientista que dirigira o Instituto Bacteriológico desde as primeiras décadas de seu funcionamento, o estabelecimento passou a ser denominado Instituto Adolfo Lutz (IAL)¹.

O IAL, vinculado à Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo e integrado à Coordenadoria de Controle de Doenças, é constituído por um Laboratório Central com 10 Centros Técnicos e doze Laboratórios Regionais, que atuam nas áreas de Biologia Médica, Patologia, Bromatologia e Química. Atualmente, o IAL é considerado o maior Laboratório de Saúde Pública da América Latina e executa atividades especializadas e diferenciadas, gerando informações relevantes à saúde pública e ao conhecimento científico.

O Laboratório de Saúde Pública tem papel fundamental nos estudos e soluções de diversos problemas importantes de saúde, fornecendo informações precisas e fidedignas à assistência médico-sanitária para que medidas adequadas possam ser adotadas².

Ao longo de sua existência, o IAL tem constituído um valioso repositório de amostras biológicas, o qual tem contribuído para o progresso da ciência e da inovação tecnológica. Pode-se citar o acervo da coleção de culturas de microrganismos que atualmente está sendo estruturada de acordo com as normas dos centros de recursos biológicos para fins de pesquisa e prestação de serviço. Desde 2001, em vários países estão sendo criados centros de recursos biológicos para garantir a origem, qualidade e segurança no armazenamento dessas coleções. Recentemente, no Brasil, o Ministério de Ciência e Tecnologia iniciou o programa para uniformizar as informações e definir os critérios para avaliar e certificar o material biológico presente nas coleções, de acordo com as normas internacionais³. Esses recursos biológicos servem para a manutenção de ecossistemas como componentes fundamentais na cadeia produtiva de alimentos e fármacos, saneamento ambiental para a biorremediação de resíduos tóxicos e, na agricultura, para a fixação biológica do nitrogênio⁴.

As coleções de material biológico também podem contribuir para o estudo da história natural de doenças e para a identificação de patógenos em investigações epidemiológicas de surtos. A disponibilidade desse

material armazenado possibilita a realização de estudos retrospectivos de grande relevância científica e social⁵. Citando como exemplo, em 1959, foram coletadas amostras de sangue de indivíduos no Congo para realizar estudos genéticos de etnias africanas, e uma dessas amostras permaneceu armazenada congelada nos Estados Unidos. Após a descoberta do Vírus da Imunodeficiência Humana (Human Immunodeficiency Virus – HIV), no início da década de 1980, esse sangue estocado foi testado e foi evidenciada a circulação do HIV naquela época, assim como a constatação da viabilidade do vírus por 26 anos, em baixa temperatura. Pode-se, também, atestar a circulação de HIV no mesmo país em amostras de sangue coletadas durante a primeira epidemia do vírus ebola em 1976, quando algumas dessas amostras guardadas foram testadas em 1980⁶.

Neste contexto, a manutenção de amostras biológicas conservadas em temperaturas adequadas e organizadas para estudo posterior é extraordinariamente útil na avaliação da transmissibilidade de diversos agentes patogênicos e na determinação da prevalência de novos agentes, como exemplo institucional os vírus Rocio e vírus Sabia, dois vírus emergentes nunca antes detectados. As precauções em relação às condições apropriadas de preparo e armazenamento desses espécimes devem ser tomadas para que favoreçam a sua estabilidade, com a finalidade de obter resultados precisos e confiáveis⁷. Em consenso internacional, estabeleceu-se que a prática de armazenamento de materiais biológicos deveria ser normatizada, considerando as necessidades de desenvolvimento científico e tecnológico, a adequação bioética da utilização desses materiais e o respeito aos Direitos Humanos dos indivíduos envolvidos⁸.

A quantidade de pesquisas desenvolvidas na área da saúde tem aumentado nos últimos dez anos. Muitas instituições têm mantido extensos biobancos ao longo desses anos para fins de pesquisa, mas há dúvidas quanto às circunstâncias adequadas que permitem o uso dessas amostras para investigação⁹.

O IAL também atua na área de vigilância sanitária e, por isso, possui armazenados produtos como alimentos, bebidas, medicamentos, cosméticos e saneantes. Diferentemente dos objetivos de guarda da área médica, o propósito desta guarda é justificada para análise pericial, judicial ou para análise de contraprova prevista na legislação sanitária¹⁰.

O tempo de armazenamento desses produtos sempre foi ditado pela validade do produto, a qual

é estabelecida pelo fabricante¹¹. Para produtos não industrializados, como os alimentos *in natura*, a guarda é estabelecida pelo tempo de manutenção das características higiênico-sanitárias em condições ambientais. Muitos produtos também são mantidos após a análise para servirem de matrizes no estudo de validação analítica e pesquisa.

O armazenamento adequado é necessário para qualquer amostra biológica ou produto, mas, para a área de ensaios químicos, principalmente em casos de determinação de analitos instáveis ou em baixas concentrações, como os pesticidas e elementos inorgânicos (metais), devem ser aplicados procedimentos para evitar a perda desses elementos¹².

O estudo para elaborar critérios de temporalidade de amostras biológicas e produtos armazenados no IAL teve como objetivos adequar a área física da instituição, promover o uso racional de recursos financeiros e conhecer as condições de armazenamento das diferentes amostras biológicas e produtos armazenados para fins de pesquisa ou rotina. Esse conhecimento é de grande relevância para a inovação em tecnologia para fins de diagnóstico e para ponderar sobre os aspectos éticos em pesquisa com seres humanos.

METODOLOGIA

A criação do grupo de trabalho para elaboração dos critérios de temporalidade das amostras biológicas e produtos armazenados no IAL, frente à legislação e às necessidades do repositório institucional ocorreu por meio de publicação das Portarias do Diretor Geral, de 4.11.2008 e 27.1.2009¹³.

Para a estruturação deste estudo, levou-se em consideração a realidade organizacional do IAL de acordo com o Decreto Estadual s/nº, de 28 de abril de 1970, sendo os laboratórios distribuídos em Divisões Técnicas – Serviços Básicos, Patologia, Biologia Médica, Bromatologia e Química e Laboratórios Regionais. A partir de 2010, o IAL foi reorganizado de acordo com o Decreto Estadual nº 55.601, de 22 de março de 2010, em centros e núcleos, porém a nova estrutura não alterou a concepção do trabalho, uma vez que os ensaios não sofreram mudança de responsabilidade técnica.

A primeira etapa do trabalho consistiu da pesquisa bibliográfica em busca de informação que pudesse oferecer subsídios para a elaboração dos critérios de temporalidade de amostras biológicas e produtos no IAL.

Os princípios éticos para a pesquisa envolvendo seres humanos, experimentação e uso de animais foram seguidos de acordo com as normas vigentes de ética em pesquisa – Resolução CNS 196, de 10 de outubro de 1996; Resolução CNS 347, de 13 de janeiro de 2005, hoje revogada e substituída pela Resolução CNS 441 de 2011¹⁴; e Decreto nº 6899, de 15 de julho de 2009. Para as amostras biológicas e produtos analisados na rotina, baseou-se na legislação vigente.

Na elaboração do formulário utilizado para o levantamento das amostras biológicas e produtos armazenados, o ponto central foi a amostra, por considerar a grande diversidade de matrizes de ensaios na instituição. Neste contexto, delineou-se o tipo de amostra com o seu estado físico, a finalidade de pesquisa ou rotina e as condições de armazenamento antes, durante e após análise. Para as condições de armazenamento das amostras e produtos, foram identificados – local, temperatura, tempo, tipo de invólucro primário e capacidade de armazenamento, número de unidades e legislação própria estabelecida.

Antes da aplicação desse formulário, o grupo realizou treinamentos com os profissionais das diferentes áreas da instituição para o preenchimento desse documento. Para a análise dos dados obtidos nos formulários, foi desenvolvido o banco eletrônico a partir da linguagem PHP usando como Banco de Dados O MySQL.

RESULTADOS

A elaboração dos critérios de temporalidade teve como base as legislações vigentes e as informações e observações obtidas nos formulários preenchidos pelos profissionais dos laboratórios porque nada similar foi encontrado publicado.

Participaram dos treinamentos realizados para a padronização do preenchimento do formulário 40 laboratórios das diferentes áreas do IAL. Foram utilizados 284 formulários para alimentar o banco de dados eletrônico da Instituição.

As Tabelas 1 e 2 apresentam os critérios estabelecidos para a temporalidade das amostras biológicas e dos produtos utilizados na rotina laboratorial do IAL, elaborados pelo grupo de trabalho, aprovados pela alta administração e publicados pela Portaria da Diretoria Geral do IAL de 2010¹⁵.

Os critérios de temporalidade das amostras biológicas de humanos e animais com finalidade de

Tabela 1. Prazos de temporalidade das amostras biológicas para rotina diagnóstica, no Instituto Adolfo Lutz

Material biológico	Prazo de armazenamento
Sangue, soro e plasma	Seis meses após a emissão do laudo
Líquor, lavado, líquido cavitário e fezes conservadas em meio adequado	30 dias
Urina, fezes, escarro e secreção	Dois dias após a emissão do laudo
Lâminas de bacterioscopia e bacilosscopia	Três meses
Secreção e líquido cavitário para exame de Papanicolaou	Sete dias após a emissão do laudo
Fragmento de tecido não emblocado, bloco de parafina e lâmina de citologia negativa	Até 10 anos após a emissão do laudo
Lâmina de citologia positiva	Guarda permanente*
Lâmina de histopatologia negativa e positiva	Guarda permanente*
Isolado de parasita, fungo, bactéria e de vírus	Seis meses**
Material genético de patógenos	Seis meses**

*Conforme preconizado pelo Manual do Ministério da Saúde.

**A guarda destes isolados deverá seguir a política/regimento da Coleção de Microrganismos do IAL

Tabela 2. Prazo de temporalidade das amostras de produtos da rotina conforme o tipo de análise realizada no Instituto Adolfo Lutz

Análise fiscal ou análise de controle		Prazo de armazenamento
Conclusão		
1ª análise (para análise)	Satisfatória	30 dias após a emissão do laudo
	Insatisfatória	Seis meses após a emissão do laudo ou até o vencimento da validade do produto
2ª análise (testemunho)	Satisfatória na primeira amostra	30 dias após a emissão do laudo
	Insatisfatória na primeira amostra	Seis meses após a emissão do laudo ou até o vencimento da validade do produto
Análise prévia		
Análise	Satisfatória	30 dias após a emissão do laudo
	Insatisfatória	30 dias após a emissão do laudo
Análise de orientação		
Análise	Satisfatória	30 dias após a emissão do laudo
	Insatisfatória	30 dias após a emissão do laudo
Análise de perícia judicial		Três meses após a emissão do laudo
Análise para instruir inquérito		Até a entrega do laudo
Produto perecível para toda e qualquer análise		Validade ou estabilidade em condições ambientais.

pesquisa foram estabelecidos de acordo com as diretrizes éticas brasileiras – até cinco anos após o término da pesquisa. Em caso de a viabilidade da amostra esgotar-se antes de cinco anos, o material deverá ser descartado segundo as normas de biossegurança para risco biológico.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O estudo foi fundamental para identificar os repositórios de materiais biológicos existentes na Instituição em funcionamento de forma não centralizada. Atualmente, com os avanços tecnológicos ocorridos, há necessidade do armazenamento de amostras biológicas para o desenvolvimento de pesquisas. A identificação, o acondicionamento e o monitoramento dessas amostras devem ser de forma segura e padronizada. O controle de

qualidade, desde o momento da coleta até a utilização da amostra, é importantíssimo para a obtenção de resultados confiáveis quando da utilização dessas amostras em estudos prospectivos.

Várias ações têm sido voltadas para o estabelecimento de padrões técnicos, éticos e legais para o armazenamento e a utilização de material biológico humano com finalidade científica. A criação de biobancos é um procedimento há muito tempo adotado por vários países em estudos epidemiológicos. Outro aspecto favorável para a criação de um Biobanco em nossa instituição é a possibilidade de compartilhamento de amostras entre as diferentes linhas de pesquisa.

A publicação dos critérios de temporalidade no IAL, além de propiciar a racionalização do espaço físico e orçamentário, promoverá o respaldo legal para a guarda

ou não dessas amostras biológicas e produtos. Esse modelo poderá servir para a criação de normas gerais e únicas instituídas por órgãos competentes, para uma abrangência estadual. Igualmente, o trabalho apresenta originalidade, posto que não haja citações sobre estudos similares.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Marta Lopes Salomão, pela idealização do trabalho. À Dra. Julia Maria Martins de Souza Felipe, pelo apoio e revisão. Aos servidores e colaboradores do IAL, pela contribuição na realização do trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Antunes JLE, Nascimento CB, Nassi LC, Pregnotatto NP, organizadores. Instituto Adolfo Lutz. 100 Anos do Laboratório de Saúde Pública. São Paulo: Letras & Letras; 1992.
2. Carvalho J PP. A organização dos laboratórios estaduais de saúde pública do Brasil. *Rev Saúde Pub*. 1976;10:345-53.
3. Canhos VP, Sette LD, Cupolilli E, Tigano MS, Vazoller RF. O papel da Sociedade Brasileira de Microbiologia no suporte à consolidação da Rede Brasileira de Coleções de Culturas de Microrganismos. *Microbiol in foco*, Sociedade Brasileira de Microbiologia. out- dez 2007;40-55.
4. Andrade TS, Bastos LT, Scola MCG, Felipe, JMMS. Seção de Coleção de Culturas do Instituto Adolfo Lutz – 68 Anos de História. *BEPA*. 2008;5(59):10-5.
5. Gaze R, Carvalho DM, Yoshida CFT, Tura LFR. Reflexões éticas acerca dos estudos de soroprevalência de hepatites virais. *Rev Assoc Med Bras*. 2006;52(3):162-9.
6. Ujvari SC. A história da humanidade contada pelos vírus. São Paulo: Contexto; 2008.
7. World Health Organization (WHO). Guidelines for using HIV testing technologies in surveillance. UNAIDS. 01.22E, 2001.
8. Biobanco do Hospital de Clínicas de Porto Alegre: aspectos técnicos, éticos, jurídicos e sociais. *Rev* 76. 2009;29(1):74-9.
9. Gibson E, Brazil K, Caughlin MD, Emerson C, Fournier F, Schwartz L et al. Who's minding the shop? The role of Canadian research ethics boards in the creation and uses of registries and biobanks. *BMC Med Ethics*. 2008;9:17 [acesso 2011 jun 12]. Disponível em: [http://www.biomedcentral.com/1472-6939/9/17]
10. Brasil. Lei nº 6.437. de 20 de agosto de 1977. Configura infrações à legislação sanitária federal, estabelece as sanções respectivas, e dá outras providências. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília. DF, 24 ago 1977.
11. Brasil. Decreto nº 79.094, de 5 de janeiro de 1977. Regulamenta a Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976, que submete a sistema de vigilância sanitária os medicamentos, insumos farmacêuticos, drogas, correlatos, cosméticos, produtos de higiene, saneamento e outros. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 7 jan 1977.
12. American Public Health Association. Standard Methods for examination of water and wastewater. 20. ed. Washington, DC: APHA; 1998.
13. São Paulo (Estado). Portaria do Diretor Geral do Instituto Adolfo Lutz, de 4 de novembro de 2008, da Coordenadoria de Controle de Doenças. *Diário Oficial [do] Estado*. São Paulo; 5 nov 2008. Seção 1, 23.
14. Brasil. Conselho Nacional de Saúde (CNS). Resolução nº 441, de 12 de maio de 2011. Dispõe sobre armazenamento e a utilização de material biológico humano no âmbito da pesquisa.
15. São Paulo (Estado). Portaria do Diretor Geral do Instituto Adolfo Lutz DG/IAL -16, de 22 de dezembro de 2010, da Coordenadoria de Controle de Doenças. *Diário Oficial [do] Estado*. São Paulo; 23 dez 2010. Seção 1, 101.

Avaliação da rotulagem de alguns vinhos brasileiros

Evaluation of the quality of labels on some of the Brazilian wines samples

RIALA6/1482

Elaine Marra de Azevedo MAZON*¹, Caroline de Almeida ROSSI¹, Marcelo Alexandre PRADO², Solange CADORE³

*Endereço para correspondência: 1Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas, Centro de Laboratório Regional – Instituto Adolfo Lutz de Campinas III. Rua São Carlos, n. 720, Vila Industrial, CEP: 13035-420. Campinas, SP, Brasil. Tel.: (19) 3272-7977. E-mail: emamazon@ial.sp.gov.br

²Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil

³Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil

Recebido: 06.03.2012- Aceito para publicação: 13.06.2012

RESUMO

As informações contidas no rótulo são essenciais para a escolha do produto pelo consumidor. Neste trabalho, foi avaliada a rotulagem de 39 vinhos nacionais quanto à conformidade com as legislações vigentes. Nesta análise, foram considerados os seguintes dizeres: nome do produtor/elaborador, endereço do estabelecimento, número de registro no Ministério da Agricultura, nome do produto e marca comercial, a expressão “indústria brasileira”, o conteúdo líquido, os aditivos empregados, a graduação alcoólica, a descrição dos ingredientes, a identificação do lote, o prazo de validade, a frase de advertência “evite o consumo excessivo de álcool” e a declaração de presença ou não de glúten. Em relação à legislação específica para vinhos, todas as amostras estavam em conformidade. No entanto, ao considerar a legislação para bebidas em geral, 28% das amostras foram não conformes pela falta de identificação do lote ou por estar ilegível. Quanto à declaração de conter glúten ou não, 2,5% dos produtos estavam em desacordo. Neste contexto, pode-se inferir que há necessidade de harmonizar os descritivos nos rótulos com as informações obrigatórias exigidas pelas legislações existentes, a fim de melhorar o esclarecimento ao consumidor e o controle por meio de rastreamento.

Palavras-chave. vinhos brasileiros, rotulagem, legislação.

ABSTRACT

The information on the label is essential for the product choosing by the consumer. Thirty-nine labels on the national wines were evaluated following the legislations in force. For this purpose, the following products details were investigated: the producer name, the establishment address, the registration number at the Ministry of Agriculture, the product name and respective trademark, the “Brazilian Industry” statement, the liquid contents, the used additives, the alcoholic contents, the ingredients description, the lot identification, the expiration date, the “immoderate alcohol drinking restriction” warning words, and the gluten-free or gluten-added remark. According to the legislation for general drinks, 28% of samples showed noncompliant labels because of unreadable lot identification or lack of this information; and noncompliance in information on “contains gluten or not” was found in 2.5% samples. In this context, it may be inferred to bring into agreement the characteristics on products labels with the required labeling information based on the current legislations, in order to make them better understandable to consumers.

Keywords. Brazilian wine, labeling, legislation.

INTRODUÇÃO

A vitivinicultura brasileira tem apresentado crescimento significativo nos últimos anos, decorrente da vigorosa expansão da área cultivada e da tecnologia de produção de uvas e de elaboração de vinhos. Merece destaque a difusão da produção de uvas e vinhos, além de outros derivados, para regiões emergentes em diversas regiões do Brasil, desde a metade sul do Rio Grande do Sul até a região Nordeste, passando por polos de importância crescente nos Estados de Santa Catarina, Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso e Goiás¹.

Na última década, o consumo de vinhos no Brasil aumentou cerca de 20% e sua comercialização vem se difundindo principalmente pelo aumento da oferta, da produção e pelos benefícios à saúde que lhe são atribuídos.

O vinho é a bebida alcoólica mais antiga e tradicional produzida e consumida pela humanidade. É definida por legislação como a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto simples de uva sã, fresca e madura. Essa denominação é privativa deste produto, sendo vedada a sua utilização para produtos obtidos de quaisquer outras matérias primas². A produção de vinhos no Brasil se divide em vinhos finos produzidos por uvas de origem *Vitis vinifera* e de vinhos comuns produzidos por uvas americanas ou híbridas. O consumo de vinhos comuns corresponde a 80% da produção³.

Quanto à elaboração, os vinhos podem ser classificados como vinho branco, tinto, rose e espumantes. Os vinhos brancos são geralmente elaborados a partir de uvas brancas, mas também podem ser produzidas com uvas rosadas e tintas. Para isso, é necessário separar imediatamente a fase líquida da sólida, que contém os pigmentos responsáveis pela cor.

O vinho tinto é elaborado a partir de uvas tinta, pois é da película que, durante a maceração, são extraídas as antocianinas e os taninos. Estes compostos fenólicos conferem ao vinho cor, estrutura, corpo e originalidade.

O vinho rose propriamente dito é elaborado a partir de uva tinta, porém, alguns produtores utilizam-se da mistura de uvas tinta e branca, ou ainda do corte (*assemblages*) de vinhos tinto e branco após serem elaborados separadamente.

Para as espumantes, existem três principais processos de elaboração, a saber: o método Champenoise, também chamado de tradicional ou clássico, em que a fermentação ocorre na garrafa; o método Charmat,

caracterizado por uma segunda fermentação a ser realizada em tanques de inox, ao invés de na própria garrafa; o método Asti, que surgiu na Itália e que, no Brasil, começa a ser denominado de moscatel espumante. Este produto, ao contrário de outros espumantes elaborados com duas fermentações, é submetido a uma fermentação parcial⁴.

A rotulagem é o processo por meio do qual se estabelece uma linha de comunicação entre as empresas produtoras de alimentos e os consumidores. É uma forma legal, que assegura a defesa e a proteção ao consumidor e apresenta todas as informações necessárias para que esse consumidor saiba o que está adquirindo, além de fornecer todas as bases necessárias para que os órgãos competentes realizem seu trabalho de fiscalização⁵.

Rótulo é toda inscrição, legenda, imagem ou toda matéria descritiva ou gráfica que esteja escrita, impressa, estampada, gravada, gravada em relevo ou litografada ou colocada sobre a embalagem do alimento⁶. É um dos fatores que pode influenciar na escolha do consumidor ao adquirir um produto ou outro. Por essa razão, é necessário que os rótulos atendam a determinadas exigências legais, devendo, dessa maneira, fornecer informações úteis e confiáveis sobre o produto para garantir segurança e qualidade ao consumidor⁷.

Para assegurar a declaração de informações básicas no rótulo de vinhos, há algumas legislações em vigor. No âmbito da indústria de bebidas em geral, vigora a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994⁸, regulamentada pelo Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009⁹. Em relação a determinações específicas de vinhos e derivados, está em vigor a Lei nº 7.678, de 8 de novembro de 1988¹⁰, regulamentada pelo Decreto nº 99.066, sendo que alguns dispositivos desta foram alterados pela Lei nº 10.970, de 12 de novembro de 2004¹¹.

Outra legislação que também deve ser considerada é a Lei nº 10.674, de 16 de maio de 2003¹², que obriga a informação de presença ou não de glúten no alimento e o Regulamento Técnico RDC nº 259, de 20 de setembro de 2002¹³, que se aplica à rotulagem de alimentos comercializados, qualquer que seja a sua origem, embalado na ausência do cliente e pronto para o consumo. Esta última foi aplicada de maneira complementar, no presente trabalho, uma vez que o vinho possui legislação específica tanto para seus padrões de qualidade, identidade e comercialização, quanto para a rotulagem.

No Brasil, as informações fornecidas por meio da rotulagem contemplam um direito assegurado pelo

Código de Defesa do Consumidor que, em seu artigo 6º, determina que a informação sobre produtos e serviços deva ser clara e adequada e “com especificação correta de quantidade, características, composição, qualidade e preço, bem como sobre os riscos que apresentem”⁵.

Embora exista legislação, pouco se sabe sobre a situação da rotulagem dos vinhos vendidos no Brasil. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a rotulagem de vinhos finos, de mesa e espumantes nacionais, comercializados na região de Campinas, segundo as legislações vigentes.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados 39 rótulos de vinhos nacionais adquiridos no comércio de Campinas (SP) no período de maio a dezembro de 2011. Deste total, 19 (48,7%) eram referentes a vinhos finos; 13 (33,3%), a vinhos de mesa; e 7 (18%), a espumantes. Quanto à região de produção, 21 (53,9%) eram do Rio Grande do Sul; 7 (17,9%), de São Paulo; 5 (12,9%), de Minas Gerais; 3 (7,7%), do Pernambuco; 2 (5,1%) da Bahia; e 1 (2,5%), do Paraná.

Os rótulos foram avaliados quanto a sua declaração, utilizando um *check-list* baseado nos parâmetros obrigatórios exigidos nas legislações vigentes. Segundo a legislação específica para vinhos, os parâmetros avaliados foram: nome do produtor/elaborador, endereço do estabelecimento, número de registro no Ministério da Agricultura, nome do produto e sua marca comercial, a expressão “indústria brasileira”, o conteúdo líquido, os aditivos empregados e a graduação alcoólica.

Além dos itens citados acima, a legislação para bebidas ainda exige a declaração dos ingredientes, a identificação do lote, o prazo de validade e frase de advertência relacionada ao consumo de bebida alcoólica. Outro item avaliado foi a declaração de presença ou não de glúten, obrigatória pela Lei nº 10.674, de 16 de maio de 2003, como medida preventiva e de controle da doença celíaca.

O Regulamento RDC nº 259, de 20 de setembro de 2002, foi aplicado de maneira complementar, quanto aos parâmetros de denominação de venda, lista de ingredientes, conteúdo líquido, identificação de origem, razão social/nome, lote e validade, embora esta última não seja considerada obrigatória para vinhos. De acordo com este regulamento, ainda é previsto a visibilidade correta das informações.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação à legislação para vinhos, 100% das amostras estavam de acordo com as especificações exigidas. Já em relação à legislação para bebidas, das 39 amostras analisadas, 9 (23%) foram consideradas em desacordo por não apresentarem a identificação do lote e 2 (5,1%), por apresentarem tal informação ilegível (Figura 1). Do total das 11 amostras condenadas, 45,4% referiam-se a vinhos de mesa, 27,3% a vinhos finos e 27,3% a vinhos espumantes.

Para o consumidor e os órgãos de fiscalização, o lote é um importante instrumento para individualizar produtos com eventuais problemas ou características especiais, permitindo a rastreabilidade de processos, matérias-primas e safras¹⁴.

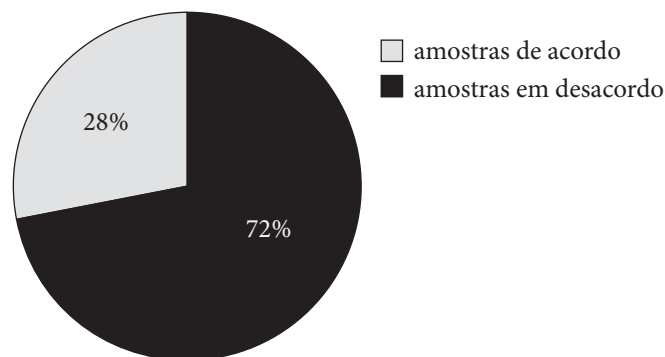


Figura 1. Percentual de rotulagem de vinhos em conformidade, segundo a Lei nº 8.918/94

Os rótulos foram avaliados também quanto a sua clareza e disposição das informações. Em 3 (8%) amostras, a descrição não era de fácil leitura por haver pouco contraste entre as cores da letra e do fundo ou por ser utilizada letra muito estreita e muito próximas uma das outras.

A denominação de venda ou designação do produto é um dos itens mais importantes da rotulagem, pois informa a respeito da natureza do produto, definindo a classe, a cor e o conteúdo de açúcar¹⁴.

Para atender a legislação brasileira, os rótulos de vinho tornaram-se carregados de informações diante da grande quantidade de dizeres obrigatórios exigidos. Para solucionar tal questão, a rotulagem passou a ser distribuída em painel principal e contra-rótulo, buscando manter a apresentação das informações, de forma elegante e estética¹⁴.

Quanto ao uso da expressão “contém ou não contém glúten”, embora o vinho seja um produto que não apresente risco para o consumidor celíaco, o seu uso é obrigatório para facilitar a identificação de tal conteúdo pela população de risco. Dentre todos os rótulos avaliados, 1 (2,5%) não apresentou tal informação.

O principal ingrediente do vinho é a uva, fazendo parte também da sua composição, conforme o caso, os aditivos e os açúcares utilizados para adoçar os vinhos suaves. Os aditivos permitidos são dióxido de enxofre (INS 220), utilizado como conservante e antioxidante, e o sorbato de potássio (INS 202), utilizado como antifementativo em vinhos adocicados.

Embora atendendo as exigências para os rótulos, 5 (13%) amostras foram consideradas em desacordo, por apresentar a expressão “produto natural”, embora apresentassem aditivos entre seus ingredientes. Tal expressão pode, portanto, levar o consumidor ao equívoco ou erro, infringindo a Resolução RDC nº 259 e Leis nº 8.918 e nº 7.678.

Os Conselhos de Classe Profissional estão requerendo a inclusão de identificação do responsável técnico pelo produto para que este possa ser interpelado em caso de alguma inconformidade do produto¹⁴. Tal informação estava presente na maioria dos rótulos (74%).

O vinho, por se tratar de uma bebida alcoólica, é obrigado, por legislação (Lei nº 9.294, de 2 de julho de 1996)¹⁵, a trazer em sua rotulagem a frase de advertência “evite o consumo excessivo de álcool”. Tal frase foi observada em 44,5% das amostras. Nas demais, foram observadas frases semelhantes, como: “beber com moderação” (44,5%) e “aprecie com moderação” (11%).

A legislação específica para bebidas exige a informação referente à sua validade. As vinícolas utilizam, para os vinhos em embalagens de vidro, a expressão “validade indeterminada”. Tal informação é dada desta maneira, já que a alteração das propriedades pode variar de vinho para vinho e pela maneira com que são armazenados. Visando prolongar a manutenção de tais características, algumas vinícolas indicam no rótulo as condições ideais de armazenamento, como mantê-los em local seco, fresco, ao abrigo de luz e em posição horizontal. Dessa maneira, fica a cargo do consumidor avaliar o período máximo de armazenamento, evitando assim a perda do produto¹⁴.

Alguns parâmetros independentes da legislação de rotulagem são importantes para escolha de um vinho fino pelo consumidor. Nem todos os rótulos apresentam

a mesma qualidade de informação e complexidade. Algumas informações básicas são necessárias, como: nome do vinho que se refere ao nome comercial ou de “batismo”; nome da uva que deve ser declarado somente quando se utiliza no mínimo 70% da variedade indicada; ano da safra, que indica o ano da colheita da uva e que não necessariamente coincide com o ano do engarrafamento do vinho; o grau alcoólico e o volume, que devem necessariamente estar expostos no rótulo; e nome da região de origem, que nem sempre está presente, mas pode ser importante, pois a sua procedência indica, na maioria das vezes, sua qualidade e essa tendência vem sendo fortemente trabalhada no Brasil.

CONCLUSÃO

Mediante ao que foi discutido, conclui-se que a legislação específica para vinhos não exige itens considerados importantes na rotulagem como lote, prazo de validade e frase de advertência, o que evidencia a necessidade de uma complementação com outras legislações, principalmente com o regulamento técnico RDC nº 259, de 20 de setembro de 2002, que se aplica à rotulagem de alimentos comercializados, qualquer que seja a sua origem, embalado na ausência do cliente e pronto para o consumo, abrangendo itens importantes para o controle da rotulagem. O rótulo, com todas as informações obrigatórias e relevantes sobre o produto, é um instrumento essencial para a escolha dos produtos mais adequados pelo consumidor. No entanto, para assegurar que os dizerem obrigatórios estejam contidos nos rótulos, é preciso haver a prática da fiscalização contínua e efetiva pelos órgãos responsáveis.

REFERÊNCIA

1. Guerra CC, Mandelli F, Tornietto J, Zanús MC, Camargo UA. Conhecendo o essencial sobre uvas e vinho. 2. ed. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho; 2009.
2. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Lei nº 7.678, de 8 de novembro de 1988. Dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva de do vinho, e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 9 nov 1988. Seção 1, nº 213, p. 21.
3. Guerra CC. Influência de parâmetros enológicos da maceração na vinificação em tinto sobre a evolução da cor e a qualidade do vinho. Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia – Influência da Tecnologia Vitícola e Vinícola na Cor dos Vinhos; 2003; Bento Gonçalves. Anais do Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia.
4. Miolo. Manual do vinho. Bento Gonçalves: Miolo; 1999.

5. Brasil. Ministério da Justiça. Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1990. Dispõe sobre a proteção do consumidor e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 12 set 1990, Suplemento nº 176.
6. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 22, de 24 de novembro de 2005. Aprova o regulamento técnico para rotulagem de produto de origem animal embalado. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 25 nov 2005. Seção 1, nº 226, p. 15.
7. Teixeira AM, Pinto EP, Jantzen MM, Ferri VC. Legislação e rotulagem de vinhos finos tintos comercializados na cidade de Pelotas – RS. *Rev Bras Agrociênc*. 2007;13(1):119-21.
8. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994. Dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas, autoriza a criação da Comissão Intersectorial de Bebidas e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 15 jul 1994. Seção 1, nº 134; p. 10; 661
9. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009. Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 5 jun 2009. Seção 1, nº 105, p. 20.
10. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Lei nº 7.678, de 8 de novembro de 1988. Dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados do vinho e da uva. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 9 nov 1988. Seção 1, nº 213, p. 21, 561.
11. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Lei nº 10.970, de 12 de novembro de 2004. Altera dispositivos da Lei nº 7.678, de 8 de novembro de 1988, que dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva de do vinho, e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 16 nov. 2004. Seção 1; nº 219; p. 1.
12. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Lei nº 10.674, de 16 de maio de 2003. Obriga a que os produtos alimentícios comercializados informem sobre a presença de glúten, como medida preventiva e de controle da doença celíaca. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 19 mai. 2003. Seção 1; nº 94; p. 1.
13. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Resolução RDC nº 259, de 20 de setembro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico para rotulagem de alimentos embalados. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 23 set. 2002. Seção 1; nº 184; p.33.
14. Marzarotto V. Como ler um rótulo. *Rev Adeg* [revista na internet]. 2006. 16ª ed. Seção Enotécnico. [acesso em 2012 jan 5]. Disponível em: [<http://revistaadega.uol.com.br/Edicoes/16/artigo41382-1.asp>].
15. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Lei nº 9.294, de 2 de julho de 1996. Dispõe sobre as restrições ao uso e à propaganda de produtos fumigantes, bebidas alcoólicas, medicamentos, terapias e defensivos agrícolas, nos termos do § 4º do art. 220 da Constituição Federal. Realterada pela Lei nº 10.702, de 14 de julho de 2003. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 15 jul 2003.

Propriedade antimicrobiana do eugenol frente às amostras de *alicyclobacillus* spp. isoladas de suco de laranja

Antimicrobial properties of eugenol on *alicyclobacillus* spp. isolated from orange juice

RIALA6 1483

Juliana Guerra de OLIVEIRA¹, Benício Alves de ABREU FILHO^{2*}

*Endereço para correspondência: 2Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, 5790, CEP: 87020-900 Jardim Universitário, Zona 7 – Maringá, PR, Brasil. Tel.: +55 (44) 3011-4955. E-mail: baafilho@uem.br

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, Brasil

Recebido: 31.10.2011- Aceito para publicação: 18.04.2012

RESUMO

Foi avaliada a atividade antimicrobiana do eugenol contra *Alicyclobacillus hesperidum*, *Alicyclobacillus cycloheptanicus*, *Alicyclobacillus acidiphilus*, *Alicyclobacillus acidoterrestris* e de *Alicyclobacillus* spp., isolados em indústrias de sucos de laranja de várias regiões do Estado de São Paulo. O teste de suscetibilidade para o eugenol foi realizado determinando-se a concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica de microdiluição em placas de 96 cavidades. A CIM do eugenol variou de 66,65 a >1066,4 µg/ml, evidenciando-se a atividade inibitória forte e moderada frente a todas as amostras testadas e a atividade bactericida. Este estudo demonstrou ser significativa a fonte de isolamento das linhagens de *Alicyclobacillus* spp. nas indústrias. Conclui-se que o eugenol possui eficaz atividade antimicrobiana contra *Alicyclobacillus* spp. e sugere-se o uso deste composto para prevenir a deterioração de bebidas acidificadas e para diminuir o custo do controle microbiológico mais especificamente em suco de laranja. **Palavras-chave.** *Alicyclobacillus*, eugenol, suco de laranja, atividade antibacteriana.

ABSTRACT

The antimicrobial activity of eugenol was evaluated on *Alicyclobacillus hesperidum*, *Alicyclobacillus cycloheptanicus*, *Alicyclobacillus acidiphilus*, *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Alicyclobacillus* spp. samples, which were isolated from orange juice industries of several regions of São Paulo. The antimicrobial susceptibility to eugenol was tested by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) by microdilution technique in 96-well plates. The MIC of eugenol ranged from 66.65 to > 1066.4 µg/ml, showing strong and moderate inhibitory activity on all of tested bacteria samples, and its bactericidal activity. In this study, the source of *Alicyclobacillus* spp. strains isolation in industries proved to be significant. Considering the observed results, it can conclude that eugenol has antimicrobial effectiveness on *Alicyclobacillus* spp., and it is suggested the use of this compound for preventing the acidified beverages deterioration, and to decrease the cost of microbiological control specifically in orange juice.

Keywords. *Alicyclobacillus*, eugenol, orange juice, antibacterial activity.

INTRODUÇÃO

O gênero *Alicyclobacillus* spp. compreende 18 diferentes espécies de bactérias Gram-positivas formadoras de esporos, isoladas de solo, suco de frutas deteriorado ou de ambientes extremos. A habilidade de crescer em pH ácido (3,0-3,5), alta temperatura (50-70 °C) e a presença de ácidos graxos na membrana são algumas características do gênero¹.

Espécies de *Alicyclobacillus* têm sido comumente isoladas de alimentos e bebidas ácidas termoprocessadas. A incidência de *Alicyclobacillus* spp. é observada principalmente em sucos de laranja e maçã², também são isolados de sucos de manga³ e pêra⁴. Este micro-organismo é visto como um desafio para a estabilidade microbiológica de sucos de frutas pelo mundo inteiro e são considerados organismos-alvo na avaliação da qualidade de produtos ácidos termoprocessados.

O comportamento acidotermofílico proporciona aos esporos de *Alicyclobacillus* spp. a habilidade de sobrevivência em etapas letais do processamento do suco de fruta, por exemplo, sanitização da fruta e pasteurização do suco. A deterioração do produto é caracterizada pela presença de um sabor e odor desagradáveis, aumento da turbidez do produto e a formação de um sedimento branco no fundo da embalagem. Uma das principais causas da deterioração por *Alicyclobacillus* spp. é a formação do composto 2,6-dibromofenol, 2-6 diclorofenol e guaicol.

Compostos naturais com ação antimicrobiana são vistos como novas alternativas para controlar o crescimento de *Alicyclobacillus* spp. em produtos ácidos termoprocessados⁵ e melhorar características sensoriais e qualidade microbiológica de sucos. O eugenol é um composto fenólico, componente principal (80-95%) do óleo essencial do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), relatado como agente antiviral, bactericida e fungicida. A ação de inibição microbiana do eugenol pode estar relacionada com a ruptura da membrana ou por inativação de enzimas e materiais genéticos⁶.

O estudo do eugenol como agente antimicrobiano e flavorizante em sucos de frutas pode ser visto como uma alternativa viável para prolongar a vida útil do produto e diminuir perdas econômicas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antimicrobiano do eugenol frente amostras de *Alicyclobacillus* spp. isoladas de suco de laranja de indústrias localizadas em diferentes regiões do estado de São Paulo.

MATERIAL E MÉTODOS

Micro-organismo e condições de cultivo

Amostras isoladas de suco de laranja em diferentes etapas do processo industrial (suco fresco, polpa e suco concentrado antes e após adições) foram selecionadas de fábricas de três diferentes regiões do estado de São Paulo. Os dados de origem dos isolados e linhagens referência encontram-se listados na Tabela 1.

Tabela 1. Isolados de *Alicyclobacillus* spp. utilizados nos experimentos para avaliação da atividade antibacteriana do eugenol

Isolados de amostras de suco de laranja	
<i>Alicyclobacillus</i> spp.	CBMAI 0267
<i>Alicyclobacillus</i> spp.	CBMAI 0269
<i>Alicyclobacillus</i> spp.	CBMAI 0277
<i>Alicyclobacillus</i> spp.	CBMAI 0278
<i>Alicyclobacillus</i> spp.	CBMAI 0279
<i>Alicyclobacillus</i> spp.	CBMAI 0281
<i>Alicyclobacillus</i> spp.	CBMAI 0282
<i>Alicyclobacillus</i> spp.	CBMAI 0283
<i>Alicyclobacillus</i> spp.	CBMAI 0288
<i>Alicyclobacillus</i> spp.	CBMAI 0290
<i>Alicyclobacillus</i> spp.	CBMAI 0291
<i>Alicyclobacillus</i> spp.	CBMAI 0293
<i>Alicyclobacillus</i> spp.	CBMAI 0294
<i>Alicyclobacillus</i> spp.	CBMAI 0296
Linhagens de referência	
<i>A. cycloheptanicus</i> DSM 4006 ^T	CBMAI 0297 ^T
<i>A. acidoterrestris</i> DSM 3922 ^T	CBMAI 0244 ^T
<i>A. acidiphilus</i> DSM 14558 ^T	CBMAI 0247 ^T
<i>A. hesperidum</i> DSM 12489 ^T	CBMAI 0246 ^T

CBMAI = Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria, CPQBA/UNICAMP, Paulínia, SP. DSM = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen.

As linhagens de *Alicyclobacillus* isoladas de amostras ambientais foram obtidas da Coleção de Culturas Tropical (CCT), Fundação André Tosello, Campinas (SP), originárias de um estudo de campo realizado em conjunto com a Associação Brasileira de Exportadores de Citrus. Essas amostras estão estocadas e codificadas na Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria- CBMAI, Paulínia (SP).

Para o isolamento das amostras, foi utilizado o meio de cultura *A. acidocaldarius*/*A. acidoterrestris* thermophilic ágar (BAT). Todos os isolados selecionados para o estudo foram preservados a -80 °C em glicerol.

Preparo da droga teste (Eugenol)

O eugenol (adquirido em farmácia com densidade de 1,0664 g/mL) foi diluído 1/100 em salina 0,9% estéril e Tween 2%. Em seguida, essa solução foi diluída 1/5 em salina 0,9% estéril, resultando em uma concentração final de 2132,8 µg/mL.

Preparo das drogas-padrão (Vancomicina e Cloranfenicol)

A quantidade de 1 mg de cada droga foi dissolvida em 1.000 µL de água destilada estéril. Cada solução foi diluída 1/2 em salina 0,9%, e 1/4 em meio BAT, resultando em uma concentração final de 125 µg/mL.

Preparo do inóculo bacteriano

Os micro-organismos foram cultivados em meio BAT caldo por 24-48 horas a 45 °C. Em seguida, uma suspensão padronizada (0,5 da escala McFarland = 10⁸ UFC/mL) foi utilizada na preparação. Esta suspensão bacteriana foi diluída 1/10 em meio BAT caldo (10⁷ UFC/mL).

Determinação da atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana do eugenol foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo. Para o teste, foi utilizada uma microplaca de 96 poços contendo 100 µL de caldo BAT em todos os poços. Foram adicionados 100 µL da solução de eugenol no primeiro poço e, posteriormente, foi realizada uma diluição seriada. O mesmo procedimento foi feito para as drogas padrão, vancomicina e cloranfenicol. Em seguida, 5 µL do preparo do inóculo bacteriano foram adicionados em todos os poços.

A susceptibilidade ao eugenol foi testada nas concentrações de 1.066,4 até 0,52 µg/mL. Para vancomicina e cloranfenicol, foram avaliadas as concentrações de 62,5 µg/mL até 0,03 µg/mL.

As microplacas foram incubadas a 45 °C por 24-48 horas e acondicionadas em sacos plásticos contendo um chumaço de algodão úmido para evitar a evaporação excessiva durante a incubação. Foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) definida como a menor concentração do composto em que não é observado crescimento microbiano visível. Todas as análises foram feitas em duplicatas.

Teste da concentração mínima bactericida

A concentração mínima bactericida (CMB) foi determinada pelo cultivo de 100 µL em placas de

Petri contendo meio BAT-ágar de cada poço em que foi observada inibição. As placas foram incubadas a 45 °C por 24-48 horas, acondicionadas em sacos plásticos contendo um chumaço de algodão úmido para evitar a evaporação excessiva durante a incubação. A CMB foi definida como a menor concentração do composto capaz de matar as células microbianas. Todas as análises foram feitas em duplicatas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, foi investigado o potencial antimicrobiano do eugenol frente amostras de *Alicyclobacillus* spp. O resultado das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) para o eugenol e drogas padrão está relatado na Tabela 2.

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima (CIM) das amostras e padrões testados

Amostras CBMAI	Eugenol (µg/ml)	Vancomicina (µg/ml)	Cloranfenicol (µg/ml)
0267	>1066,4	0,12	0,48
0269	1066,4	0,48	3,90
0277	1066,4	0,48	3,90
0278	133,3	3,90	0,97
0279	1066,4	0,97	7,81
0281	533,2	0,24	0,97
0282	66,5	0,24	0,48
0283	>1066,4	0,48	7,81
0288	66,65	0,48	3,90
0290	533,2	0,97	3,90
0291	>1066,4	0,48	7,81
0293	266,6	0,24	0,97
0294	133,3	0,48	1,95
0296	>1066,4	0,48	7,81
0244 ^T	533,2	0,12	3,90
0246 ^T	66,65	0,97	1,95
0247 ^T	133,3	0,48	3,90
0297 ^T	133,3	0,48	3,90

T: amostra padrão

De acordo com os resultados obtidos, a CIM do eugenol variou de 66,65 a > 1.066,4 µg/mL. Esse resultado indicou que algumas amostras foram mais sensíveis ao composto em relação a outras. Esta diferença observada pode estar associada às etapas do processamento industrial do suco, bem como à origem dessas amostras. Além de que, a composição dos óleos essenciais é completamente variável dependendo do

modo de extração, plantas e clima⁵.

De acordo com dados da literatura forte, moderada e fraca, atividade inibitória de materiais vegetais corresponde a CIM ($\mu\text{g/mL}$) de até 500; entre 600 e 1.500; e acima de 1.600, respectivamente⁷. No presente estudo, eugenol apresentou atividade inibitória forte e moderada frente às amostras de *Alicyclobacillus* spp. Este resultado difere de outro trabalho que obteve CIMs maiores quando utilizadas as bactérias formadoras de esporos, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes*⁸.

Em relação à avaliação das amostras-padrão, a CIM correspondeu a uma atividade inibitória forte para *Alicyclobacillus hesperidum* (CBMAI 0246^T), *Alicyclobacillus cycloheptanicus* (CBMAI 0297^T), *Alicyclobacillus acidiphilus* (CBMAI 0247^T) e atividade inibitória moderada para *Alicyclobacillus acidoterrestris* (CBMAI 0244^T). Resultado semelhante foi observado por Abreu Filho et al.⁹, que verificaram o potencial de inibição do óleo essencial de ervas aromáticas, cujo componente principal é o eugenol, contra a bactéria *Alicyclobacillus acidoterrestris* DMS 2498, demonstrando haver uma forte e moderada atividade inibitória.

Para as drogas padrão testadas, a CIM verificada variou de 7,81 $\mu\text{g/mL}$ até 0,48 $\mu\text{g/mL}$ para cloranfenicol, e de 0,12 $\mu\text{g/mL}$ até 3,90 $\mu\text{g/mL}$ para vancomicina. Esta atividade inibitória forte contra estes microrganismos pode ser vista como uma alternativa em associação com eugenol para o controle da germinação de esporos de *Alicyclobacillus* spp. Nesta visão, Bevilacqua et al.¹⁰ comprovaram possuir efeito sinérgico, eugenol e cinamaldeído, no controle de *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Outros autores também relataram o mesmo efeito sinérgico frente aos fungos *Lenzites betulina* e *Laetiporus sulphureus* e a bactéria *Helicobacter pylori*^{11,12}.

Eugenol exibe efeito bactericida contra uma ampla variedade de micro-organismos, como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella typhi*. Os resultados do presente trabalho mostraram igual ação contra *Alicyclobacillus* sp., nas concentrações ($\mu\text{g/mL}$): 533,2; 266,6; 66,65; 66,65; 133,3 para as amostras 0244, 0293, 0282, 0288, e 0297, respectivamente.

A fonte de isolamento das linhagens de *Alicyclobacillus* spp. demonstrou ser significativa neste estudo. Os micro-organismos isolados de suco concentrado após a pasteurização apresentaram fortes

e moderadas atividade inibitória, com a CIM variando de 133,3 a $> 1.066,4$ $\mu\text{g/mL}$; demonstrando, desta forma, diferentes respostas ao composto nesta fase da industrialização. O eugenol apresentou uma atividade inibitória forte, frente à amostra isolada da água "taste", usada no enxágue final de tanques e correção de Brix. Para a indústria, este resultado é importante, uma vez que mostra a necessidade de diferentes formas de controle.

Vários autores destacam diferenças quanto à susceptibilidade da ação antimicrobiana do eugenol frente a diferentes microrganismos. Meena e Vijay¹³ estudaram atividade de vários óleos essenciais contra *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus cereus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Mycoderma* sp. e *Aspergillus niger* e observaram vários graus de inibição, sendo *Mycoderma* sp o mais susceptível e *Bacillus cereus*, o mais resistente. Oussalah et al.¹⁴ também verificaram diferentes respostas quanto ao efeito antimicrobiano do óleo essencial de *Eugenia caryophyllus* (cravinho), cujo principal composto é o eugenol, contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Tippayatum e Chonhenchob⁸ obtiveram a CIM de 8 a 11 mg/mL , dependendo da amostra bacteriana testada, sendo *E.coli* o micro-organismo que demonstrou maior sensibilidade ao composto.

O conhecimento da ação do composto eugenol como um agente bioconservador torna-se importante, uma vez que este agente poderia ser utilizado após o processo de pasteurização industrial, sendo este procedimento não eficaz contra as formas esporuladas.-

Novos estudos são necessários sobre a determinação de *Alicyclobacillus* spp. em diferentes sucos de frutas ácidas. A resistência das linhagens a diferentes etapas industriais de suco de frutas pode estar associada a diferenças observadas entre as linhagens em relação a germinação/crescimento de esporos e inativação termal, influência da atividade de água e outros constituintes do produto como fenóis¹⁵. Além disso, a idade celular, o número de células, desidratação do protoplasto e a temperatura de esporulação podem afetar a resistência térmica. Grandes populações microbianas podem também fornecer maior resistência ao calor devido a termoproteção e proteínas extracelulares que são secretadas pelas células¹⁶.

CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que o eugenol possui atividade antimicrobiana frente amostras de

Alicyclobacillus spp., possuindo atividade inibitória forte e moderada e atividade bactericida. Desta maneira, seu uso pode ser indicado para produtos ácidos termoprocessados, como, por exemplo, suco de laranja, aumentando a vida útil do produto, além de diminuir o custo do controle microbiológico industrial por se tratar de um produto natural. O composto testado possui um bom potencial para o uso como conservante alimentar, porém o uso necessita de análises sensoriais e organolépticas para avaliar o grau de interferência no suco de laranja ou bebidas acidificadas.

REFERÊNCIAS

1. Yamazaki K, Murakami M, Kawai Y, Inoue N, Matsuda T. Use of nisin for inhibition of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in acidic drinks. *Food Microbiol*. 2000;17:315-20.
2. Luo H, Yousef AE, Wang HH. A real-time polymerase chain reaction-based method for rapid and specific detection of spoilage *Alicyclobacillus* spp. in apple juice. *Lett Appl Microbiol*. 2004;39:376-82.
3. Gouws PA, Gie L, Pretorius A, Dhansay N. Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidocaldarius* by 16S rDNA from mango juice and concentrate. *Int J Food Sci Technol*. 2005;40:789-92.
4. Groenewald WH, Gouws PA, Witthuhn RC. Isolation, identification and typification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Alicyclobacillus acidocaldarius* strains from orchard soil and the fruit processing environment in South Africa. *Food Microbiol*. 2009;26:71-6.
5. Bevilacqua A, Corbol MR, Sinigaglia M. Inhibition of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores by natural compounds. *Int J Food Sci Technol*. 2008;43:1271-5.
6. Wendakdoon CN, Sakaguchi M. Combined effect of sodium chloride and clove on growth and biogenic amine formation of *Enterobacter aerogenes* in mackerel muscle extract. *J Food Protect*. 1993;56:410-13.
7. Aliannidis N, Kalpoutzakis E, Mitaku S, Chinou IB. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J Agri Food Chem*. 2001;49:4168-70.
8. Tippayatum P, Chonhenchob V. Antibacterial activities of thymol, eugenol and nisin against some food spoilage bacteria. *Nat Sci*. 2007;41:319-23.
9. Abreu Filho BA. Caracterização taxonômica de linhagens de *Alicyclobacillus* spp. isoladas na indústria de suco de laranja (tese de doutorado). Campinas, SP: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas; 2005.
10. Bevilacqua A, Corbo AR, Sinigaglia M. Combining eugenol and cinnamaldehyde to control the growth of *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Food Control*. 2010;21:172-7.
11. Yen TB, Chang HT, Hsieh CC, Chang ST. Antifungal properties of ethanolic extract and its active compounds from *Calocedrus macrolepis* var. *formosana* (Florin) heartwood. *Bioresour Technol*. 2008;99(11):4871-7.
12. Ali SM, Khan AA, Ahmed I, Musaddiq M, Ahmed KS, Polasa H, et al. Antimicrobial activities of eugenol and cinnamaldehyde against the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2005;4(20):1-7.
13. Meena M, Vijay S. Antimicrobial activity of essential oils from spices. *J Food Sci Technol*. 1994;31:68-70.
14. Oussalah M, Caillet S, Saucier L, Lacroix M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*. 2007;18:414-20.
15. Silva FVM, Gibbs P. *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in fruit products and design of pasteurization processes. *Trends Food Sci Technol*. 2001;12(2):68-74.
16. Jay JM, Loessner MJ, Golden DA. Food protection with high temperatures, and characteristics of thermophilic microorganisms. *Modern Food Microbiology*. 2005;5: 415-41.

Qualidade microbiológica de castanhas de caju (*Anacardium occidentale*, L.) industrializadas e processadas artesanalmente

Study on the microbiological quality of industrialized and handmade cashew nuts (*Anacardium occidentale* L.)

RIALA6/1484

Aline Maria Dourado RODRIGUES^{1*}, Rodrigo Maciel CALVET¹, Melina da Conceição Macêdo da SILVA¹, Francisco das Chagas Cardoso FILHO¹, Aline Marques MONTE¹, Carina Maricel PEREYRA², Maria Christina Sanches MURATORI¹, Fábio Coelho Gomes NÓBREGA¹, Maria Marlúcia Gomes PEREIRA¹

*Endereço para correspondência: ¹Núcleo de Estudos, Pesquisa e Processamento de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portela, CEP: 64049-550, Teresina, PI, Brasil. Tel.: (86) 3215-5754. E-mail: alinemary@yahoo.com.br

²Departamento de Microbiología y Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Córdoba, Argentina

Recebido: 03.04.2012- Aceito para publicação: 20.06.2012

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade microbiológica de castanhas industrializadas e das castanhas artesanalmente processadas, comercializadas por ambulantes em Teresina (PI). Foram coletadas 40 amostras de castanhas, sendo 21 amostras de castanhas industrializadas de três marcas (“A”, “B” e “C”) e 19 amostras de castanhas processadas artesanalmente (“D”), nas quais foram realizadas a determinação de coliformes a 35 °C e a 45 °C (NMP/g), a pesquisa de *Salmonella* spp. e a contagem de fungos. As amostras da marca “D” apresentaram maiores valores de coliformes a 35 °C ($1,16 \times 10^1$ NMP/g); para coliformes a 45 °C, foram detectados valores de 7,0 NMP/g, e de $1,22 \times 10^2$ UFC/g para fungos e leveduras. Nas amostras da marca “A”, os valores para coliformes a 35 °C e 45 °C foram de 4,0 NMP/g e, para fungos e leveduras, de $1,0 \times 10^2$ UFC/g. Foram isoladas 43 cepas fúngicas. Do gênero *Aspergillus*, houve maior prevalência da espécie *Aspergillus niger* agregados (64,7%), e as espécies *P. corylophilum* (33,3%) e *P. citrinum* (29,2%) do gênero *Penicillium*. As amostras de castanhas industrializadas e processadas artesanalmente apresentaram condições higiênico-sanitárias satisfatórias e de acordo com a legislação vigente.

Palavras chave. qualidade microbiológica, coliformes a 45 °C, fungos toxigênicos, *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp.

ABSTRACT

This study evaluated the microbiological quality of industrialized and handmade cashew nuts sold by street sellers in Teresina, PI. Forty samples of cashew nuts were collected, being 21 samples of industrialized products from three brands (“A”, “B” and “C”) and 19 samples of handmade nuts (“D”), which were analyzed on coliforms enumeration at 35 °C and 45 °C (MPN/g), *Salmonella* spp. isolation, and fungi and yeasts counting. Samples of brand “D” showed the highest coliforms counting at 35 °C (1.16×10^1 MPN/g); values of 7.0 MPN/g were found for coliforms at 45 °C, and of 1.22×10^2 CFU/g for fungi and yeasts. In the brand “A” samples, values of 4.0 MPN/g for coliforms at 35 °C and 45 °C, and of 1.0×10^2 CFU/g for fungi and yeasts were detected. Forty-three fungi strains were isolated. The mostly prevalent species were the aggregated *Aspergillus niger* (64.7%), *P. corylophilum* (33.3%) and *P. citrinum* (29.2%). The samples of industrialized cashew nuts and the handmade nuts showed satisfactory hygienic and sanitary conditions in compliance with the legislation in force.

Keywords. microbiological quality coliforms at 45 °C, toxigenic fungi, *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp.

INTRODUÇÃO

O cajueiro (*Anacardium occidentale*, L.), planta xerófila e rústica, é típica de clima tropical. Originária do Brasil, do litoral nordestino, apresenta interesse especialmente nutricional e econômico pela qualidade de sua castanha (o verdadeiro fruto) e pela riqueza em vitamina C de seu pedúnculo avolumado, o qual corresponde à polpa comestível¹.

O agronegócio do fruto dessa planta no Nordeste do Brasil tem grande importância social e econômica para a região. O seu cultivo ocupa uma área de 700 mil hectares que gera 35.700 empregos no campo e 20 mil na indústria, não se conhecendo os números no mercado informal². O agronegócio do caju no mundo concentra-se em torno da amêndoa, que representa cerca de dois bilhões de dólares anuais em nível de varejo, ocupando o terceiro lugar entre as nozes mais comercializadas no mercado internacional. A demanda mundial apresenta um quadro em que os Estados Unidos absorvem em torno de 60% do total consumido².

Existe uma grande preocupação com o desenvolvimento de novas tecnologias para o processamento de castanhas, pois, além de incorporarem a otimização do processamento, ajudam a manter o homem no campo. Ademais, o custo deste procedimento representa 60% de toda produção². Já nos centros urbanos, existe uma gama de famílias que operam com o processamento manual da amêndoa da castanha de caju, gerando, assim, uma alternativa de beneficiamento em pequena escala, proporcionando aumento da renda familiar com a venda do produto nas ruas^{2,3}.

Nesse aspecto, aparece a preocupação com a segurança alimentar que vem crescendo nos últimos anos, gerando uma série de discussões entre organizações governamentais, instituições de ensino e indústrias alimentícias sobre programas que assegurem à população produtos que não sejam prejudiciais à saúde. Essa questão, que a princípio envolvia basicamente a disponibilidade e possibilidade de acesso da população ao alimento, está sendo discutida também em função dos riscos causados por esses mesmos alimentos⁴.

Deste modo, o controle da qualidade dos alimentos, em geral, assim como das castanhas de caju vendidas por ambulantes nas ruas de algumas cidades do Brasil, torna-se uma realidade preocupante para a saúde pública, pois as condições higiênico-sanitárias de processamento e do produto final não são conhecidas,

podendo, desta maneira, constituir-se em um importante veículo de disseminação de doenças transmitidas por alimentos (DTA).

Dentre as DTA de grande relevância na saúde pública, podemos citar a salmonelose, que se caracteriza como uma doença gastrointestinal, e as micotoxicoses, que ocorrem devido à exposição humana a micotoxinas presentes em alimentos contaminados por fungos toxigênicos. A contaminação dos alimentos por micotoxinas podem ocorrer no campo, antes e após a colheita, e durante o transporte e armazenamento do produto.

Diante do exposto, vê-se a importância do estudo das condições microbiológicas de castanhas industrializadas expostas a venda no comércio local e das castanhas processadas artesanalmente.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das amostras

Foram realizadas análises microbiológicas de castanhas de caju adquiridas na cidade de Teresina (PI) e utilizaram-se dois tipos de castanhas: as processadas de forma artesanal e comercializadas na rua e as processadas industrialmente e vendidas no comércio local.

Foram coletadas 40 amostras de castanhas de caju, das quais 21 amostras eram de castanhas industrializadas e 19 amostras eram de castanhas processadas artesanalmente e comercializadas nas ruas. Foram sorteadas três marcas de castanhas processadas industrialmente comercializadas em Teresina (PI) e designadas para fins de pesquisas como marcas "A", "B" e "C", totalizando sete amostras por marca. As amostras de castanha artesanal foram denominadas de amostra "D". Após a coleta, as amostras foram transportadas em recipiente isotérmico para o laboratório de Controle Microbiológico de Alimentos do Núcleo de Estudos, Pesquisa e Processamento de Alimentos (NUEPPA) do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Piauí, para determinação do número mais provável de coliformes a 35 °C e a 45 °C (NMP/g), pesquisa de *Salmonella* spp., e contagem de fungos e leveduras e identificação de fungos.

Preparo das amostras e análises microbiológicas

As amostras de castanhas de caju foram trituradas em liquidificador doméstico e, depois, 25 g de cada amostra foram pesadas assepticamente e transferidas para 225 mL de água peptonada 1,0%, obtendo, assim,

a diluição 10^{-1} . Em seguida, procederam-se diluições decimais seriadas consecutivas 10^{-2} e 10^{-3} . Foram realizadas as análises para determinação do número mais provável de coliformes a 35 °C e a 45 °C (NMP/g) e pesquisa de *Salmonella* spp de acordo com a metodologia descrita na Instrução Normativa nº 62 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento⁵.

Contagem de fungos e leveduras e identificação da microbiota fúngica

Para contagem de fungos e leveduras, seguiu-se a metodologia descritas por Pitt e Hocking⁶, conforme segue: a partir da diluição inicial (10^{-1}) descrita acima, foram transferidas alíquotas de 1,0 mL para placas de Petri contendo 0,1 mL de ácido tartárico. Posteriormente, verteu-se o Agar Dextrose Batata pelo método *pour plate* e, após solidificação, as placas foram incubadas em estufa a 25 °C por cinco a sete dias. Foram selecionadas para contagem as placas que apresentaram contagens entre 10 a 100 unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g).

Os gêneros de *Aspergillus* e *Penicillium* foram repicados e isolados em Agar Extrato de Malte (MEA) e mantidos em refrigeração até a identificação de suas espécies conforme as chaves de identificação descritas por Klich⁷ e Pitt⁸ baseadas na semeadura em quatro meios básicos: Czapek Yeast Extract Agar (CYA), MEA, Czapek Yeast Extract Agar 20% Sucrose (CY20S) e Glycerol Nitrate Agar 25% (G25N). A partir de cada cepa, preparou-se uma suspensão de conídios em 0,5 mL de meio constituído de 0,2% de agar-agar e 0,05% de Tween 80TM⁶. A seguir, a suspensão de conídios foi transferida, com auxílio de uma agulha de platina, para três pontos equidistantes nas placas contendo CYA, MEA, CY20S e G25N. Uma placa de CYA, MEA, CY20S e G25N foi incubada a 25 °C, e uma placa de CYA a 37 °C e a 5 °C, todas placas incubadas por um período de sete dias. Após a incubação, visando a identificação das espécies, foram observadas as estruturas micromorfológicas e as características macroscópicas das colônias (diâmetro, textura, forma, aspecto da superfície e do reverso, pigmentação dos conídios e pigmento solúvel, produção e cor de exsudado).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados microbiológicos das amostras de castanhas de caju industrializadas e das castanhas processadas artesanalmente estão apresentados na Tabela 1.

Dentre as amostras de castanhas de caju analisadas, a amostra “D” apresentou a maior contagem para coliformes a 35 °C. No entanto, os resultados para a contagem de coliformes a 45 °C demonstraram que as castanhas apresentaram valores inferiores ao limite máximo permitido pela legislação brasileira⁵, que estabelece valor máximo de 10^3 NMP/g para coliformes a 45 °C e ausência de *Samonella* spp. (Tabela 1). Estes resultados assemelham-se aos de Costa et al.⁹ que, ao avaliarem a microbiologia da amêndoa da castanha de caju, concluíram que a adoção das Boas Práticas de Fabricação e do sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle pela indústria na sua linha de produção refletiram nas boas condições higiênico-sanitárias do produto final.

A presença de coliformes a 35 °C nas amostras “D” deve-se possivelmente às condições de manipulação, uma vez que estas, provavelmente, são manuseadas, processadas e embaladas sob precárias condições higiênico-sanitárias nas ruas por ambulantes locais, diferentemente das castanhas industrializadas.

A legislação brasileira vigente¹⁰ não preconiza um limite de coliformes totais para este produto alimentício e, mesmo este apresentando valores baixos, esta contagem também é significativa, pois, segundo Franco e Landgraf¹¹, estes micro-organismos são indicadores de contaminação, podendo, entre eles, existir a presença de micro-organismos deterioradores e ou patogênicos.

Tabela 1. Resultado médio das análises microbiológicas realizadas em castanhas de caju industrializadas e das castanhas processadas artesanalmente

Amostras	Coliformes 35 °C (NMP/g)	Coliformes 45 °C (NMP/g)	Fungos e Leveduras (UFC/g)	<i>Salmonella</i> spp.
A	4,0	4,0	$1,0 \times 10^2$	Ausência
B	< 3,0	< 3,0	$<1,0 \times 10^1$	Ausência
C	< 3,0	< 3,0	$<1,0 \times 10^1$	Ausência
D	$1,2 \times 10^1$	7,0	$1,2 \times 10^2$	Ausência
Padrão (Brasil, 2001)	-	10^3 NMP/g	-	Ausência

NMP/g = Número Mais Provável por grama; UFC/g = Unidade Formadora de Colônia por grama

Dentre as amostras industrializadas, a amostra da marca “A” foi a que apresentou os maiores valores para coliformes a 35 °C e 45 °C ($4,0$ NMP/g) e fungos e leveduras ($1,0 \times 10^2$ UFC/g). As demais amostras “B” e “C” apresentaram valores semelhantes, sendo $< 3,0$

NMP/g para coliformes a 35 °C e 45 °C e $<1,0 \times 10^1$ para fungos e leveduras (Tabela 1). Esta diferença pode ser explicada pela falha de alguma etapa do processamento das castanhas.

Os resultados das castanhas obtidas de forma artesanal apresentaram-se acima dos encontrados para castanhas industrializadas, indicando que o controle de qualidade, processamento, manuseio, embalagem e armazenamento da castanha industrial é mais rigoroso em comparação as castanhas de caju processadas de forma artesanal.

Dentre os gêneros fúngicos isolados, foram identificadas 43 cepas, pertencentes a quatro gêneros: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Curvularia* e *Syncephalastrum*. As espécies prevalentes pertenciam aos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*. Estes resultados foram semelhantes aos de Freire e Kozakiewicz¹² ao relacionar os organismos associados a amêndoas de cajueiro no Brasil. Costa et al.¹³, ao identificarem fungos relacionados à castanha-do-Brasil e ao amendoim comercializados em Fortaleza (CE), constataram que os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* também foram os mais prevalentes e enfatizaram sobre a elevada contaminação fúngica observadas nos produtos analisados.

Foram identificadas 17 cepas do gênero *Aspergillus* pertencentes às seções, Nigri e Flavi. A maior prevalência foi de *Aspergillus niger* agregados. Também foram isoladas outras duas espécies importantes como *A. flavus* e *A. oryzae*, sendo que o *A. flavus* é considerada uma importante espécie produtora de micotoxinas e, de acordo com Costa et al.¹³, a presença constante de espécies de *Aspergillus*, especialmente *A. flavus*, sugere que estes produtos podem estar contaminados com aflatoxinas.

Foram identificadas 24 espécies do gênero *Penicillium*, com predominância do *Penicillium corylophilum*, seguido pelo *Penicillium citrinum*, potencialmente capaz de produzir micotoxina⁸.

As espécies do gênero *Penicillium* são consideradas fungos de produtos armazenados⁸. Algumas espécies são também importantes produtoras de micotoxinas, como a patulina, encontrada frequentemente em frutas e a citrinina em cereais e alimentação animal⁶.

O controle de qualidade das castanhas é fundamental, uma vez que estas são consumidas diretamente ou utilizadas na formulação de outros alimentos. A presença de fungos produtores de micotoxinas pode representar riscos ao consumidor, pois estudos apontam que essas toxinas podem causar severos

danos à saúde, como efeitos neurotóxicos, nefrotóxicos, imunológicos e alterações gastrointestinais¹⁵.

Em estudo³ realizado em várias etapas do processamento com amostras de castanhas industrial, também foi detectada a presença dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, demonstrando que a etapa de armazenamento torna-se um ponto crítico de controle durante seu beneficiamento, e seu controle é fundamental para a qualidade do produto final. Caso os fatores como umidade e temperatura de armazenamento nesta etapa não sejam controlados, a presença destes fungos em número elevado pode favorecer a produção de micotoxinas. Deste modo, é necessário também, avaliar as etapas de processamento da castanha produzida de forma artesanal para verificar seus pontos críticos de controle durante seu beneficiamento e controlar os fatores extrínsecos e intrínsecos que podem favorecer sua preservação e garantir sua qualidade até o consumidor final.

CONCLUSÃO

As amostras de castanhas industrializadas e processadas artesanalmente apresentam condições higiênicas e sanitárias satisfatórias de acordo com a legislação vigente. No entanto, a presença de algumas espécies fúngicas que podem ser toxigênicas requer uma atenção especial, principalmente para as castanhas comercializadas nas ruas, o que pode favorecer um aumento mais significativo destes micro-organismos, seguido de produção de micotoxinas oferecendo assim risco à saúde do consumidor.

REFERÊNCIAS

1. Garruti DS, Franco MRB, Silva MA, Janzantti NS, Alves GL. Compostos voláteis do sabor de pseudofrutos de cajueiro anão precoce (*Anacardium occidentale* L.). *Bol Pesq Desenv/Embrapa Agroind Trop*. 2001;4,CCp-76:29.
2. Paiva FFA, Silva Neto RM, Paula Pessoa PFA. Minifábrica de processamento de castanha de caju. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical; 2000. (Embrapa Agroindústria Tropical. Circular Técnica 07).
3. Silva MCM, et al. Avaliação microbiológica da castanha de caju (*Anacardium occidentale* L.) processada pela cooperativa COCAJUPI do Município de Picos, PI. XVIII Seminário de Iniciação Científica e I Seminário em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação da UFPI, novembro de 2009, Teresina.
4. Rodrigues KL, Gomes JP, Conceição RCS, Brod CS, Carvalho JB, Aleixo JAG. Condições higiênico-sanitárias no Comércio Ambulante de Alimentos em Pelotas-RS. *Rev Cienc Tec Alim, Campinas*. 2003;23(3):447-52.

5. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 18 set 2003.
6. Pitt JI, Hocking AD. Fungi and Food Spoilage. 3. ed. Londres/ Nova York: Springer Dordrecht Heidelberg; 2009.
7. Klich MA. A laboratory guide to the common *Aspergillus* species and their teleomorphs. CSIRO – Division Processing. Austrália, 2002.
8. Pitt JI. Guia del laboratorio para la identificación de especies comunes de *Penicillium*. CSIRO – Division of Food Processing. Austrália, 2004.
9. Costa JMC, Guerra KT, Maia GA, Rocha EMFF. Avaliação físico-química e microbiológica da amêndoa da castanha de caju. Publ UEPG Exact Earth Sci Agr Sci Eng. 2009;15(3):181-7.
10. Brasil. Ministério da Saúde. 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, DF, n, 10 jan 2001, seção 1, nº 7-E, p. 45-53.
11. Franco BDGM, Langraf M. Microbiologia dos Alimentos. São Paulo: Atheneu; 2008.
12. Freire FCO, Kozakiewicz Z. Filamentous fungi, bacteria and yeasts associated with cashew kernels in Brazil. Rev Ciênc Agron. 2005;36(2):249-54.
13. Costa AKE, Freire FCO, Vieira IGP, Andrade JA, Mendes, FNP. Fungos associados à castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bompl) e ao amendoim (*Arachis hypogaea* L.) comercializados em Fortaleza (Ceará). Rev Ciênc Agron. 2009;40(3):455-60.

Risco microbiológico associado a drogas vegetais psicoativas adquiridas no comércio popular

Microbiological contamination risk of psychoactive herbal drugs purchased in informal trade

RIALA6/1485

Julino Assunção Rodrigues SOARES NETO¹, Eliana RODRIGUES¹, Adriana Aparecida Buzzo ALMODOVAR^{2*}, Tatiana Caldas PEREIRA², Adriana BUGNO²

*Endereço para correspondência: ²Núcleo de Ensaios Biológicos e de Segurança, Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes, Instituto Adolfo Lutz. Av. Dr. Arnaldo, 355, Cerqueira Cesar, São Paulo/SP, CEP: 01246-902. E-mail: medicamentos.biol@ial.sp.gov.br

¹Centro de Estudos Etnobotânicos e Etnofarmacológicos, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Paulo – Campus Diadema

Recebido: 03.04.2012- Aceito para publicação: 29.06.2012

RESUMO

Este estudo avaliou o risco de contaminação por micro-organismos patogênicos em 70 amostras de drogas vegetais psicoativas, adquiridas no comércio popular de Diadema (SP). A análise foi feita seguindo-se os parâmetros microbiológicos definidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e Farmacopeia Brasileira. Ademais, foi averiguado o potencial da microflora isolada em produzir micotoxinas. Das drogas vegetais avaliadas, 66,7% das amostras estavam em desacordo com as especificações de qualidade da OMS. Quanto ao potencial micotoxigênico dos isolados fúngicos, nenhum demonstrou capacidade para produzir ocratoxina A ou citrinina; e quatro isolados (3,9%) apresentaram capacidade aflatoxigênica. A baixa qualidade microbiológica dos produtos estudados indicou a necessidade de adequar o comércio informal de drogas vegetais para resguardar a saúde dos consumidores.

Palavras-chave. plantas medicinais, contaminação, micotoxinas, comércio popular, risco sanitário.

ABSTRACT

This study evaluated the microbiological contamination risk of 70 samples of 18 psychoactive herbal drugs purchased in the informal trade in Diadema, SP. This analysis was performed according to the parameters established by the World Health Organization (WHO) and Brazilian Pharmacopeia. The microbiological quality concerning the bioburden and the occurrence of food-borne risk indicators were evaluated following the official compendia. Besides, the potential production of aflatoxins, ochratoxin A and citrinin by the isolated fungi was assessed. Of the analyzed herbal drugs, 66.7% samples did not comply with the WHO standards in relation to bacterial and fungal load. In accordance with the microorganism contamination risk indicators defined by the Brazilian Pharmacopoeia, the rate of noncompliant herbal drugs increased to 94.4% due to the detection of *Enterobacter* spp and *Aspergillus flavus*. In relation to toxigenic potential, none of the fungal isolates showed capability of producing ochratoxin A or citrinin, and four (3.9%) *Aspergillus flavus* isolates only were able to produce aflatoxins B1 and B2. The poor microbiological quality indicated the need to adequate the herbal drugs informal trade in order to preserve the consumer's health.

Keywords. medicinal plants, contamination, mycotoxins, informal trade, health risk.

INTRODUÇÃO

Apesar das descobertas de substâncias ativas em plantas medicinais terem impulsionado uma revolução científica e tecnológica que promoveu sua substituição por fármacos sintéticos, a Organização Mundial da Saúde estima que 80% da população dos países emergentes utilizam a medicina tradicional, especialmente fitoterapia, na atenção primária à saúde influenciada por fatores econômicos, sociais e culturais¹. Apesar disso, permanece a preocupação com a eficácia e a segurança de uso, pois a demanda não foi acompanhada pelo avanço na qualidade da matéria-prima.

O comércio popular de drogas vegetais sem o devido acompanhamento sanitário implica em riscos para a saúde pública relacionados ao uso de espécies equivocadas, substituições por vezes intencionais, imprecisão nos rótulos, contaminação microbiana, entre outros, que levam à inconsistência na qualidade²⁻⁶.

Em áreas urbanas, é comum a comercialização de drogas vegetais (DVs) em barracas de rua para as mais diversas indicações de uso. Alguns desses comerciantes agrupam as plantas em aglomerados, os chamados “amarrados”, que ficam livres para manipulação do público e expostos ao ar. O objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade microbiológica de drogas vegetais, obtidas em comércio popular nas ruas da cidade de Diadema (SP), para as quais se atribuem atividades psicoativas, ou seja, capacidade para alterar aspectos fisiológicos e comportamentais como a capacidade cognitiva, padrões de pensamento e humor.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Foram adquiridas amostras de drogas vegetais com possível ação psicoativa de quatro comerciantes locais, os quais, depois de esclarecidos quanto ao objetivo deste estudo, demonstraram concordância em participar com a assinatura de *termo de consentimento livre e esclarecido*. Durante as entrevistas, verificou-se que 39,9% das drogas vegetais comercializadas remetiam à atividade psicoativa, principalmente como estimulante. Para este estudo, foram coletadas 70 amostras compostas por 18 espécies vegetais com atividade psicoativa (anis estrelado, camomila, catuaba, cipó-cravo, erva-de-São-João, ginko, ginseng, guaraná, jatobá, maracujá, marapuama, melissa, mulungu, nó-de-cachorro, noz-de-cola, olho-de-boi, tília e valeriana).

Avaliação da qualidade microbiológica

As amostras adquiridas foram avaliadas quanto à carga de bactérias e fungos presentes e quanto à presença de micro-organismos indicadores de risco para a via de administração oral – *Salmonella* spp, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter* spp, *Candida albicans*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* – conforme Farmacopéia Brasileira². Em adição, verificou-se o potencial da microflora isolada para produzir as seguintes micotoxinas: aflatoxinas, ocratoxina A e citrinina.

Para a **enumeração de bactérias heterotróficas e fungos**, utilizou-se a técnica de semeadura em profundidade, conforme descrito em compêndios oficiais^{2,5}, assim como, para a **enumeração de *Escherichia coli* e outras enterobactérias**, foi utilizada a técnica de tubos múltiplos conforme descrito em compêndios oficiais².

O **isolamento e identificação de bactérias** foram realizados conforme indicado em compêndios oficiais^{2,6,7}, sendo a confirmação da identidade das colônias obtidas em meios de cultura seletivos executada por técnicas de coloração e provas bioquímicas.

Para o **isolamento de fungos** Ágar Dextrose Batata, utilizou-se, com incubação a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ por 10 dias, sendo a identificação realizada pela observação das características macromorfológicas e micromorfológicas, seguindo esquemas taxonômicos de Rapper e Fennel⁸ e Pitt⁹.

A **avaliação do potencial toxigênico** de *Aspergillus* e *Penicillium* nas amostras foi realizada por meio da inoculação dos isolados em Agar Coco pH 7,0 $\pm 0,1$ (para avaliar potencial de produzir aflatoxinas e ocratoxina A) e em Agar Coco pH 5,0 $\pm 0,1$ (para a avaliar potencial de produzir citrinina), incubados a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ por 10 dias¹⁰. Após o período de incubação, cada colônia desenvolvida foi transferida para frasco em vidro de boca larga, a qual foi pesada e macerada em clorofórmio, na proporção de 3,0 mL para cada 1,0 g de material. O macerado foi mantido em agitação por 30 minutos, em agitador mecânico horizontal tipo Shaker e, então, filtrado em papel de filtro, sendo o filtrado recolhido em tubo de ensaio e evaporado em banho-maria a 80°C alocado em capela de segurança química. As micotoxinas foram detectadas por cromatografia em camada delgada, conforme descrito por Soares e Rodriguez-Amaya¹¹ e a confirmação química da identidade da micotoxina foi realizada por técnicas adequadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O consumo de produtos de origem vegetal para alívio das desordens mentais tem significado e importância baseados em práticas populares¹² e tem aumentado com a evolução do conhecimento na área. No Brasil, a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos pretende garantir à população o acesso seguro e o uso racional associados ao desenvolvimento sócio-econômico, melhorando as condições de vida e saúde da população brasileira.

Embora o consumo seja disseminado, somente alguns poucos países apresentam regulamentação efetiva para garantir o uso seguro e eficaz de produtos de origem vegetal com finalidade terapêutica. Considerando a segurança biológica de drogas vegetais e fitoterápicos, a pesquisa dos contaminantes microbianos deve estar de acordo com especificações farmacopeicas ou com recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS). Como a via de administração indicada para o objeto deste estudo foi exclusivamente oral, sob a forma de decocto ou infusão, utilizou-se o seguinte padrão de qualidade recomendado pela OMS⁵: máximo de 10^7 UFC de bactérias aeróbias/g, máximo de 10^4 UFC de bolores e leveduras/g, máximo de 10^2 UFC de *Escherichia coli*/g, máximo de 10^4 UFC de outras enterobactérias/g e ausência de *Salmonella* spp. Ainda a Farmacopeia Brasileira⁹ indica que seja realizada a pesquisa de outros indicadores de maior risco para a via de administração oral, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter* spp, *Candida albicans*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*.

Observamos que 66,7% das drogas vegetais avaliadas estavam em desacordo com as especificações de qualidade da OMS por apresentarem populações de bactérias heterotróficas, fungos e/ou enterobactérias acima dos limites máximos estabelecidos (Figura 1). Porém, se considerados os indicadores de risco definidos pela Farmacopeia Brasileira, o índice de drogas vegetais em desacordo aumenta para 94,4%, devido à detecção de *Enterobacter* spp em 17 drogas vegetais (exceto anis estrelado) e de *Aspergillus flavus* em 12 drogas vegetais (catuaba, cipó-cravo, erva-de-São-João, ginseng, guaraná, jatobá, maracujá, marapuama, mulungu, noz-de-cola, tília e valeriana).

Embora a Farmacopeia Brasileira recomende a ausência de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* em produtos destinados à administração oral, pela preocupação de possível contaminação com aflatoxinas,

foi verificada a presença de outros isolados fúngicos conhecidos pela capacidade em produzir micotoxinas entre os oito gêneros detectados (apresentados em tom escuro na Figura 2), sendo esta ocorrência em conformidade com vários estudos realizados com drogas vegetais e fitoterápicos no Brasil¹³ e em outros países, como Egito, Índia, Nigéria, Croácia, Polônia, Portugal e Argentina¹³⁻¹⁵.

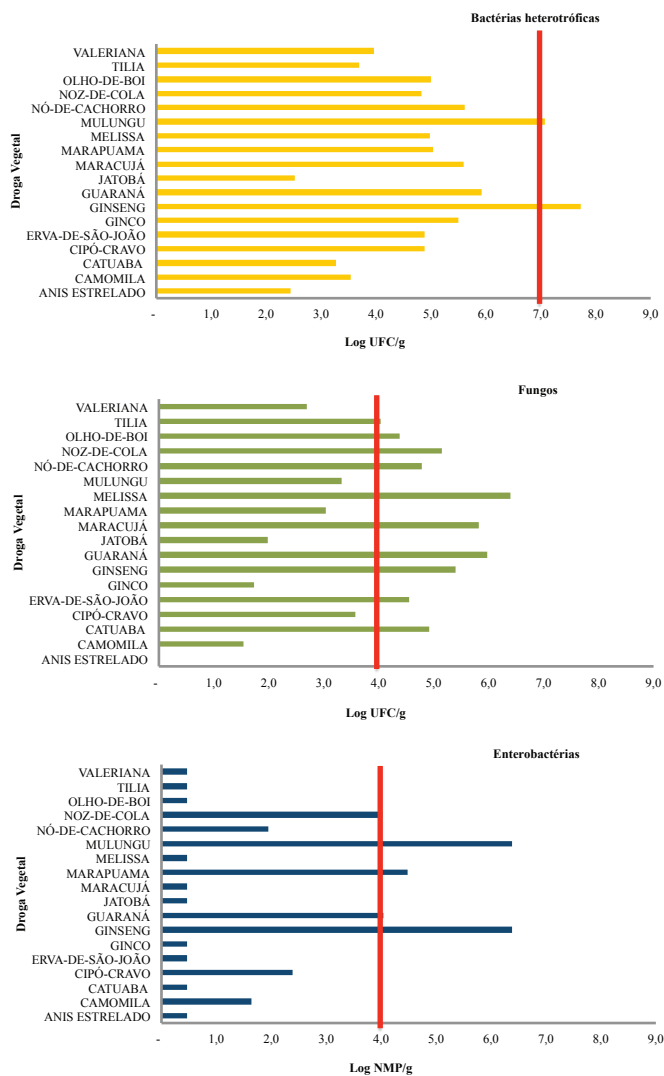


Figura 1. Carga microbiana verificada em amostras de drogas vegetais

Considerando que, na avaliação de risco de ocorrência de micotoxinas, a verificação da capacidade dos isolados fúngicos para a síntese destes compostos¹⁵ é mais significativa que apenas a identificação da espécie contaminante, foi avaliado o potencial toxigênico de todos os isolados dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*

– que corresponderam a 86% do total obtido neste estudo – quanto à produção de aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2), ocratoxina A e citrinina. Nenhum dos isolados demonstrou capacidade para produzir ocratoxina A ou citrinina e somente quatro (3,9%) dos isolados de *Aspergillus flavus* apresentaram capacidade de produzir aflatoxinas, dos quais três demonstraram capacidade para produzir somente aflatoxina B1 (isolados em cipó-cravo, marapuama e tília) e um apresentou potencial para produção de aflatoxinas B1 e B2 (isolado em erva-de-São-João).

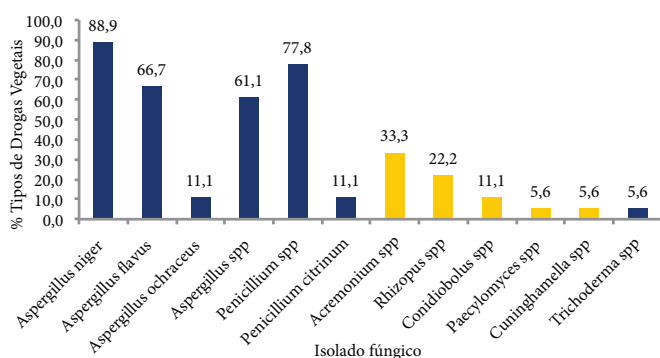


Figura 2. Frequência de drogas vegetais contaminadas em função do tipo de isolado fúngico detectado

Neste estudo, foram observadas que as condutas utilizadas pelos comerciantes na manipulação e acondicionamento dos produtos favoreciam a contaminação e desenvolvimento microbiano, com consequente perda da qualidade da matéria-prima, tais como: fracionamento para venda sendo realizado no próprio local, em área exposta e em geral próxima a vias com intenso tráfego de automóveis; drogas vegetais mantidas expostas ao ambiente; e falta de local adequado para estocagem, em geral mantidas no chão e expostas às condições climáticas – evidenciada pelos resultados obtidos e que expõem os consumidores destes produtos a riscos à saúde.

CONCLUSÃO

Fica evidente a necessidade da elaboração de políticas públicas voltadas à orientação e re-estruturação do comércio popular de drogas vegetais e fitoterápicos como forma de garantir o acesso seguro e eficaz a estes produtos, considerando a importância da medicina popular na promoção à saúde.

REFERÊNCIAS

1. Giveton SM, Liberman N, Klang S, Kahan E. Are people who use “natural drugs” aware of their potentially harmful side effects and reporting to family physician? *Patient Educ Couns*. 2004; 53:5-11.
2. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Farmacopéia Brasileira*. 5ª ed. Brasília: Editora Fiocruz; 2010.
3. Chan K. Some aspects of toxic contaminants in herbal medicines. *Chemosphere*. 2003;52:1361-71.
4. De Smet PAGM. Health risks of herbal remedies: an update. *Clin Pharmacol Ther*. 2004;76:1-17.
5. World Health Organization. *Quality control methods for medicinal plant materials*. Geneva: WHO Press; 1998.
6. World Health Organization. *WHO guidelines for assessing quality herbal medicines with reference to contaminants and residues*. Geneva: WHO Press; 2007.
7. Rhodehamel EJ, Harmon SM. *Bacillus cereus*. In: *Food and Drugs Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. Bacteriological Analytical Manual Online* [acesso em 15 abr 2011]. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov>.
8. Rapper KB, Fennel DI. *The genus Aspergillus*. Baltimore: The Williams and Wilkins Company; 1965.
9. Pitt JI. *The genus Penicillium*. Sidney: Academic Press Inc; 1979.
10. Lin MT, Dianese JC. A coconut-agar medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* spp. *Phytopathol*. 1976;66(12):1466-9.
11. Soares LMV, Rodriguez-Amaya DB. Survey of aflatoxins, ochratoxins A, zearalenone and sterigmatocistin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin layer chromatographic method. *J AOAC*. 1989;72:20-2.
12. World Health Organization. *Department of Mental Health and Substance Dependence. Noncommunicable Diseases and mental Health: Investing in Mental Health*. Geneva: WHO Press; 2003
13. Bugno A, Almodovar AAB, Pereira TC, Pinto TJA, Sabino M. Occurrence of toxigenic fungi in herbal drugs. *Braz J Microbiol*. 2006;37:47-51.
14. Rizzo I, Vedoya G, Maurutto S, Haidukowski M, Varsavsky E. Assessment of toxigenic fungi on Argentinean medicinal herbs. *Microbiol Res*. 2004;159(2):113-20.
15. Pitt JI, Basilico JC, Abarca ML, Lopez C. Mycotoxins and toxigenic fungi. *Med Mycol*. 2000;38(Suppl 1):41-6.

Análise epidemiológica das agressões causadas por animais e do tratamento antirrábico humano no período de janeiro de 1999 a dezembro de 2006

Epidemiological analysis on the aggression caused by animals and the human anti-rabies treatment, during the period from January 1999 to December 2006

RIALA6/1486

Daniel Friguglietti BRANDESPIM^{1*}, Gesika Maria da SILVA¹, José Wilton PINHEIRO JUNIOR¹, Maria Lucia Xavier de Barros VIANA², Maria Dulcineide Guilherme da ROCHA²

*Endereço para correspondência: ¹Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Av. Bom Pastor, s/n, Boa Vista, CEP 55296-901, Garanhuns, PE. Tel. e fax: (087) 3761-0882 / 9922-6242. E-mail: dbrandespim@terra.com.br ou daniel@uag.ufrpe.br

²V Gerência Regional em Saúde – V GERES, Garanhuns, PE. Recebido: 24.08.2011 - Aceito para publicação: 14.05.2012

RESUMO

A raiva é uma antropozoonose provocada pelo vírus do gênero *Lyssavirus*, família *Rhabdoviridae*, que pode infectar todos os mamíferos e, apesar de conhecida desde a antiguidade, ainda continua como problema de saúde pública em países em desenvolvimento. Neste trabalho, foi caracterizado e avaliado o atendimento antirrábico humano no município de Garanhuns (PE), realizado no período de 1999 a 2006, analisando-se as variáveis registradas no Sistema de Informação e Agravos de Notificação (Sinan). A análise mostrou a prevalência de agressões aos indivíduos do sexo masculino com idades entre um e 20 anos, causadas pela espécie canina durante momentos de lazer, e a maioria apresentou ferimentos únicos, profundos e localizados nas mãos e nos pés. Durante o período estudado, houve aumento no número de notificações. O tratamento foi indicado para 580 pacientes, porém, houve desistência de 32 deles. Este estudo evidenciou que é fundamental que as equipes de gerência local de saúde implementem cursos de treinamentos e de reciclagem dos profissionais quanto ao preenchimento da ficha de notificação e a importância do acompanhamento dos pacientes, bem como para fornecer esclarecimentos e orientação de seguimento adequado de tratamento profilático antirrábico aos usuários.

Palavras-chave. raiva, epidemiologia, tratamento antirrábico humano.

ABSTRACT

Rabies is an anthroozoonosis caused by rabies virus of *Lyssavirus* genre, *Rhabdoviridae* family, which can infect all mammals, and although it has been known since antiquity, it still remains a public health problem in developing countries. This study aimed at characterizing and evaluating the aggressions by animals and the human anti-rabies health assistance in the city of Garanhuns, PE, during the period from 1999 to 2006. For this purpose, the variables collected from the Disease Information and Surveillance System (SINAN) were analyzed. This survey evidenced the prevalence of aggression caused by dogs in male individuals aged from one and twenty years old, during leisure time, and the majority of them had one unique, deep and located injuries in hands and feet. Increase in the number of notifications occurred during the studied period, and the treatment was indicated to 580 patients, but 32 of them gave up. Considering the observed data, the local health managers should promote training and refresher courses to instruct the involved technicians over the issues related to the accurate data collection, the precise questionnaire filling in, the suitable patients follow-up, and to be skilled to orientate the patients to follow the complete anti-rabies prophylactic treatment procedure.

Keywords. rabies, epidemiology, human anti-rabies treatment.

INTRODUÇÃO

O homem convive com os animais, sejam eles de companhia, como os cães e gatos, ou os animais de produção, como ruminantes, suínos, entre outros animais de fazenda e, por meio desse convívio, podem se expor a vários micro-organismos responsáveis por doenças zoonóticas, tais como a leishmaniose, a raiva, a leptospirose, as salmoneloses, as parasitoses, entre outras¹.

Documentos históricos relatam que há quatro mil anos se faziam associações entre uma doença letal e a mordida de cães, caracterizando a raiva como uma das primeiras zoonoses². A raiva é uma antroponose viral de grande importância, pois, além de acometer todos os mamíferos, tem letalidade de aproximadamente 100%, e a transmissão ocorre por meio da inoculação do vírus rábico, que pertence à família *Rhabdoviridae*, do gênero *Lyssavirus*. Como fonte de infecção dentre os animais domésticos, a espécie canina é o principal responsável pela transmissão ao homem, principalmente por meio de mordeduras e, mais raramente, por arranhadura e lambidura de mucosas³. O vírus é neurotrópico, atinge o sistema nervoso central (SNC) e causa um quadro de encefalomielite aguda, decorrente de sua replicação entre os neurônios⁴.

Os sinais clínicos aparecem somente após o envolvimento do SNC, e a morte é consequente ao comprometimento de centros nervosos vitais⁵. No caso da raiva parálitica, os animais apresentam sinais como: ataxia, afastam-se dos outros animais, tenesmo, salivação excessiva, priapismo, movimentos de pedalagem e paralisia do sistema respiratório. Estes sinais são mais comuns nos animais de produção (bovídeos, pequenos ruminantes, equídeos e suínos). Já no caso da raiva furiosa, mais comum nos animais de companhia, como cães e gatos, pode-se observar espasmos musculares, fotofobia e salivação.

O vírus da raiva é mantido por ciclos inter-relacionados, são eles: o “ciclo urbano”, que refere-se à raiva em cães e gatos; o “ciclo silvestre aéreo”, que refere-se à raiva em morcegos; o “ciclo rural”, que envolve os animais de produção (ruminantes, pequenos ruminantes, equídeos, suínos), enquanto o “ciclo silvestre terrestre” refere-se à raiva associada a raposas, gato do mato, macacos e outras espécies silvestres⁵.

Quando a criação de cães e gatos é inadequada, surgem problemas de superpopulação nos grandes centros urbanos, que refletem na transmissão de doenças,

inclusive a raiva, necessitando da intervenção de serviços públicos para o controle⁶.

A distribuição da raiva não é obrigatoriamente uniforme, ou seja, observa-se áreas livres e áreas de baixa ou alta endemicidade. Países isolados, como Japão e Inglaterra, conseguiram erradicar a raiva pela maior facilidade no seu controle². Assim como alguns outros países das Américas, como Barbados, Jamaica e Ilhas do Caribe, e da Europa: Portugal, Espanha, Irlanda, Grã-Bretanha, Países Baixos e Bulgária⁴.

Entre 1980 e 2004, houve uma redução significativa no número de casos registrados de raiva humana, por ano, no Brasil, caindo de 173 para 30, o que representa uma queda de 83%. A maioria concentrada nas regiões Norte e Nordeste, responsáveis por 80% do total de casos do país⁷.

Em 2005, foram registrados 44 casos de raiva humana, sendo 17 na região Norte (todos no Pará); 26, na região Nordeste (24 casos no Maranhão; 1, no Ceará; e 1 em Sergipe) e um caso em Minas Gerais. Em 2006, foram notificados nove casos de raiva humana, dos quais seis foram transmitidos por cão (cinco no Maranhão e um, em Pernambuco); dois por morcegos de forma acidental (um em Alagoas e um, no Rio de Janeiro) e um por herbívoro em Minas Gerais⁸.

Durante o decênio 1997-2006 e a partir de 2003, houve um decréscimo dos casos de raiva canina e felina e a principal espécie associada às infecções foram os morcegos hematófagos⁵.

Ocorreu um decréscimo dos casos em humanos e animais a partir de 2006 até 2011, enquanto o número de pessoas que solicitam o atendimento nos postos de saúde procurando por atendimento antirrábico aumentou³. A causa do aumento desta procura pode estar relacionada a um maior número de pessoas com informações sobre o risco de contrair a doença e também a acessibilidade facilitada aos serviços que oferecem o tratamento⁹.

A prevenção da raiva humana é baseada no tratamento profilático antirrábico quando houver suspeita de exposição ao vírus¹⁰. O Programa Nacional de Profilaxia da Raiva (PNPR) foi criado no Brasil em 1973, com o objetivo de promover no país, atividades de combate à raiva humana através da prevenção da doença, do controle desta zoonose nos animais domésticos por meio da vacina canina antirrábica, captura de animais, além do tratamento específico das pessoas agredidas por animais raivosos ou suspeitos e vacinação das pessoas que estão expostas ao risco (veterinários, vacinadores,

biólogos e profissionais expostos ao risco de infecção), diagnóstico laboratorial, vigilância epidemiológica e educação em saúde⁹.

A profilaxia pós-exposição combina a limpeza criteriosa da lesão e a administração da vacina contra a raiva, isoladamente ou em associação com o soro antirrábico, sendo este o único meio disponível para evitar a morte do paciente infectado, desde que adequada e oportunamente aplicada¹¹.

No início da década de 1990, foi criado o Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN – tendo como objetivo a coleta e processamento dos dados sobre agravos de notificação em todo o território nacional, fornecendo informações para a análise do perfil da morbidade e, dessa forma, contribuindo para a tomada de decisões nos níveis municipal, estadual e federal¹².

Para isso, o aplicativo SINAN-DOS foi implantado em 1993, sendo concebido originalmente, para armazenar, a partir de instrumentos e códigos de acesso padronizados em nível nacional, as informações das doenças de notificação compulsória, coletadas pelas respectivas fichas de notificação e investigação e entre elas a ficha de atendimento antirrábico humano¹².

No entanto, foi somente em 1998, que o uso do SINAN foi regulamentado por meio de portaria ministerial, tornando obrigatória a alimentação da base de dados nacional pelos municípios, estados e Distrito Federal, designando a Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), por meio do extinto Centro Nacional de Vigilância Epidemiológica (CENEPI) – atualmente incorporado pela Secretaria de Vigilância em Saúde, do Ministério da Saúde –, como a gestora nacional do sistema¹².

O atendimento das pessoas agredidas no município de Garanhuns (PE) ocorre no Hospital Regional Dom Moura, nos dias úteis e feriados, onde são realizados os primeiros socorros e a aplicação da primeira dose da vacina (quando necessário), quando, então, o paciente é encaminhado pra continuar o tratamento nos Postos de Saúde da Família.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar a situação epidemiológica das agressões por animais ocorridas no município de Garanhuns – Estado de Pernambuco – bem como o tratamento antirrábico instituído por meio da análise de fichas de atendimento antirrábico (SINAN), no período de 1999 a 2006, visto que tal situação é inédita no município em estudo e poderá contribuir para um melhor atendimento à

comunidade pelas equipes médicas do serviço de saúde e um adequado planejamento aos gestores de saúde no que diz respeito ao tratamento profilático antirrábico.

MATERIAL E MÉTODOS

Os dados foram obtidos por meio de informações das Fichas de Investigação de Atendimento Antirrábico Humano da cidade de Garanhuns, registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN –, durante o período de janeiro de 1999 a dezembro de 2006, armazenados na V Gerência Regional de Saúde – V GERES.

As fichas analisadas foram preenchidas pelos funcionários do Setor de Profilaxia da Raiva Humana (agentes de saúde), bem como pelo corpo de enfermagem e médicos dos Postos de Saúde Familiar (PSF) ou hospitais particulares e encaminhadas à Secretaria de Saúde para inclusão no programa Epi-Info 6.0 – SINAN.

As informações colhidas foram as seguintes variáveis: mês do agravo; sexo e idade do agredido; local do acidente (mucosa, cabeça/pescoço, mãos/pés, tronco, membros superiores ou membros inferiores); tipo de acidente (mordedura, arranhadura ou lambadura); espécie do animal agressor; condição do animal (sadio, suspeito, desaparecido, raivoso, observável ou sacrificado); e condição de ocorrência da agressão (lazer, animal feroz ou animal com comportamento alterado); e indicação de tratamento profilático antirrábico.

Todas as informações colhidas do SINAN foram tabuladas em planilhas de dados do programa Excel e calcularam-se, então, as frequências relativas e absolutas das variáveis estudadas.

RESULTADOS

Das 580 fichas de atendimento antirrábico oriundas do município de Garanhuns (PE), no período de 1999 a 2006, observou-se que 333 agredidos (57%) pertenciam ao sexo masculino, enquanto 247 (43%), ao feminino, e, quanto à faixa etária, 255 vítimas (43,9%) entre um e 20 anos de idade.

Após a análise das fichas, verificou-se que, ao se estudar a variável condição de ocorrência, a mesma foi ignorada em 273 casos (47%), enquanto 146 acidentes (25%) ocorreram durante horas de lazer, 88 (15%) foram provocados por animais alterados e 73 (13%) tiveram como causa animais ferozes.

Conforme mostra a Tabela 1, a espécie canina foi a principal causadora das agressões, com 370 casos (63,7%), seguida das agressões por felinos com 153 casos (26,3%) e outras espécies com ocorrência de agressões em menor percentual, como primatas, raposas e morcegos. Quanto à condição do animal, pode-se observar, na Tabela 1, que 224 (38,6%) eram sadios e 154 (26,5%) sumidos ou desaparecidos, enquanto 120 casos (20,8%) foram ignorados, 57 (9,8%) passaram por observações, mas não foi definido seu estado, 15 (2,6%) foram eutanasiados e 10 (1,7%) foram comprovadamente raivosos.

Tabela 1. Distribuição segundo o número e porcentagem de espécies agressoras e condição do animal agressor de 580 pacientes expostos ao tratamento antirrábico, no município de Garanhuns – PE, do período de 1999 a 2006

Espécie agressora	Nº	%
Ignorado	21	3,7%
Canina	370	63,7%
Felina	153	26,3%
Primata	10	1,8%
Raposa	8	1,4%
Quiróptera	4	0,7%
Outra	14	2,4%
Condição do animal		
Ignorado	120	20,8%
Sadio	224	38,6%
Sumido / desaparecido	154	26,5%
Observável	57	9,8%
Sacrificado	15	2,6%
Raivoso	10	1,7%

Dos 580 acidentes, pode-se observar, na Tabela 2, que 336 (57,9%) dos ferimentos foram únicos, 208 (35,9%) foram múltiplos e em 36 casos (6,2%) a extensão do ferimento foi ignorada. Ainda na Tabela 2, foram identificados 597 ferimentos, dos quais 308 (51,6%) profundos, 232 (38,9%) superficiais e 57 (9,5%) dilacerantes. O número de ferimentos foi maior que o número de casos, porque em situações de múltiplos ferimentos os responsáveis pelo preenchimento selecionam mais do que uma variável. O tipo de exposição de maior ocorrência foi por meio de mordeduras, com 473 casos (77,6%), seguido de arranhaduras com 104 casos (17,0%). Foram acometidos principalmente as mãos e os pés, com 263 casos (39,6%), seguido dos membros inferiores com 177 casos (26,7%) e membros superiores com 102 casos (15,4%), conforme Tabela 2.

Tabela 2. Distribuição dos ferimentos segundo o número e porcentagem da extensão e profundidade, tipo e local do ferimento de 580 pacientes expostos ao tratamento antirrábico, no município de Garanhuns – PE, do período de 1999 a 2006

Extensão dos ferimentos	Nº	%
Ignorados	36	6,2%
Únicos	336	57,9%
Múltiplos	208	35,9%
Profundidade dos ferimentos* ^a		
Profundo	308	51,6%
Superficial	232	38,9%
Dilacerante	57	9,5%
Tipo de ferimento* ^b		
Mordedura	473	77,6%
Arranhadura	104	17,0%
Contato Direto	22	3,6%
Lambadura	11	1,8%
Local do ferimento* ^c		
Mãos e pés	263	39,6%
Membros inferiores	177	26,7%
Membros superiores	102	15,4%
Cabeça e pescoço	83	12,5%
Tronco	38	5,7%
Mucosas	1	0,1%

*^{a,b,c} O número total desses itens é 597, 610 e 664, respectivamente, pois há ferimentos múltiplos e associações das classificações, tipos de ferimentos e locais.

Em Garanhuns, o tratamento instituído em 392 atendimentos (67,7%) foi predominantemente pós-exposição, seguidos de 50 tratamentos de pré-exposição (8,7%) e 6 deles de re-exposição (1,2%) e ignorado em 132 (22,4%) casos. A vacina de cultivo celular foi utilizada em 394 casos (67,9%); a Fuenzalida e Palácios modificada em 30 (5,2%) casos, e o tratamento foi ignorado em 156 (26,9%) casos. Dos 580 atendimentos, ocorreu abandono em 35 (6,1%) casos, em 191 (32,9%) casos a situação foi ignorada, e em 354 (61,9%) casos completaram o tratamento. Devido à maior utilização das vacinas produzidas em cultivo celular, implantada no tratamento profilático no início dos anos 2000, observou-se pequeno número de reações adversas (cinco): duas locais, duas neurológicas e uma sistêmica.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Em relação às variáveis sexo e faixa etária, dados semelhantes encontrados neste trabalho também foram observados na pesquisa realizada em Jacarezinho (PR), que relatou em 54% de pacientes do sexo masculino e 46% do sexo feminino, enquanto a faixa etária mais

acometida (48%) foi entre 01 a 14 anos, confirmando que os acidentes ocorrem, portanto, durante as atividades de lazer com os animais¹³.

O fato de as atividades de lazer estarem associadas às agressões em humanos também foi verificado na análise das fichas de atendimento antirrábico no município de Garanhuns, assim como acidentes e agressões foram provocadas pela vítima em 580 casos (23,5%) e em sua maioria durante momentos de lazer (47,8%)³.

Os dados relativos à extensão (únicos), profundidade (superficial) e tipo (mordedura) do ferimento são semelhantes aos verificados por outros autores^{3,13,14}, porém em relação à localização do ferimento, diferem dos relatados por esses mesmos autores que descreveram que a maioria das agressões ocorreram em membros inferiores, contrariamente ao encontrado em Garanhuns (PE), que ocorreram a maioria em mãos e pés.

Quanto ao ano de exposição, houve maior procura pelo atendimento antirrábico em 2005 e 2006, provavelmente pelo fato de pessoas estarem mais esclarecidas e preocupadas com a raiva e outras zoonoses ou mesmo por uma melhoria na qualidade dos serviços de saúde e notificação de agravos.

Em relação ao período de ocorrência de agressões, enquanto em Garanhuns, observou-se que tal evento aconteceu principalmente nos meses de abril, janeiro e agosto, tais dados diferem de outros estudos que relatam maior ocorrência nos meses de março, julho, agosto e setembro^{13,14} ou maior frequência em julho, abril e dezembro¹³, porém, em todos os estudos, observa-se os meses de dezembro, janeiro e julho, períodos de férias, e provavelmente as agressões ocorram nos momentos de lazer com mais intensidade.

Diante das análises realizadas, durante o período de 1999 a 2006, apesar do aumento no número de notificações dos acidentes por animais e do tratamento antirrábico indicado pelo Serviço de Saúde na cidade de Garanhuns, observou-se também uma falha no preenchimento das fichas de notificação do SINAN, indicando que as equipes de gerência local de saúde devem realizar treinamento e reciclagem junto às suas equipes de saúde pública para maior conscientização sobre a importância do preenchimento correto das mesmas, visando a um melhor aproveitamento dos dados para o estudo epidemiológico das agressões por animais e posterior instituição do tratamento antirrábico, quando realmente necessário.

Mesmo não havendo casos humanos de raiva durante o período estudado, as equipes de saúde devem realizar a busca ativa dos faltosos nos tratamentos antirrábicos indicados, devido ao percentual de tratamentos abandonados e casos ignorados, além da implantação permanente de programas educativos sobre a guarda responsável dos animais junto à comunidade, enfatizando principalmente informações sobre prevenção e procedimentos a serem tomados após a agressão por animais domésticos, além da importância do tratamento antirrábico.

REFERÊNCIAS

1. Instituto Pasteur. Educação e promoção da saúde no programa de controle da raiva. 2. ed. São Paulo; 2000 (Manual do Instituto Pasteur, n. 5).
2. Belotto AJ. Situação epidemiológica da raiva: panorama mundial. Simpósio Internacional Programa de Treinamento controle de zoonoses e as interações homem-animal; 2001 [anais SP].
3. Fortes FS, Wouk AFPE, Biondo AW, Barros CC. Acidentes por mordeduras de cães e gatos no município de Pinhais, Brasil de 2002 a 2005. *Rev Arc Vet Sci*. 2007;12(2):16-24.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. 5. ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2002. v. 2.
5. Batista HB, Carvalho R, Franco AC, Roehle PM. Raiva: uma breve revisão. *Rev Acta Sci Vet*. 2007;35(2):125-44.
6. Instituto Pasteur. Controle da população de animais de estimação. 2. ed. São Paulo; 2000 (Manual do Instituto Pasteur n. 6).
7. Brasil. Ministério da Saúde. Indicadores de morbidade e fatores de risco. D.1.7 Incidência da raiva humana. Brasília, DF, 2006. [disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude>].
8. Brasil. Ministério da Saúde. Raiva: Situação da doença no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde; 2004.
9. Schineider MC, Souza LM, Moraes NB, Diaz RC. Controle da raiva no Brasil de 1980 a 1990. *Rev Saúde Publica*. 1996;30(2):196-203.
10. Rigo L, Honer MR. Análise da profilaxia da raiva humana em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, 2002. *Cad Saúde Publica*. 2005;21(6):1939-45.
11. Instituto Pasteur. Profilaxia da raiva humana. 2. ed. São Paulo; 2000 (Manual do Instituto Pasteur n. 4).
12. Laguardia J, Domingues CMA, Carvalho C, Lauerman CR, Macario E, Glatt R. Sistemas de Informação de Agravos de Notificação (Sinan): Desafios no desenvolvimento de um sistema de informação em saúde. *Rev Epidemiol Serv Saúde*. 2003;13(3):135-47.
13. Rolim RLP, Lopes FMR, Navarro IT. Aspectos da vigilância epidemiológica da raiva no município de Jacarezinho, Paraná, Brasil. *Rev Ciênc Agrár*. 2006;27(2):271-80.
14. Filgueira AC, Cardoso MD, Ferreira LOC. Profilaxia antirrábica humana: uma análise exploratória dos atendimentos ocorridos em Salgueiro-PE, no ano de 2007. *Rev Epidemiol Serv Saúde*. 2011;20(2):233-44.

Estudo da administração de ácidos graxos poli-insaturados no condicionamento com cocaína em camundongos

Eserian JK. **Study of the effects of polyunsaturated fatty acids on cocaine-conditioned place preference in mice.** São Paulo, SP, 2011. [Dissertação de Mestrado - Área de Concentração: Medicina e Sociologia do Abuso de Drogas, Departamento de Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo, Campus de São Paulo - UNIFESP]. Orientador: José Carlos Fernandes Galduróz. Co-orientadora: Monica Levy Andersen

O aumento da neurotransmissão dopaminérgica tem sido ligado à euforia produzida pela cocaína. Estudos pré-clínicos demonstraram que a modificação da composição de ácidos graxos poli-insaturados na dieta pode influenciar o nível de neurotransmissão. Evidências de estudos básicos sugerem que os ácidos graxos poli-insaturados da série ômega 3 poderiam ter um papel no abuso de drogas através de suas ações nos sistemas serotoninérgico e dopaminérgico centrais, os quais têm um papel importante nos mecanismos de recompensa. O objetivo do estudo foi verificar se a administração de ácidos graxos poli-insaturados provoca alteração na preferência condicionada por lugar por cocaína, correlacionando os dados comportamentais com os níveis plasmáticos de ácidos graxos poli-insaturados. Utilizou-se como fonte de ácidos graxos poli-insaturados o óleo de linhaça, rico em ômega 3 e ômega 6. Foram utilizados 5 grupos de camundongos C57Bl/6J suplementados com óleo de linhaça ou solução controle por 19 dias, condicionados com cocaína ou salina. Realizou-se o teste de preferência condicionada por lugar para se avaliar a eficácia do tratamento com os ácidos graxos poli-insaturados. Executou-se uma extração dos lipídeos totais a partir do plasma, havendo uma reação de derivatização dos ácidos graxos posteriormente. Os ácidos graxos foram separados em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) através de uma coluna analítica C18 de fase reversa, sendo os mesmos detectados através de um detector de fluorescência. Os resultados foram submetidos à análise de variância de duas vias e ao teste de Newman-Keuls, utilizando-se o programa Statistica versão 7.0. Os resultados demonstraram que os ácidos graxos poli-insaturados não exerceram efeito protetor contra o comportamento relacionado ao condicionamento com cocaína. O perfil lipídico dos animais condicionados com cocaína apresentou diferenças estatísticas significativas quando comparado aos animais não condicionados com cocaína quando ambos foram suplementados com ácidos graxos poli-insaturados, tendo sido observadas alterações significativas dos níveis de ácido eicosapentaenóico e ácido linoléico entre os grupos. Em conjunto, esses dados sugerem que os ácidos graxos poli-insaturados podem estar relacionados ao condicionamento com cocaína.

Palavras-chave. ácidos graxos poli-insaturados, cocaína, cromatografia líquida de alta eficiência, preferência condicionada por lugar, óleo de linhaça, abuso de drogas.

Dissertação disponível na Biblioteca do
Departamento de Psicobiologia da
Universidade Federal de São Paulo, Campus de São Paulo.
E-mail: jkeserian@ial.sp.gov.br

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 (*key words*).

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 (*key words*).

▪ 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 (*key words*).

▪ 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 (*key words*).
- 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 (*key words*).
- 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/key words: 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



ISSN 0073-9855

