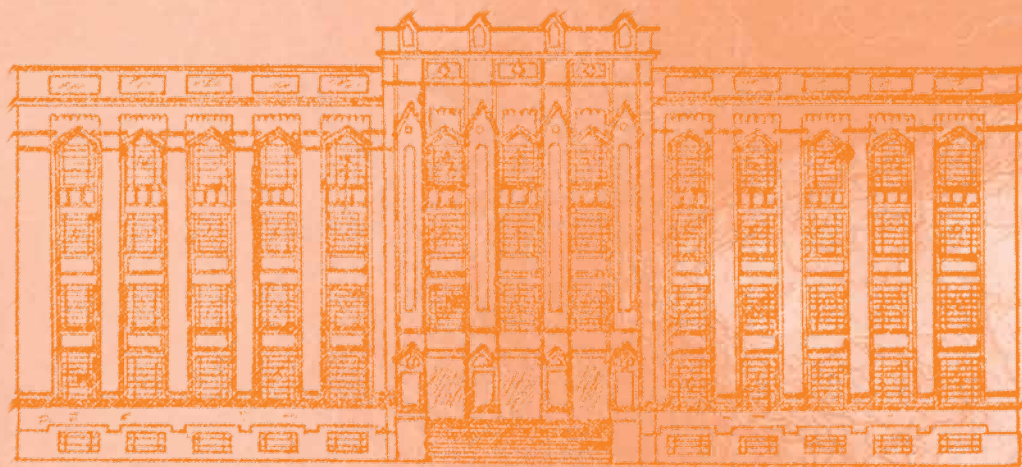


REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

ISSN 0073-9855
RIALA6



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE

Volume 70 número 4, 2011



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

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Volume 70 número 4, 2011
Outubro - Dezembro 2011

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

Diretor Geral do Instituto Adolfo Lutz

Editor Chefe

Adriana Bugno

Editor Adjunto

Luis Fernando de Macedo Brígido

Editores Assistentes

Christiane Asturiano Ristori Costa

Jacqueline Tanury Macruz Peresi

Lucile Tiemi Abe Matsumoto

Márcia Liane Buzzo

Maria Helena Iha

Maria Helena Martini

Miriam Solange Fernandes Caruso

Neuza Kasumi Shirata

Raquel dos Anjos Fazioli

Núcleo de Acervo

Rocely Aparecida Bueno Moita

Conselho Editorial / Editorial Board

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

Alexandre Januário da Silva, Atlanta, EUA.

Antonio Ruffino Netto, Ribeirão Preto, Brasil.

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

Delia Rodrigues Amaya, Campinas, Brasil.

Elizabeth de Souza Nascimento, São Paulo, Brasil.

Elizabeth Castañeda, Bogotá, Colômbia.

Eliseu Alves Waldman, São Paulo, Brasil.

Fernando C. Schmitt, Porto, Portugal.

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

Guilherme Prado, Belo Horizonte, Brasil.

Hans P. van Egmond, Bilthoven, Holanda.

Heitor Franco de Andrade Junior, São Paulo, Brasil.

John Gilbert, York, UK.

Juan Carlos Palomino, Antuérpia, Bélgica.

Lígia Bicudo de Almeida Muradian, São Paulo, Brasil.

Luz Elena Cano Restrepo, Medellín, Colômbia.

Maria José Mendes Gianini, Araraquara, Brasil.

Marluce Bibbo, Pennsylvania, EUA.

Martin Emilio Munk, Copenhague, 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
2011, 70(4)

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

Apoio:



Rev Inst Adolfo Lutz. 2011; 70 (4)

■ ARTIGO DE REVISÃO/ REVIEW ARTICLE

- 1396 Tendências em validação de métodos de ensaios qualitativos**
Trends in implementing the validation of qualitative methods of analysis
Carina de Souza GONDIM, Roberto Gonçalves JUNQUEIRA, Scheilla Vitorino Carvalho de SOUZA 433-447
- 1397 Metodologia analítica para determinação de resíduos de tetraciclinas em leite: uma revisão**
Analytical methodology for determination of tetracyclines residues in milk: a review
Carolina Kato PRADO, Miguel MACHINSKI JUNIOR..... 448-456
- 1398 *Chlamydia trachomatis* e suas implicações na reprodução humana**
The effects of *Chlamydia trachomatis* on human reproduction
Antonio Sérgio VALLADÃO, Carolina Marques da Silva Procópio COSTA,
Jocelito Alves de CAMARGO, Veronica Cristina Gomes SOARES..... 457-462
- ARTIGO ORIGINAL/ORIGINAL ARTICLE
- 1399 Rotulagem de alimentos: avaliação da conformidade frente à legislação e propostas para a sua melhoria**
Food labeling: conformity evaluation with legislation and proposals for improvements
Ana Carolina de Lima SMITH, Ligia Bicudo de ALMEIDA-MURADIAN..... 463-472
- 1400 Caracterização de leite em pó, soro de leite em pó e suas misturas por eletroforese em gel de poliacrilamida**
Characterization of milk powder, whey powder and its blends by polyacrylamide gel electrophoresis
Felippe Macedo MARQUES, Jaqueline Flaviana Oliveira de SÁ, Marcelo Cerqueira dos SANTOS,
Marta Fonseca MARTINS, Marco Antonio Moreira FURTADO..... 473-479
- 1401 Mycological analysis of *ambrosia* and creamy *dulce de leche***
Análise micológica de *ambrosia* e doce de leite pastoso
Nathalie Almeida LOPES, Kélia Della Vechia SCARABELOT, Patrícia da Silva NASCENTE,
Helenice de Lima GONZALEZ, Priscila Alves DIAS, Cláudio Dias TIMM 480-483
- 1402 Avaliação do teor de retinol em leite UHT suplementado em conformidade com a rotulagem**
Assessing the retinol concentration in supplemented UHT milk and the compliance with the information on the product label
Mayara Santa Rosa LIMA, Larissa Queiroz de LIRA, Roberto DIMENSTEIN 484-488
- 1403 Elaboração de iogurte com leite caprino e geleia de frutas tropicais**
Development of a goat milk yogurt flavored with tropical fruits
Rita de Cássia Ramos do Egypto QUEIROGA, Yasmim Regis Formiga de SOUSA, Márcia Gabrielle Ferreira da SILVA,
Maria Elieidy Gomes de OLIVEIRA, Heloisa Maria Holtz SOUSA, Carlos Eduardo Vasconcelos de OLIVEIRA 489-496

1404	Avaliação de contaminantes inorgânicos (As, Cd, Cr, Hg e Pb) em espécies de peixes Inorganic contaminants (As, Cd, Cr, Hg and Pb) in fish species Marcelo Antonio MORGANO, Ana Paula Ferreira de OLIVEIRA, Luana Cristina RABONATO, Raquel Fernanda MILANI, Juliana Parreira VASCONCELLOS, Cassia Neves MARTINS, André Lee CITTI , Evelise Oliveira TELLES, Simone de Carvalho BALIAN	497-506
1405	Efeito dos diferentes métodos de cocção sobre os teores de nutrientes em brócolis (<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>italica</i>) Effect of different cooking methods on the nutrient contents in broccoli (<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>italica</i>) Natália Elizabeth Galdino ALVES, Laura Ribeiro de PAULA, Aureliano Claret da CUNHA, Cláudia Antônia Alcântara AMARAL, Maria Tereza de FREITAS	507-513
1406	Aproveitamento da farinha de casca de mandioca na elaboração de pão de forma Utilization of cassava peel flour for preparing loaf bread Divina Aparecida Anunciação VILHALVA, Manoel Soares SOARES JÚNIOR, Camila Melo Araújo de MOURA, Márcio CALIARI, Thaísa Anders Carvalho SOUZA, Flávio Alves da SILVA	514-521
1407	Avaliação química, física e sensorial de conserva de anchóita (<i>Engraulis anchoita</i>) em molho com tomate Chemical, physical and sensorial characteristics of canned anchovy (<i>Engraulis anchoita</i>) preserved in tomato sauce Janise Pedroso COLEMBERGUE, Nádia CARBONERA, Milton Luiz Pinho ESPIRITO SANTO	522-527
1408	Dinâmica microbiana em contrafilés bovinos embalados a vácuo: sistemas de terminação e tempo de estocagem Microbial dynamics in the vacuum-packaged meat cuts: production system and storage time Camila Silveira de MELO, Albenones José de MESQUITA, Cíntia Silva MINAFRA-REZENDE, José Carlos SERAPHIN, Marinna Barros de OLIVEIRA, Cláudia Peixoto BUENO	528-533
1409	Processamento e avaliação da qualidade de licor de açaí (<i>Euterpe oleracea</i> Mart.) Processing and quality evaluation of açai liqueur (<i>Euterpe oleracea</i> Mart.) Emanuel Neto Alves de OLIVEIRA, Dyego da Costa SANTOS.....	534-541
1410	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>: ocorrência e suscetibilidade aos agentes antimicrobianos de isolados de amostras de água tratada utilizada em solução de diálise <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : occurrence and antimicrobial susceptibility of bacteria isolates from treated water samples used in the dialysis solution Jacqueline Tanury Macruz PERESI, Ivete Aparecida Zago Castanheira de ALMEIDA, Inara Siqueira de Carvalho TEIXEIRA, Sonia Izaura de LIMA E SILVA, Elisabete Cardiga ALVES, Denise Fusco MARQUES, Aparecida Klai RIBEIRO.....	542-547
1411	Ocorrência de <i>Cronobacter</i> spp. (<i>Enterobacter sakazakii</i>) em alimentos infantis adquiridos em um hospital público Occurrence of <i>Cronobacter</i> spp. (<i>Enterobacter sakazakii</i>) in infant food purchased in a public hospital Luciana Giorgetti FREITAS, Christiane Asturiano RISTORI, Miyoko JAKABI, Ana Maria Ramalho de PAULA, Ruth Estela Gravato ROWLANDS	548-553
1412	Qualidade microbiológica de ricotas comerciais e os riscos associados à presença de <i>Listeria monocytogenes</i> Microbiological quality of marketed ricotta cheese and disease risks associated with <i>Listeria monocytogenes</i> contamination Luciana Maria Ramires ESPER, Dirce Yorika KABUKI, Arnaldo Yoshiteru KUAYE.....	554-559
1413	Microbiological quality of pre-cooked seafood marketed in Santa Catarina Island, Brazil Qualidade microbiológica de frutos do mar pré-cozidos comercializados na Ilha de Santa Catarina, Brasil Roberta Juliano RAMOS, Andréia CIROLINI, Helen Silvestre da SILVA, Leticia Adélia MIOTTO, Marília MIOTTO, Cleide Rosana Werneck VIEIRA.....	560-565

- 1414 **Staphylococcus coagulase-positiva e enterobactérias em camarão *Litopenaeus vannamei* comercializado in natura**
Coagulase-positive staphylococci and enterobacteria in fresh shrimp *Litopenaeus vannamei*
Renata Albuquerque COSTA, Bruno Átila Batista MOREIRA, Fátima Cristiane Teles de CARVALHO,
Francisca Gleire Rodrigues MENEZES, Camila Magalhães SILVA, Regine Helena Silva dos Fernandes VIEIRA 566-571
- 1415 **Alimentos comercializados nas escolas e estratégias de intervenção para promover a alimentação escolar saudável: revisão sistemática**
Food sold at schools and the intervention strategies for promoting healthy nourishments at schools: a systematic review
Cristine Garcia GABRIEL, Gabriela Dalsasso RICARDO, Francisco de Assis Guedes de VASCONCELOS, Arlete Catarina Tittoni CORSO,
Maria Alice Altenburg de ASSIS, Patrícia Faria Di PIETRO 572-583
- 1416 **Caracterização de *Staphylococcus coagulase-positiva* utilizando plasmas de diferentes espécies animais**
Characterization of coagulase-positive *Staphylococcus* by using plasmas from different animal species
Geraldo Márcio da COSTA, Ulisses de Pádua PEREIRA, Dircéia Aparecida da Costa CUSTÓDIO, Nivaldo da SILVA 584-588
- 1417 **Avaliação da atividade antibacteriana in vitro de extratos hidroetanólicos de plantas sobre *Staphylococcus aureus* MRSA e MSSA**
Evaluation of *in vitro* antibacterial activity of hydro ethanol from vegetable extracts against MRSA and MSSA *Staphylococcus aureus*
Cristiano Sanches GARCIA, Suely Mitoi Ykko UEDA, Lycia Mara Jenné MÍMICA 589-598
- 1418 **Detecção de sibutramina e metoclopramida em alimentos para atletas**
Sibutramin and metoclopramid detection in foods for athletes
Helena Miyoco YANO, Rita Cristina Agostinho GUARDIA, Mariangela Tirico AURICCHIO 599-605
- 1419 **Controle da qualidade de vacinas contra febre amarela utilizadas no Programa Nacional de Imunizações do Brasil**
Quality control for yellow fever vaccines used in the Brazilian National Immunization Program
Eduardo Jorge Rabelo NETTO, Karen FRIEDRICH, Katia Christina LEANDRO, Isabella Fernandes DELGADO 606-612
- 1420 **Aplicação do conceito do erro total na validação do ensaio de potência da vacina oral contra a Poliomielite**
Use of the total error approach for the validation of the potency assay for oral Poliomyelitis vaccine
Jarbas Emílio dos SANTOS, Michele Cardoso do NASCIMENTO, Patrícia Alves dos SANTOS,
Ana Cristina de Almeida NOGUEIRA, Wlamir Corrêa de MOURA 613-621
- 1421 **Isolamento de micobactérias provenientes de amostras clínicas da região de Rio Claro: análise da frequência**
Mycobacterial isolates from patients clinical samples from Rio Claro region: frequency analysis
Ariane Christine Degasperri BERTOLETTI, Kaizer José Ferreira ALVES, Erica CHIMARA, Dalva Cristina Girello AILY 622-630
- COMUNICAÇÃO BREVE/BRIEF COMMUNICATION
- 1422 **Detecção de *Salmonella* spp. em mexilhões *Perna perna* dos bancos naturais de baía densamente urbanizada**
Salmonella spp. detection in brown mussels *Perna perna* from natural sea beds of a densely urbanized bay
Estevão de Camargo PASSOS, Ana Ruth Pereira de MELLO, Cícero Vagner de SOUSA, Maria Aparecida OLIVEIRA,
Luiz Miguel CASARINI, Nathalia de Sousa MOTTA, Marcelo Barbosa HENRIQUES, Ingrid Cabral MACHADO,
Veridiana Vera DE ROSSO, Irma Nelly Gutierrez RIVERA 631-636
- 1423 **Avaliação da unidade analítica na detecção de *Salmonella* spp. em frangos a varejo**
Evaluation of the analytical unit for detecting *Salmonella* spp. in poultry at retail
Ricardo Seiti YAMATOIGI, Julia Arantes GALVÃO, Eduardo Delbon BALDINI, Luiz Carlos Teixeira de SOUZA JUNIOR,
Marianna Vaz RODRIGUES, José Paes Almeida Nogueira PINTO 638-640

1424	Qualidade do óleo de palma bruto (<i>Elaeis guineensis</i>): matéria-prima para fritura de acarajés	
	The quality of crude palm oil (<i>Elaeis guineensis</i>): raw material for deep-frying acarajés	
	Fabiana Martins CURVELO, Deusdélia Teixeira de ALMEIDA, Itaciara Larroza NUNES, Sabrina FEITOSA	641-646
■ NOTA CIENTÍFICA/ SCIENTIFIC NOTE		
1425	Microbiological quality of organic and conventional tomatoes	
	Qualidade microbiológica de tomate convencional e orgânico	
	Sila Mary Rodrigues FERREIRA, Renato João Sossela de FREITAS, Cesar Aparecido da SILVA,	
	Elisa Noemberg Lazzari KARKLE, Thaís Carolina Bassler MAIA.....	647-650
■ RESUMOS DE TESES E DISSERTAÇÕES		
	Avaliação higiênico-sanitária, através de análises microbiológicas, de alimentos produzidos e comercializados em uma grande rede de hipermercados em Salvador- BA	
	Evaluation of the hygienic-sanitary, through microbiological analyzes, of foods produced and sold in the retail market in a large hypermarket chain in Salvador (Bahia, Brazil)	
	Silva, AS.....	651
	Produção de monoacilgliceróis e diacilgliceróis ricos em ácidos graxos ômega-3 a partir da glicerólise enzimática de óleo de peixe	
	Production of monoacylglycerols and diacylglycerols rich in omega-3 fatty acids by means of enzymatic glycerolysis of fish oil	
	Feltes, MMC	652
■ ERRATA		
		653
■ COLABORADORES		
		654-660
■ INSTRUÇÕES AOS AUTORES.....		
		661-666

Tendências em validação de métodos de ensaios qualitativos

Trends in implementing the validation of qualitative methods of analysis

RIALA6/1396

Carina de Souza GONDIM, Roberto Gonçalves JUNQUEIRA, Scheilla Vitorino Carvalho de SOUZA*

* Endereço para correspondência: Laboratório de Bromatologia/Unidade de Pesquisa Análise de Alimentos, Departamento de Alimentos - ALM, Faculdade de Farmácia - FAFAR, Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, Av. Antônio Carlos 6627, Campus da UFMG, Pampulha, CEP 31.270-010, Belo Horizonte, MG, Brasil. E-mail scheilla@bromatologiaufmg.com.br.
Recebido: 28.04.2011 - Aceito para publicação: 28.06.2011

RESUMO

A crescente importância das análises qualitativas e a necessidade de confiabilidade dos resultados analíticos para subsidiar as tomadas de decisões nos diversos setores da cadeia produtiva de alimentos são inquestionáveis, acarretando impactos na saúde pública, na economia e nos direitos do consumidor. Contudo, a validação desses métodos tem sido um ponto crítico na implantação de sistemas de gestão da qualidade e nos processos de acreditação de laboratórios. Apesar da existência de protocolos bem estabelecidos para validação de métodos quantitativos, ainda existe uma lacuna no desenvolvimento de abordagens para a implementação da metrologia em análises qualitativas. Neste contexto, o presente trabalho apresenta uma discussão sobre o tema validação de métodos qualitativos, abrangendo definições, delineamento experimental e análise de dados para avaliação dos parâmetros de desempenho aplicáveis como taxas de falsos resultados, taxa de confiabilidade, taxa de seletividade, taxa de sensibilidade, limite de detecção, região de perda de confiabilidade, acórdância, concordância e robustez.

Palavras-chave. validação intralaboratorial, método de ensaio qualitativo, parâmetros de desempenho.

ABSTRACT

The growing importance of qualitative analysis and the need for reliable analytical results in order to support the decision making at various sectors of food chain are unquestionable, with impacts on the economy, public health and consumer rights. However, the validation of these methods has been a critical point in the quality management systems implementation, and also in the processes for laboratory accreditation. In spite of the existence of well-established protocols for the validation of quantitative methods, there is a gap in the development of approaches for the implementation of metrology in the qualitative analysis. In this context, this paper deals with the validation of qualitative methods, including definitions, experimental design, and analysis of results for evaluating the applicable performance parameters, such as false response rates, reliability, selectivity, sensitivity, detection limit, region of unreliability, accordance, concordance and robustness.

Keywords. in-house validation, qualitative methods, performance parameters.

INTRODUÇÃO

A área de análise de alimentos é norteadada por uma crescente demanda de métodos de ensaio. Os constantes avanços tecnológicos na produção, processamento, embalagem e armazenamento de alimentos, trazem para o cotidiano dos laboratórios questões como análises de aditivos, migrantes de embalagens, contaminantes, resíduos de agrotóxico e medicamentos veterinários, adulterantes, indicadores de origem geográfica e organismos geneticamente modificados¹.

Além dos desafios decorrentes da diversidade e contínua evolução do setor de alimentos, os laboratórios especializados na análise desses produtos, necessitam demonstrar competência técnica para os ensaios que realizam², assegurando confiabilidade e comparabilidade dos resultados, os quais, na maioria das vezes, subsidiam as tomadas de decisão relativas aos aspectos econômicos, de saúde pública³ e de defesa do consumidor.

A importância das informações qualitativas vem crescendo entre laboratórios⁴ e, em diversos setores da cadeia produtiva de alimentos, métodos qualitativos têm sido frequentemente selecionados para triagens, por fornecerem resultados rápidos, objetivos, com baixo custo, simplicidade e minimização de erros, devido ao menor intervalo entre amostragem e análise^{5,6}.

No contexto de implementação de sistemas de gestão da qualidade e acreditação², a validação de métodos qualitativos tem representado um importante gargalo para o reconhecimento da competência de laboratórios de análise de alimentos^{7,8}. Apesar de haver protocolos estabelecidos sobre validação de métodos quantitativos, alguns autores apontam que pouca atenção tem sido dada para os métodos qualitativos^{6,8,9}.

Os principais documentos orientativos relacionados à validação de métodos, tanto nacionais¹⁰ quanto internacionais¹¹⁻¹³, não estão harmonizados e não detalham os principais parâmetros de desempenho e experimentos aplicáveis à validação de métodos qualitativos, o que tem gerado grande dificuldade na estruturação de procedimentos de validação adequados para esse tipo de método.

Em muitos casos, a aplicação dos princípios metroológicos tradicionais não é apropriada aos métodos qualitativos, o que denota a necessidade do desenvolvimento e da implementação de novas estratégias de garantia de confiabilidade adequadas a tais métodos^{14,15}. Embora muitos conceitos estejam

implícitos nas atividades da química analítica qualitativa desde seus primórdios, eles somente surgiram na literatura especializada recentemente, impulsionados pela organização e regulamentação metroológica internacional¹⁶.

Diante do exposto, consideramos neste trabalho os recentes desenvolvimentos conceituais e práticos relacionados à metrologia e validação de métodos qualitativos, visando fornecer uma referência no campo das ciências analíticas que possa ser utilizada para a construção do conhecimento que atenderá à atual demanda por respostas binárias confiáveis.

MÉTODOS DE ENSAIO QUANTITATIVOS E QUALITATIVOS

Os métodos de ensaio podem ser classificados em métodos quantitativos e qualitativos. Métodos quantitativos são definidos como aqueles que determinam a quantidade de determinado analito em uma amostra em valores numéricos de uma unidade de medida apropriada^{12,17}. Enquanto os métodos qualitativos são aqueles que permitem a identificação do analito com base em suas propriedades físicas, químicas ou biológicas¹². Nas análises qualitativas, a resposta binária pode vir por meio de um instrumento de medida, de *kits* de testes, que envolvem mudanças sensoriais, ou outros⁵.

Nas últimas décadas, as análises qualitativas foram consideradas em declínio no campo da ciência analítica por estarem relacionadas com identificações que utilizavam reações químicas tendo os sentidos humanos como detectores. O fato da análise instrumental também fornecer uma resposta qualitativa confiável, em adição à resposta quantitativa, significava que a análise qualitativa não estava longe do desuso. Contudo, testes qualitativos baseados em reações bioquímicas, enzimáticas e imunológicas abriram novas perspectivas para esse tipo de determinação, devido principalmente à simplicidade e confiabilidade. Nesse contexto, muitos fabricantes vêm desenvolvendo *kits* de testes altamente confiáveis para uma ampla variedade de combinações de analitos-matrizes nas mais diversas áreas de aplicação, de forma que as respostas binárias têm adquirido uma crescente importância^{14,15}.

Embora seja uma tendência, da química analítica moderna, o desenvolvimento de novas técnicas e de métodos confiáveis para identificação e quantificação de componentes em matrizes complexas relacionadas à

segurança alimentar, como técnicas acopladas, incluindo cromatografia e espectrometria de massas ou outras técnicas espectroscópicas, essas poderosas ferramentas envolvem investimentos consideráveis e requerem analistas altamente capacitados. Do ponto de vista prático, muitos usuários têm reconsiderado até que ponto é realmente necessário obter resultados quantitativos⁶. Na rotina dos laboratórios, muitas vezes torna-se inviável o processamento de milhares de amostras por métodos convencionais¹⁵, sendo adotada uma primeira etapa para determinação da presença de um ou mais analitos (métodos de vanguarda/triagens) e uma segunda etapa para estimativa do nível de concentração dos mesmos (métodos de retaguarda/confirmação e quantificação). Assim, os métodos qualitativos têm sido comumente empregados para triagens antes da confirmação e quantificação, devido ao tempo e custo analítico reduzidos desses métodos⁶.

CLASSIFICAÇÃO DE MÉTODOS QUALITATIVOS

Os métodos qualitativos podem ser: identificação de analitos ou classificação de amostras. A identificação de analitos, por meio de técnicas analíticas modernas, tem sido muito utilizada. Por outro lado, as análises qualitativas de classificação têm como objetivo fornecer uma classificação de amostras rápida e confiável, em níveis de critérios previamente estabelecidos. As análises qualitativas podem ser implementadas pelo uso de ferramentas analíticas, podendo utilizar sistemas como os *kits* de testes, que produzem resultados binários sem nenhum tratamento de dados, ou sistemas baseados em técnicas analíticas, que fornecem dados brutos e requerem um tratamento posterior para sua conversão em resposta binária. O primeiro grupo é mais usado para a classificação de amostras, enquanto o segundo é mais apropriado para a identificação de analitos¹⁸.

Outras classificações são propostas para os métodos qualitativos. Com base na técnica classificam-se em químicos, físico-químicos, bioquímicos ou biológicos¹⁹, diferenciam-se de acordo com o estado físico da amostra em sólido, líquido ou gasoso²⁰ ou ainda com o sistema de detecção em sensorial ou instrumental^{16,20}. A principal característica dos métodos qualitativos baseados em detecção sensorial é que o sentido humano é utilizado para registro e interpretação da resposta. Os métodos baseados na detecção instrumental fornecem respostas instrumentais que, em muitos casos, são

medidas de absorvância embora, em princípio, qualquer instrumento possa ser utilizado. Em uma abordagem metrológica, os métodos binários instrumentais distinguem-se em instrumentais baseados em sinais univariados e instrumentais baseados na identificação de características específicas¹⁴. Os métodos instrumentais baseados em sinais univariados são basicamente métodos quantitativos utilizados como métodos qualitativos. Desse modo, o resultado final é obtido pela comparação entre as respostas de duas amostras, sendo que uma das amostras contém o analito de interesse em um nível de concentração determinado. Os métodos instrumentais baseados na identificação de características específicas são multiparamétricos, ou seja, a resposta analítica depende de vários parâmetros envolvidos na análise e a identificação dos compostos está baseada, por exemplo, no tipo ou na presença de compostos críticos da amostra.

VALIDAÇÃO DE MÉTODOS QUALITATIVOS

A Norma ISO/IEC 17025:2005 é a norma internacional que trata dos requisitos para a implementação de sistemas de gestão da qualidade em laboratórios de ensaio e calibração. A norma estabelece que métodos normalizados utilizados fora dos escopos para os quais foram concebidos, ampliados ou modificados, métodos não normalizados e métodos criados ou desenvolvidos pelos laboratórios devem ser validados. Apesar de não tratar da necessidade de validação para métodos normalizados, a referida norma define que os laboratórios devem confirmar se têm condições para operar adequadamente os métodos normalizados antes da implantação dos ensaios².

Vários são os documentos que podem ser utilizados como referência na elaboração de procedimentos de validação intralaboratorial de métodos analíticos, embora não exista uma uniformidade sobre quais características devam ser determinadas no processo de validação. O documento orientativo DOQ-CGCRE-008 do INMETRO¹⁰ é a principal referência nacional, podendo ainda ser citada a Instrução Normativa 24 de 2009, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento²¹, para validação de métodos no âmbito do Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal (PNCRC). Documentos como o guia publicado pelo EURACHEM¹¹, a diretiva da União Europeia *Commission Decision* 2002/657/EC que estabelece Regulamentos sobre Desempenho de Métodos

e Interpretação de Resultados¹² e o guia harmonizado pela *Association of Official Analytical Chemists (AOAC International)*, *International Standards Organization (ISO)* e *International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)*¹³ são importantes referências internacionais que tratam da validação de métodos de ensaio.

Na diretiva *Comission Decision 2002/657/EC*¹² é feita uma distinção entre métodos de triagem e confirmação, que podem ser tanto qualitativos quanto quantitativos. Os primeiros detectam a presença de uma substância ou uma classe de substâncias no nível de interesse que têm capacidade para processar um número elevado de amostras e são utilizados para selecionar os resultados potencialmente não conformes. Os métodos confirmatórios produzem uma informação completa ou complementar que permite a identificação inequívoca da substância e, se necessário, sua quantificação no nível requerido.

Não existe um guia harmonizado para a validação de métodos qualitativos. Não obstante, há concordância de que a seletividade e o limite de detecção devam ser avaliados¹⁰⁻¹³. Estudos sobre robustez são tratados nos documentos do INMETRO¹⁰ e da União Europeia¹², embora esse parâmetro não esteja previsto no guia EURACHEM¹¹. Nesse documento são mencionados estudos das taxas de falso-positivos e falso-negativos para validação de métodos qualitativos. Os parâmetros de aplicabilidade e estabilidade são tratados como aplicáveis aos métodos qualitativos pela diretiva *Comission Decision 2002/657/EC* da União Europeia¹².

No guia harmonizado pela AOAC/ISO/IUPAC¹³ não é feita distinção entre métodos qualitativos e quantitativos ao apresentar os parâmetros de desempenho da validação. Contudo, a seletividade é tratada como um parâmetro essencialmente qualitativo e a aplicação dos parâmetros limite de detecção e robustez estão implícitos nas definições apresentadas.

Apesar de não haver documentos orientativos harmonizados para a validação de métodos qualitativos, esses métodos também precisam ser validados⁵ e, por isso, alguns documentos específicos vêm sendo publicados. Esses, no entanto, constituem propostas de validação de métodos qualitativos com aplicações específicas, que dependem das características intrínsecas do método de análise em questão, e não trazem detalhes sobre o delineamento experimental para avaliação dos parâmetros da validação.

A União Europeia possui um guia para a validação de métodos de triagem para resíduos de

drogas veterinárias baseado na diretiva *Comission Decision 2002/657/EC* e que consiste em um protocolo inicial de validação e recomendações de controle de qualidade desses métodos. Os métodos de triagem tratados pelo guia incluem os métodos qualitativos, semi-quantitativos e quantitativos. O guia sugere dois procedimentos que podem ser utilizados na validação dos métodos em questão, o primeiro baseado em uma abordagem clássica, em que os parâmetros são estudados em diferentes experimentos e, o segundo baseado em um modelo de delineamento fatorial. Em ambos os procedimentos, os parâmetros abordados são: seletividade, capacidade de detecção, limite de corte, aplicabilidade e robustez²². O *AOAC Performance Tested Program™ for test kits* foi desenvolvido para complementar o programa *Official Methods of AnalysisSM* da AOAC²³ e tem como finalidade fornecer aos fabricantes de *kits* de testes uma avaliação independente da alegação de desempenho dos mesmos. Ao conceder o certificado de *Performance Tested* a um *kit* específico, a *AOAC Research Institute (AOAC-RI)* garante ao usuário do *kit* que, além de ter sido submetido a uma avaliação independente, o *kit* possui o desempenho alegado pelo fabricante dentro dos parâmetros previstos. Na avaliação desses *kits*, a seleção dos parâmetros avaliados depende do tipo de método avaliado, se qualitativo ou quantitativo. Para *kits* que envolvem determinações qualitativas, o programa prevê o estudo de limites, interferentes ou reatividade cruzada, taxas de falsos resultados e robustez²⁴. Em 2010, o CODEX ALIMENTARIUS publicou a proposta de um guia para métodos de detecção, identificação e quantificação de sequências específicas de DNA e de proteínas em alimentos obtidos por técnicas de biotecnologia, o qual trata também da validação desses métodos, incluindo a validação de métodos qualitativos de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)²⁵. Neste documento são abordados os seguintes parâmetros: taxa de falso-positivos, taxa de falso-negativos, limite de detecção e robustez.

PARÂMETROS DE DESEMPENHO

Na Tabela 1 estão apresentados os parâmetros de desempenho estudados na validação de métodos qualitativos e os respectivos parâmetros correspondentes na validação de métodos quantitativos.

Tabela 1. Parâmetros de desempenho estudados na validação de métodos qualitativos e respectivos parâmetros correspondentes na validação quantitativa

Método Qualitativo	Método Quantitativo
Taxas de falso-positivos, de falso-negativos, de confiabilidade, rastreabilidade metrológica	Exatidão
Taxa de sensibilidade	Sensibilidade
Taxa de seletividade/ Confirmação de identidade	Seletividade
Região de perda de confiabilidade	Incerteza
Limite de detecção/ Limite de corte	Limite de detecção/Limite de quantificação/Limite de decisão/ Capacidade de detecção
Robustez	Robustez
Acordância e Concordância	Precisão

Fonte: Adaptado de Trullols et al.⁶; Ellison e Fearn⁸ e Ríos et al.¹⁴

Os parâmetros de desempenho dos métodos podem ser classificados em: principais, básicos e de produtividade¹⁷. Os principais (exatidão e representatividade) constituem os atributos do resultado analítico, relacionados às duas propriedades metrológicas clássicas – rastreabilidade e incerteza. Parâmetros analíticos básicos (precisão, robustez, sensibilidade e seletividade) são os atributos relacionados ao processo de medição analítico e que servem de suporte para as propriedades principais. Por fim, os de produtividade correspondem aos atributos do processo analítico que possuem relevância prática, como velocidade, custo/efetividade e fatores pessoais.

Na definição das propriedades analíticas dos métodos qualitativos, dois parâmetros são de suma importância: a taxa de falso-positivos e a taxa de falso-negativos. A taxa de falso-positivos é a probabilidade de obter um resultado positivo, uma vez que o analito não está presente na amostra (ou do método avaliado responder positivamente a um método de referência). A taxa de falso-negativos é a probabilidade de obtenção de um resultado negativo quando a substância está presente na amostra (ou do método avaliado responder negativamente a um método de referência)^{6,8,26}.

A confiabilidade de um método qualitativo é definida como a proporção de resultados corretos (positivos ou negativos) de uma bateria de testes independentes. Trata-se de um parâmetro positivo, que

abarca conotações negativas dos erros nas medições qualitativas. A confiabilidade é uma propriedade principal dos testes qualitativos, podendo ser relacionada à exatidão dos métodos quantitativos^{14,16}.

As taxas de sensibilidade e seletividade são parâmetros de desempenho de métodos qualitativos, intimamente relacionados com as taxas de falsos resultados. A sensibilidade, também chamada poder do teste, consiste na habilidade do método em detectar amostras verdadeiramente positivas como positivas, enquanto a taxa de sensibilidade correspondente à probabilidade de um método classificar como positiva uma amostra sabidamente positiva^{6,8,17}. No contexto de testes de hipóteses estatísticos, poder do teste é também definido como $1-\beta$, em que β representa a probabilidade de se obter resultados falso-negativos⁵.

De maneira análoga, a seletividade corresponde à habilidade em detectar amostras verdadeiramente negativas como negativas, sendo a taxa de seletividade a probabilidade de classificar como negativa uma amostra sabidamente negativa^{6,8,17}. Em testes de hipóteses estatísticos (1-seletividade) é relacionada ao nível de significância α , o qual representa a probabilidade de se obter resultados falso-positivos⁵.

Quando amostras que podem ou não conter determinado analito são analisadas, as taxas de falsos resultados, de sensibilidade e de seletividade são parâmetros que caracterizam a eficiência do método de ensaio em questão. Para amostras que contêm o analito, outros parâmetros podem ser estimados como o valor preditivo positivo e o valor preditivo negativo. No entanto, como em ensaios com amostras reais, é impossível distinguir as respostas falsas das verdadeiras, ou seja, os resultados verdadeiramente positivos dos falso-positivos e os verdadeiramente negativos dos falso-negativos, os valores preditivos podem ser estimados somente se a prevalência de amostras contendo o analito for conhecida²⁷.

Nas análises qualitativas, a incerteza não pode ser expressa do mesmo modo que nas análises quantitativas, ou seja, como um parâmetro que caracteriza a dispersão dos resultados. No caso dos métodos qualitativos, a incerteza tem uma natureza probabilística, podendo ser definida como a probabilidade de se tomar uma decisão errada. Os métodos com respostas binárias não possuem um número associado ao resultado e, assim, a incerteza não é expressa como um valor numérico, mas como uma região onde há probabilidade de ocorrência de erros. Nos

métodos qualitativos, o conceito clássico de incerteza pode ser substituído pelo conceito de região de perda de confiabilidade, termo preferencialmente utilizado. Esta região é definida pelos limites superiores e inferiores de concentração, entre os quais o método produz resultados falsos^{5,6,14,28}.

O limite de detecção, conforme definido para análises quantitativas, pode ser calculado quando a resposta é um valor numérico, sendo consideradas duas probabilidades de erro α e β ²⁹, onde α é a probabilidade de se cometer um erro do tipo I, de rejeitar H_0 (hipótese de nulidade) quando H_0 é verdadeira, que mede a taxa dos falso-positivos e β é a probabilidade de se cometer um erro do tipo II, de não rejeitar H_0 quando H_0 é falsa, que mede a taxa de falso-negativos. Quando a resposta é binária, entretanto, o desvio padrão de amostras brancas não pode ser calculado e as probabilidades de erro não podem ser consideradas ao mesmo tempo. Portanto, o limite de detecção pode ser definido como a menor concentração de um analito que pode ser detectada, confiavelmente como positiva, em uma dada matriz. Isto implica em considerar somente o erro tipo II, ou taxa de resultados falso-negativos, usualmente de 5 %. Esta definição é apresentada no contexto de verificação de um nível máximo de concentração permitido, mas se for extrapolado a determinação de uma concentração mínima permitida, a probabilidade de erro tipo I, ou taxa de falso-positivos, deve ser considerada também a 5 %. Como as duas probabilidades de erro não podem ser consideradas simultaneamente, no primeiro caso o limite de detecção coincidirá com o limite superior da região de perda de confiabilidade, na qual a taxa de sensibilidade é de 95 % e, no segundo caso, ele coincidirá com o menor limite da região de perda de confiabilidade⁶.

Além do limite de detecção do método, que é uma característica intrínseca do método de ensaio, o limite imposto pela legislação ou pelo cliente e o limite de corte do laboratório para métodos que possuem respostas instrumentais (*cut-off*) estão entre as referências quantitativas envolvidas nos resultados dos métodos qualitativos¹⁷.

A robustez é a estimativa da capacidade de um método frente às pequenas e deliberadas mudanças nas variáveis estudadas, sendo determinada em diferentes níveis de concentração do analito¹⁸. A robustez em análise qualitativa é um parâmetro analítico, assim como nas análises quantitativas, cujo ultimato é definir as fragilidades experimentais de um método pela indicação

das variáveis críticas na garantia da confiabilidade das respostas. A robustez depende da concentração dos analitos, sendo que, na faixa de perda de confiabilidade, haverá maior influência de fatores experimentais^{4,17}.

A rastreabilidade metrológica, do ponto de vista prático, assume que existe uma cadeia ininterrupta de calibrações de um sistema de medição ou comparações. Entre outras possibilidades, a rastreabilidade metrológica pode ser obtida comparando os resultados obtidos pelo método em validação com aqueles obtidos por um método de referência ou pelo uso de um material de referência certificado (MRC)^{6,14,30}. É importante ressaltar que os padrões de referência são a chave para a garantia da rastreabilidade metrológica das informações e resultados fornecidos pelos métodos qualitativos, já que as características analíticas desses padrões são utilizadas como base de comparação para compostos desconhecidos da amostra¹⁴.

Dois outros parâmetros são ainda acrescentados às validações de métodos qualitativos, quando estruturadas em processos interlaboratoriais: acordância e concordância; que correspondem respectivamente, aos conceitos de precisão sob condições de repetitividade e de reprodutibilidade, aplicados a testes qualitativos. A acordância é a probabilidade de obter, para duas amostras idênticas, analisadas no mesmo laboratório e, sob condições de repetitividade, o mesmo resultado. Para o cálculo da acordância, calcula-se a acordância para cada laboratório, que é a probabilidade de duas amostras fornecerem o mesmo resultado e, em seguida a média das probabilidades de cada laboratório³¹. Concordância é a probabilidade de obtenção do mesmo resultado para duas amostras idênticas, testadas em laboratórios diferentes e, sob condições de reprodutibilidade. Esse parâmetro é estimado pelas proporções correspondentes de pares de resultados de dados concordantes^{8,31}. Da mesma forma que, em estudos de métodos quantitativos, experimentos de concordância podem ser conduzidos sob condições de precisão intermediária, representando o que normalmente acontece no laboratório sob condições de rotina, incluindo variações em lotes de reagentes, analistas e equipamentos que sejam representativos¹³.

Na validação de métodos qualitativos, a representatividade torna-se um componente essencial da qualidade das repostas qualitativas. Uma resposta 100 % confiável, mas não representativa das amostras teste, indica um resultado inadequado do ponto de vista da qualidade do método. Estratégias adequadas de amostragem e a

correta aplicação do protocolo de amostragem são as bases para essa propriedade¹⁷. A escolha das amostras deve fornecer estimativas de sensibilidade e seletividade, em uma dada faixa de concentração, o que implica em um delineamento que empregue amostras em uma faixa representativa de concentrações e, pelo menos um branco, além de alguns itens com interferentes. As replicatas também são essenciais na avaliação de métodos qualitativos, sem as quais as frequências não poderiam ser estimadas⁸.

ANÁLISE DE DADOS E AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS

Na Tabela 2 estão descritos os delineamentos experimentais e respectivas ferramentas de análises de dados propostos na literatura para avaliação dos parâmetros de desempenho de métodos qualitativos.

Para análise de dados e avaliação dos parâmetros, vários modelos são propostos. As tabelas de contingência e o Teorema de Bayes podem ser utilizados na determinação das taxas de falsos

resultados, de sensibilidade, de seletividade e de confiabilidade. As curvas de probabilidades ou curvas de desempenho e os testes de hipóteses estatísticos podem ser utilizados no estudo de limites e da região de perda de confiabilidade (incerteza)^{6,8}. No caso da precisão, a acordância e a concordância são avaliadas por cálculos de probabilidade e análise combinatória³¹. As taxas, limites, incerteza, acordância e concordância podem ser estudadas em um mesmo delineamento experimental que consiste em ensaios com amostras de concentrações conhecidas do analito.

Para os estudos de robustez podem ser utilizados experimentos fatoriais. Neste caso, o experimento inclui ensaios com amostras em um nível de concentração do analito para o qual o método apresenta 100 % de confiabilidade sob diferentes condições experimentais⁴.

A validação de métodos qualitativos exige maior número de medições para obtenção de valores para os parâmetros de validação com significado e níveis de confiança semelhantes aos resultados dos métodos quantitativos³². Isso porque um resultado qualitativo fornece menos informações que um

Tabela 2. Delineamentos experimentais e respectivas ferramentas para análise de dados propostos na literatura para validação de métodos qualitativos

Parâmetro	Delineamento experimental	Análise de dados	Referência
		<ul style="list-style-type: none"> - Cálculo da porcentagem de resultados positivos em cada nível. - Construção de gráfico: probabilidade de positivos $P(x)$ versus concentração (x). - Na região da curva assumida linear, extrapola-se a curva para os pontos $P(x) = 0$ e $P(x) = 100$, que são os limites da região de perda de confiabilidade. 	36
Região de perda de confiabilidade (incerteza) e taxas de falsos resultados	<ul style="list-style-type: none"> - Estabelecimento do nível de concentração de referência (C) - limite de corte ou <i>threshold</i>. - Análise das amostras, sendo 10 replicatas por nível e 5 níveis, selecionados da seguinte forma: 2 níveis acima de C, C e 2 níveis abaixo de C. 	<ul style="list-style-type: none"> - Estimativa da região de perda de confiabilidade conforme descrito por Song et al.³⁶. 	5,18
	<ul style="list-style-type: none"> - Análise das amostras, sendo 30 replicatas por nível. Um grande número de amostras deve ser analisado para assegurar inferência estatística. - Níveis selecionados devem estar levemente abaixo do limite de corte ou <i>threshold</i> selecionado. 	<ul style="list-style-type: none"> - Cálculo de porcentagem de resultados positivos em cada nível. - Construção de gráfico: $P(x)$ versus (x). - Limites da região de perda de confiabilidade determinados pelo cálculo das concentrações do analito que produzem 5% de probabilidade de se obter um resultado falso-positivo e 95% de probabilidade de se obter um resultado falso-negativo ou conforme descrito por Song et al.³⁶. - Aplicação do Teorema Bayes não é apropriada para propósitos de rotina: difícil desenvolvimento de equações e grande número de amostras. 	28

Cont. Tabela 2

Parâmetro	Delineamento experimental	Análise de dados	Referência
	<ul style="list-style-type: none"> - Análise aleatória de grande número de amostras (n>30), sendo MRC ou amostras brancas contendo o analito em diferentes níveis de concentração. - Escolha dos níveis: quanto maior a confiabilidade requerida, maior o número de níveis a serem estudados. - Estabelecimento de nível de concentração de referência (C) - limite de corte ou <i>threshold</i>. - Determinação da região de perda de confiabilidade: <ol style="list-style-type: none"> 1. Estimativa aproximada das zonas limite da região de perda de confiabilidade pela análise de 1 ou 2 replicatas por nível, em 10 níveis selecionados: 5 superiores a C e 5 inferiores a C. 2. Análise de 5 a 10 replicatas em 6 níveis, sendo 3 níveis na zona limite superior e 3 na zona limite inferior. 	<ul style="list-style-type: none"> - Determinação das taxas de falsos resultados para delimitação dos limites da região de perda de confiabilidade a um nível de probabilidade fixa. 	17
Região de perda de confiabilidade (incerteza) e taxas de falsos resultados	<ul style="list-style-type: none"> - Métodos para avaliação de falsos resultados: <ol style="list-style-type: none"> 1. Baseado na observação de probabilidades de falsos resultados em uma série de testes controlados. Experimentos devem estar concentrados em regiões onde há maior probabilidade de resultados falsos, pois as taxas de falsos resultados são difíceis de observar em número realista de experimentos a menos que a taxa seja alta (perto de 50%). 2. Baseado na previsão das características conhecidas da população, incluindo estatísticas das medições quantitativas e distribuições conhecidas de características de teste de amostra de uma população. Obs.: trata somente incerteza. 	<ul style="list-style-type: none"> - Estimativas Bayesianas podem ser calculadas pela combinação adequada das taxas de falsos resultados. 	38
	<ul style="list-style-type: none"> Obs.: trata somente taxas. 	<ul style="list-style-type: none"> - Estimativa das taxas por meio da aplicação do Teorema de Bayes, tabelas de contingência, curvas de desempenho ou testes estatísticos (nesse último, somente se a resposta for obtida por método instrumental). - Apresentação das fórmulas de cálculo das taxas obtidas a partir das tabelas de contingência. 	6
	<ul style="list-style-type: none"> Obs.: trata somente taxas. 	<ul style="list-style-type: none"> - Estimativa das taxas pela aplicação de fórmulas de cálculo obtidas a partir das tabelas de contingência. 	3
Limites	<ul style="list-style-type: none"> - Análise aleatória de amostras adicionadas do analito em uma faixa de níveis de concentração, sendo 10 replicatas por nível. 	<ul style="list-style-type: none"> - Construção de curva de resposta P(x) versus x. Limite de detecção é determinado de acordo com a concentração na qual o teste deixa de ser confiável. 	11
	<ul style="list-style-type: none"> Procedimento interlaboratorial: <ul style="list-style-type: none"> - 10 baterias. - 5 replicatas por bateria. 	<ul style="list-style-type: none"> - Aplicação de fórmulas deduzidas a partir de cálculos de probabilidade e análise combinatória. 	31
Acordância e concordância	<ul style="list-style-type: none"> Procedimento interlaboratorial para ensaios não microbiológicos: <ul style="list-style-type: none"> - 20 a 40 replicatas por bateria, incluindo replicatas, sendo 30 um número satisfatório. - 5 a 6 replicatas por material, podendo ser menor no caso de grande número de baterias; mas no mínimo 2 replicatas por teste em caso de grande quantidade de materiais. 	<ul style="list-style-type: none"> - Fórmulas propostas por Langtonn et al.³¹ 	8

Cont. Tabela 2

Parâmetro	Delineamento experimental	Análise de dados	Referência
	<ul style="list-style-type: none"> - Identificação e seleção das principais variáveis que afetam o desempenho do método (considerar informações obtidas previamente na otimização e validação do método). - Seleção dos números de níveis a serem estudados para as variáveis, 2 em geral. - Seleção de delineamento experimental. No caso de método com pequeno número de variáveis e níveis envolvidos, pode-se estabelecer um experimento fatorial completo. - Estabelecimento de variação no valor da resposta que significa alteração no desempenho do método. - Condições de estudo de caso: <ol style="list-style-type: none"> 1. Seleccionadas 3 variáveis e 2 níveis, totalizando 8 diferentes experimentos. 2. Experimentos realizados em 8 dias, sendo cada experimento realizado 5 vezes, por um período de quatro dias, totalizando 20 repetições por experimento. 3. Somente alterações de 5% nas taxas de confiabilidade, ou de falsos resultados, foram consideradas. 	<ul style="list-style-type: none"> - Apresentação de fórmulas para cálculo dos efeitos dos fatores e realização de teste t para conclusão da significância do efeito do fator sobre os resultados do método. 	6
Robustez	<ul style="list-style-type: none"> - Identificação de variáveis que têm efeito significativo sobre o desempenho do método. - Análise com materiais de referência, MRC ou amostras de composição conhecida. - Monitoramento da exatidão e precisão do método frente às alterações das variáveis. - Análise de cada <i>set</i> experimental uma vez. 	<ul style="list-style-type: none"> - Determinação do efeito de cada alteração na condição de realização do teste na média. - Classificação das variáveis de acordo com o efeito sobre o desempenho do método. 	11
	<ul style="list-style-type: none"> - Identificação de fatores que podem influenciar os resultados por estudos prévios. - Fatores alterados em ordem de grandeza coerente com os desvios geralmente encontrados entre laboratórios. - Realização de teste utilizando a abordagem de Youden (planejamento fatorial fracionário). Outros métodos podem ser utilizados, no entanto, na abordagem de Youden o tempo e esforço exigidos são mínimos. - Sempre que um fator que influencia significativamente os resultados for encontrado, novas análises devem ser realizadas para estudo dos limites de aceitabilidade deste fator. - Fatores que influenciam significativamente os resultados devem ser claramente identificados no protocolo do método. 	<ul style="list-style-type: none"> - Na abordagem de Youden, as interações entre os diferentes fatores não podem ser detectadas. 	12

resultado quantitativo, independentemente do método estatístico empregado^{28,32}. Para os métodos quantitativos, a independência dos resultados qualitativos deve ser assegurada pela análise aleatória das amostras^{8,17}.

As amostras selecionadas para realização dos estudos de validação podem ser MRC, amostras brancas e adicionadas de padrão do analito de interesse^{14,17}.

Taxas de falsos resultados, de sensibilidade, de seletividade e de confiabilidade

Tabelas de Contingência

As tabelas de contingência tratam análises qualitativas como a classificação de um problema. Havendo dois tipos de resultados possíveis no teste

qualitativo, como positivo (maior ou igual a um valor especificado) ou negativo (menor que o valor especificado), e duas possíveis situações reais, uma tabela de contingência 2 x 2 pode ser construída, como apresentado na Tabela 3. Embora as amostras sejam consideradas em dois grupos, são necessários estudos com amostras em vários níveis de concentração⁵. Estas tabelas podem ser utilizadas na determinação das taxas de falsos resultados, taxa de seletividade, taxa de sensibilidade e taxa de confiabilidade para cada nível de concentração estudado⁶.

Tabela 3. Exemplo de Tabela de Contingência 2 x 2

Resultado do teste	Analito Presente	Analito Ausente	Total
Positivo	TP	FP	TP + FP
Negativo	FN	TN	FN + TN
Total	FN + TP	FP + TN	N

FP = quantidade de resultados falso-positivos; FN = quantidade de resultados falso-negativos; TP = quantidade de resultados positivos corretos; TN = quantidade de resultados negativos corretos; N = TP+FP+FN+TN

A partir das fórmulas de cada uma das taxas, os valores de cada uma delas podem ser calculados com os dados da tabela de contingência. A taxa de falso-positivos (*TFP*) é definida como a razão entre o número de resultados falso-positivos (*FP*) e a soma desse com o número de resultados negativos corretos ou número total de negativos conhecidos (*TN*), multiplicada por 100 (Equação 1)^{6,8,26}:

$$TFP = \frac{FP}{FP + TN} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

De maneira análoga, a taxa de falso-negativos (*TFN*) é a razão entre o número de resultados falso-negativos (*FN*) e a soma desse com o número de resultados positivos corretos ou número total de positivos conhecidos (*TP*), multiplicada por 100 (Equação 2)^{6,8,26}:

$$TFN = \frac{FN}{FN + TP} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

A taxa de sensibilidade (*TSB*) é definida como a razão entre *TP* e a soma desse com *FN*, multiplicada por 100 (Equação 3), enquanto a taxa de seletividade (*TST*)

pode ser definida como a razão entre *TN* e a soma desse com *FP*, multiplicada por 100 (Equação 4)^{6,8,17}:

$$TSB = \frac{TP}{TP + FN} \times 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

$$TST = \frac{TN}{TN + FP} \times 100 \quad (\text{Eq. 4})$$

A taxa de confiabilidade (*TCF*) é definida como a diferença entre o total de resultados (100 %) e a soma de *TFP* e *TFN*, como apresentado na Equação 5:

$$TCF = 100 - TFP - TFN \quad (\text{Eq. 5})$$

As tabelas de contingência são frequentemente usadas na avaliação da confiabilidade dos testes de triagem e na comparação entre diferentes ensaios, que se baseiam na sensibilidade e na seletividade de diferentes testes de triagem, quando aplicados às mesmas amostras. Nesse caso, deve ser observado que diferenças na sensibilidade e na seletividade dos testes podem ser resultado do acaso, já que situações reais e resultados estão sujeitos à erros aleatórios, especialmente quando o número de amostras é pequeno. Dependendo do objetivo da análise, é preferível que o método seja mais sensível que seletivo, ou vice-versa. Em geral, um aumento na sensibilidade acarreta um decréscimo na seletividade. Desse modo, quanto maior o número de amostras, mais informação a tabela de contingência irá apresentar e maior será a confiabilidade desses parâmetros⁵.

Uma das vantagens mais importantes das tabelas de contingência é que essas podem ser facilmente aplicáveis aos vários tipos de bioensaios existentes, como imunológicos, microbiológicos, clínicos e bioquímicos. Embora, pela avaliação das tabelas de contingência seja possível obter uma visão geral sobre o desempenho do método, tais tabelas, por si só, não fornecem informações individuais, como a probabilidade de erro para cada amostra⁶. Outra desvantagem é que o desempenho da tabela de contingência depende muito do tamanho da amostra e do delineamento experimental utilizado para construí-la⁵.

Teorema de Bayes

O teorema formulado por Bayes, no século XVIII, vem sendo muito utilizado nas últimas décadas

por sua versatilidade e aplicação em diversos campos da ciência, para expressar e atualizar probabilidades quando estruturas dicotômicas³³ estão envolvidas, incluindo as análises qualitativas^{5,33}.

O teorema de Bayes é representado pela Equação 6:

$$P(A|T) = \frac{P(T|A) \cdot P(A)}{P(T|A) \cdot P(A) + P(T|\bar{A}) \cdot P(\bar{A})} = \frac{P(T|A) \cdot P(A)}{P(T)} \quad (\text{Eq. 6})$$

Sendo $P(A|T)$ a probabilidade de A dado T , $P(A)$ a probabilidade a priori de A , $P(T|A)$ a probabilidade de T dado A , $P(T)$ a probabilidade de T . O travessão acima de A denota o evento complementar.

No caso das análises qualitativas, A denota a presença do analito na amostra e \bar{A} corresponde à ausência do analito na amostra, enquanto T representa o resultado do teste. $P(A)$ é a probabilidade de o analito estar presente na amostra antes da realização do teste. $P(A|T)$ é a probabilidade de o analito estar presente na amostra levando em conta o resultado do teste, enquanto $P(T|A)$ é a probabilidade de ocorrer o resultado estando o analito presente na amostra, o que indica a TSB ³⁴.

Sendo T o resultado do teste e \bar{T} o evento complementar, temos que $P(T|A) = 1 - P(\bar{T}|A)$, em que $P(\bar{T}|A)$ é a probabilidade de se obter um resultado falso-negativo, ou seja, a TFN . Sendo assim, $P(T|\bar{A})$ é a probabilidade de se obter um resultado positivo na ausência de A , correspondendo à probabilidade de um resultado falso-positivo, ou seja, à TFP ³⁴.

Desse modo, o teorema de Bayes pode ser utilizado na determinação das taxas. A taxa de falso-positivos é estimada pela proporção de resultados incorretos relatados para amostras conhecidas que não contém a substância pesquisada (Equação 7). Da mesma forma, a taxa de falso-negativos é estimada pela proporção de resultados incorretos para as amostras que contém a substância pesquisada (Equação 8)^{6,8,26}:

$$P(T|\bar{A}) = \frac{\text{Resultados falso-positivos}}{\text{Total de resultados negativos}} \times 100 = \frac{FP}{FP+TN} = TFR \quad (\text{Eq. 7})$$

$$P(\bar{T}|A) = \frac{\text{Resultados falso-negativos}}{\text{Total de resultados positivos}} \times 100 = \frac{FN}{FN+TP} = TFN \quad (\text{Eq. 8})$$

A TSB é estimada a partir da proporção de resultados corretos relatados para amostras conhecidas que contém o analito (Equação 9) e a TST é estimada a

partir da proporção de resultados corretos para os itens de ensaio que não contém o analito (Equação 10)^{6,8,17}:

$$P(T|A) = \frac{\text{Resultados positivos verdadeiros}}{\text{Total de resultados positivos}} \times 100 = \frac{TP}{TP+FN} = TSB \quad (\text{Eq. 9})$$

$$P(\bar{T}|\bar{A}) = \frac{\text{Resultados negativos verdadeiros}}{\text{Total de resultados negativos}} \times 100 = \frac{TN}{TN+FP} = TSB \quad (\text{Eq. 10})$$

A relação entre as probabilidades condicionais de sensibilidade e seletividade fornece a razão de verossimilhança (*likelihood ratio* - LR) (Equação 11), que é uma medida do poder do teste³⁵, ou seja, é uma medida da alteração das probabilidades após obtenção do resultado do teste³⁴:

$$LR = \frac{TSB}{1 - TST} = \frac{1 - TFN}{TFP} = \frac{P(T|A)}{P(T|\bar{A})} \quad (\text{Eq. 11})$$

A TCF , é estimada pela proporção de resultados verdadeiros no total de ensaios realizados (Equação 12):

$$P(A|T) = \frac{\text{Total resultados verdadeiros}}{\text{Total de resultados}} \times 100 = \frac{TP+TN}{TP+TN+FP+FN} \times 100 =$$

$$P(A|T) = 100 - TFP - TFN = TCF \quad (\text{Eq. 12})$$

O Teorema de Bayes permite o cálculo de probabilidades condicionais referentes a apenas uma amostra, incorpora as informações de realizações anteriores e obtém como resultado, para a próxima realização, a probabilidade a posteriori a nova probabilidade a priori. Assim, a probabilidade da ocorrência de um resultado errôneo é dada individualmente^{5,6,34}. No entanto, para que o procedimento forneça boas estimativas, o número de testes de ensaio deve ser alto. Do ponto de vista analítico, as desvantagens do método são a complexidade da nomenclatura e a dificuldade de quantificação dos diferentes valores das probabilidades⁵.

Limites e região de perda de confiabilidade

Curvas de desempenho

As curvas de desempenho são obtidas pela construção de um gráfico de probabilidade em função da concentração. Em uma situação ideal, em que x representa a concentração verdadeira, $P(x)$ a taxa de resultados

positivos e $N(x)$ a taxa de resultados negativos, para uma determinada concentração de referência C ($x = C$), os possíveis resultados obtidos em um método binário são: não (resultados negativos), quando $x < C$, com $P(x) = 0\%$ e $N(x) = 100\%$; e sim (resultados positivos), quando $x > C$, com $P(x) = 100\%$ e $N(x) = 0\%$ ^{28,36}.

No entanto, em situações reais, concentrações próximas a C ($C_0 < C < C_1$), $P(x)$ e $N(x)$ apresentam valores entre 0% e 100%. A faixa de concentração que inclui esses valores intermediários é justamente a região de perda de confiabilidade. Assim, nesta região, são obtidas as taxas de falso-positivos ($C_0 < x < C$) e as taxas de falso-negativos ($C < x < C_1$). Para amostras contendo $x < C_0$ e $x > C_1$, são obtidos resultados negativos e positivos, respectivamente, com 100% de confiabilidade²⁸.

Na Figura 1, estão ilustradas as curvas de desempenho para a situação ideal e para uma situação real genérica, em que $\alpha = \beta = 0,05$ ^{14,28,36}. Na curva de desempenho real, o limite de detecção pode ser estabelecido em função de α ou de β no intervalo da região de perda de confiabilidade que, por sua vez, é determinada pela região de maior inclinação da curva, ou seja, pelo intervalo entre os níveis nos quais a probabilidade de resultados positivos deixa de ser de 0% e 100%^{5,6,11,28}. Assim, os limites C_0 e C_1 , que definem a região de perda de confiabilidade, podem ser determinados pelo cálculo das concentrações do analito que produzem 5% de probabilidade de obtenção de falso-positivos e 95% de resultados positivos corretos (o que corresponde a 5% de probabilidade de obtenção de falso-negativos).

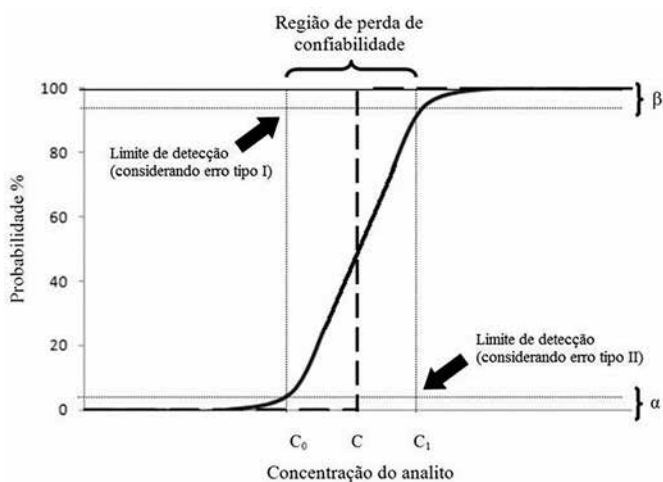


Figura 1. Curva de desempenho para determinação da região de perda de confiabilidade e limites relacionados

A principal desvantagem das curvas de desempenho é a necessidade de realização de análises em replicatas, acarretando consequências negativas, como o aumento do tempo e o custo do processo⁶. Contudo, Ellison e Fearn⁸ observaram que o estudo de um grande número de níveis com poucas repetições por nível, em vez de poucos níveis com muitas repetições, fornece estimativas de probabilidades relativamente confiáveis, o que pode ser considerada uma vantagem sob o ponto de vista prático.

Este procedimento é bastante usado quando não há muito conhecimento sobre a precisão do método de triagem utilizado, por exemplo, no caso de um método analítico recém-implantado em um laboratório⁵.

Testes de Hipóteses

Quando o objetivo da análise está na determinação da presença de determinado analito na amostra, duas hipóteses são geradas: H_0 (hipótese de nulidade) - a amostra contém o analito; e H_1 (hipótese alternativa) - a amostra não contém o analito.

Como resultado, pode-se obter dois tipos de erros diferentes: erroneamente detectar a presença do analito (admitir um resultado falso-positivo - erro tipo I) ou sua ausência (admitir um resultado falso-negativo - erro tipo II). Em geral, a preferência de uma escolha ou outra é uma questão de convenção²⁷.

Os testes de hipóteses comparam a resposta da amostra com a de uma referência pré-definida, que contém o analito em um nível de concentração específico⁶. Alguns estudos têm utilizado testes de hipóteses para avaliar a incerteza dos métodos qualitativos⁵ e, embora a aplicação destes testes não resulte em novas técnicas instrumentais de análise química qualitativa, esses tornam possível a melhoria do desempenho das atuais técnicas de estimativa de incerteza, refletindo o grau de confiabilidade do procedimento escolhido.

As abordagens utilizadas para exprimir a incerteza são possíveis pela aplicação de analogia de testes estatísticos de hipóteses com a aplicação das fórmulas de Bayes³⁷. Desse modo, as principais vantagens dos testes de hipóteses decorrem da utilização da probabilidade conhecida de erro tipo I e tipo II. Esse método torna mais fácil a avaliação da incerteza quando se utiliza métodos qualitativos que fornecem uma resposta instrumental. A rastreabilidade também pode ser verificada e o limite de detecção calculado. No entanto, se o *kit* de teste não fornecer uma resposta

instrumental ou se a resposta for baseada em uma observação visual, que não pode ser quantificada, o teste de hipótese não poderá ser aplicado⁶. Quando se utilizam intervalos estatísticos, os experimentos constituem uma série de análises de amostras independentes, contendo o analito em um limite específico, sob condições de precisão intermediária, aumentando as fontes de incerteza⁵.

Robustez

O tipo de resposta binária do método qualitativo define o estudo da robustez, que por sua vez, envolve o desenvolvimento de um delineamento experimental para avaliação de fatores ou variáveis previamente escolhidos que acarretam alterações na confiabilidade e nas taxas de falsos resultados. Esses fatores são as condições experimentais intrínsecas do método⁴. Desse modo, a robustez deve ser determinada em diferentes níveis de concentração do analito para cada um dos analitos considerados¹⁸.

Assim, em termos gerais, o estudo da robustez inclui os seguintes pontos: seleção das variáveis ou fatores; seleção do número de níveis para cada variável (em geral 2 níveis) e do delineamento experimental ótimo; estabelecimento do valor de reposta que provoca alterações nos fatores e nos experimentos e do cálculo dos efeitos de cada fator e entre os fatores; e elaboração das conclusões⁴.

Uma boa opção de delineamento experimental para o estudo da robustez, quando não se tem muitas variáveis e níveis envolvidos, é um experimento fatorial completo⁴. O delineamento experimental inclui a realização de testes em nível para o qual se obtém 100% de confiabilidade, ou seja, 0% de taxa de falso-positivos e 0% de taxa de falso-negativos, com variação nos níveis dos fatores estudados. O efeito de cada fator (*DF*) pode ser calculado pela Equação 13:

$$DF = \frac{\sum TCF(+)-\sum TCF(-)}{n_j} \quad (\text{Eq. 13})$$

Sendo *TCF(+)* a confiabilidade observada no maior nível do fator, *TCF(-)* a confiabilidade observada no menor nível do fator, *n* o número de experimentos e *n_j* o número de experimentos no *j*-ésimo nível do fator estudado⁴.

Após o cálculo do efeito dos fatores estudados, o teste *t* pode ser realizado para conclusão sobre a

significância da influência dos fatores sobre as respostas (Equação 14):

$$t = \frac{|DF| \times \sqrt{n_i}}{s \times \sqrt{2}} \quad (\text{Eq. 14})$$

Sendo *s* o desvio padrão encontrado em condições de precisão intermediária e *DF* o efeito de cada fator, definido entre 0 e 1. O valor calculado deve ser comparado ao valor tabelado de distribuição *t*, considerando o nível de significância e o número de graus de liberdade associados à estimação de *s*⁴.

Acordância e concordância

Como definido, a acordância é o parâmetro de repetitividade aplicado à análise qualitativa. A acordância é a probabilidade (em porcentagem) de dois materiais de teste idênticos, analisados pelo mesmo laboratório, em condições de repetitividade, fornecerem o mesmo resultado, ou seja, ambos fornecerem dois resultados positivos ou dois negativos³¹.

Para o cálculo da acordância, calcula-se a probabilidade de cada laboratório ou de cada bateria analítica (em estudos interlaboratoriais sob condições de precisão intermediária) fornecer o mesmo resultado e, em seguida, a média das probabilidades de todos os laboratórios ou baterias analíticas. A soma da quantidade de combinações de pares obtida pelo número de resultados positivos com a quantidade de combinações de pares obtida pelo número de resultados negativos dividida pela quantidade de combinações de pares, que podem ser formados pelo total de análises realizadas, fornece a probabilidade de cada laboratório ou de cada bateria analítica, ou seja, a acordância. De uma maneira mais simples, a acordância pode ser calculada pela Equação 15.

$$ACO = \frac{\{k(k-1) + (n-k)(n-k-1)\}}{n(n-1)} \quad (\text{Eq. 15})$$

Sendo *n* o total de resultados obtidos pelo laboratório ou bateria analítica e *k* o número de resultados positivos obtidos pelo laboratório ou bateria analítica³¹.

A concordância, o parâmetro qualitativo equivalente ao parâmetro quantitativo de reprodutibilidade, é a probabilidade de dois materiais de teste idênticos provenientes de diferentes laboratórios ou de diferentes baterias analíticas (em

estudos intralaboratoriais sob condições de precisão intermediária) fornecerem o mesmo resultado, ou seja, que ambos sejam positivos ou negativos. A concordância pode ser calculada de modo intuitivo enumerando-se as associações de resultados concordantes positivos e negativos de cada laboratório ou bateria analítica com os demais resultados do conjunto. A concordância será então o resultado da divisão entre a soma de associações de resultados concordantes positivos e negativos de todos os laboratórios ou baterias e a soma das associações de resultados dos laboratórios ou baterias. De modo mais simples, a concordância pode ser calculada pela Equação 16:

$$CON = \frac{2[k(k-nb)] + nb(nb-1) - ACO[nb(n-1)]}{n^2b(b-1)} \quad (\text{Eq. 16})$$

Sendo b o número de laboratórios ou baterias analíticas e ACO a concordância³¹.

CONCLUSÃO

A garantia da qualidade em análises qualitativas deve estar baseada na avaliação dos parâmetros de desempenho relacionados às propriedades analíticas desses métodos. Contudo, nem sempre os parâmetros conhecidos das análises quantitativas podem ser aplicados às análises qualitativas. Na validação de métodos quantitativos, alguns dos parâmetros estudados são: exatidão; sensibilidade; seletividade; incerteza; limites; e precisão. No campo das análises qualitativas, esses parâmetros possuem correspondência com as taxas de falsos resultados, sensibilidade e confiabilidade, seletividade, região de perda de confiabilidade, limite de detecção e concordância e concordância, respectivamente. Tabelas de contingência e o teorema de Bayes são adotados na avaliação das taxas de falsos resultados, sensibilidade, seletividade e confiabilidade. Os limites e região de perda de confiabilidade são determinados por meio de curvas de probabilidade. Concordância e concordância são estimadas a partir de conceitos de análise combinatória. A falta de referências bem estabelecidas para a metrologia química em relação às análises qualitativas e a crescente demanda por respostas binárias confiáveis, principais motivadores desse trabalho, sinalizam para o fato de que a validação adequada desses métodos deva ser considerada um importante tópico do presente e do futuro das ciências analíticas.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS

1. Souza SVC. Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos [tese de doutorado]. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais; 2007.
2. Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT. ISSO (International Standard Organization). ABNT NBR ISO/IEC 17025. Requisitos gerais para a competência de laboratório de ensaio e calibração. Rio de Janeiro: ABNT; 2005. 31p. (b)
3. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução normativa número 8, de 29 de abril de 2010. Diário Oficial [da] União. Brasília, DF. 03 mai 2010; Seção 1, p. 27-30.
4. Aguilera E, Lucena R, Cárdenas S, Valcárcel M, Trullols E, Ruisánchez I. Robustness in qualitative analysis: a practical approach. *Trends Anal Chem*. 2006; 26(6):621-7.
5. Pulido A, Ruisánchez I, Boqué R, Rius FX. Uncertainty of results in routine qualitative analysis. *Trends Anal Chem*. 2003; 22(10):647-54.
6. Trullols E, Ruisánchez I, Rius FX. Validation of qualitative analytical methods. *Trends Anal Chem*. 2004; 23(2):137-45.
7. King B. In-house method validation. A guide for chemical laboratories. LGC Limited; 2003.
8. Ellison SLR, Fearn T. Characterising the performance of qualitative analytical methods: Statistics and terminology. *Trends Anal Chem*. 2005; 24(6):468-76.
9. Peters FT, Drummer OH, Musshoff F. Validation of new methods. *Forensic Sci Int*. 2007; 165:216-24.
10. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial - INMETRO. DOQ-CGCRE-008. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Rio de Janeiro: INMETRO; 2010. 35p.
11. EURACHEM. The fitness for purpose of analytical methods, a laboratory guide to method validation and related topics. Teddington: LGC; 1998. 61p.
12. European Commission - EC. Commission decision 2002/657/EC of 12 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of results. Official Journal of the European Communities; 2002, L221/8.
13. Thompson M, Ellison SLR, Wood R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure Appl Chem*. 2002; 74:835-55.
14. Ríos A, Téllez H. Reliability of binary analytical responses. *Trends Anal Chem*. 2005; 24(6):509-15.

15. Valcárcel M, Cárdenas S. Modern qualitative analysis. *Trends Anal Chem*. 2005; 24(6):467.
16. Valcárcel M, Ríos A. Traceability in analytical chemistry. *Analyst*. 1995; 120:2291-7.
17. Cárdenas S, Valcárcel M. Analytical features in qualitative analysis. *Trends Anal Chem*. 2005; 24(6):477-87.
18. Ríos A, Barceló D, Buydens L, Cárdenas S, Heydorn K, Karlberg B et al. Quality assurance of qualitative analysis in the framework of the European project 'MEQUALAN'. *Accred Qual Assur*. 2003; 8:68-77.
19. Unger-Heumann M. Strategy of analytical tests kits. *Fresenius' J Anal Chem*. 1996; 354(7-8):803-6.
20. Valcárcel M, Cárdenas S, Gallego M. Sample screening systems in analytical chemistry. *Trends Anal Chem*. 1999; 18(11):685-94.
21. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução normativa número 24, de 14 de julho de 2009. Diário Oficial [da] União. Brasília, DF, 22 jul 2009; Seção 1, p. 7-15.
22. European Commission – EC. Community Reference Laboratories residues (CRLs). Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines (initial validation and transfer). [acesso 2011 Jan 06]. Disponível em: [http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/Guideline_VValidation_Screening_en.pdf].
23. AOAC (AOAC Research Institute). AOAC® Performance Tested MethodsSM Program, Policies and procedures. [acesso 2011 Jan 20]. Disponível em: [www.aoc.org/testkits/Policies%20&%20Procedures.pdf].
24. Raugel P. Rapid food analysis and hygiene monitoring: kits, instruments, and systems. Berlin: Springer-Verlag; 1999.
25. CODEX ALIMENTARIUS. ALINORM 10/33/23. Joint FAO/WHO Food Standards Programme Codex Alimentarius Commission Thirty-third Session, Geneva, 2010 – Report of the thirty-fist session of the Codex Committee on methods of analysis and sampling, Budapeste, 2010.[acesso 2011 Jan 06]. Disponível em:[www.codexalimentarius.net/download/report/738/al33_23e.pdf].
26. Trullols E, Ruisánchez I, Rius FX, Huguet J. Validation of qualitative methods of analysis that use control samples. *Trends Anal Chem*. 2005; 24(6):516-24.
27. Milman BL, Konopelko LA. Uncertainty of Qualitative Chemical Analysis: General Methodology and Binary Test Methods. *J Anal Chem*. 2004; 59(12):1128-41.
28. Simonet BM, Ríos A, Valcárcel M. Unreliability of screening methods. *Anal Chim Acta*. 2004; 516:67-74.
29. Currie LA. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities. *Pure Appl Chem*. 1995; 67:1699-723.
30. Valcárcel M, Ríos A. Is traceability an exclusive property of analytical results? An extended approach to traceability in chemical analysis. *Fresenius' J Anal Chem*. 1997; 359: 473-5.
31. Langtonn SD, Chevennement R, Nagelkerke N, Lombard, B. Analysing collaborative trials for qualitative microbiological methods: concordance and concordance. *Int J Food Microbiol*. 2002; 75:175-81.
32. Gowik P. The validation of methods for regulatory purposes in the control of residues. *J Chromatogr A*. 2009; 1216:8051-8.
33. Armstrong N, Hibbert DB. An introduction to Bayesian methods for analyzing chemistry data. Part 1: An introduction to Bayesian theory and methods. *Chemom Intell Lab Syst*. 2009; 97:194-210.
34. Ellison SLR, Gregory S, Hardcastle WA. Quantifying uncertainty in qualitative analysis. *Analyst*. 1998; 123:1155-61.
35. Henderson AR. Assessment of clinical enzyme methodology: a probabilistic approach. *Clin Chim Acta*. 1997; 257:25-40.
36. Song R, Schlecht PC, Ashley K. Field screening test methods: performance criteria and performance characteristics. *J Hazardous Mater*. 2001; 83: 29-39.
37. Milman BL, Konopelko LA. Identification of chemical substances by testing and screening of hypotheses. *Fresenius' J Anal Chem*. 2000; 367:621-8.
38. Ellison SRL. Uncertainties in qualitative testing and analysis. *Accred Qual Assur*. 2000; 5:346-8.

Metodologia analítica para determinação de resíduos de tetraciclinas em leite: uma revisão

Analytical methodology for determination of tetracyclines residues in milk: a review

RIALA6/1397

Carolina Kato PRADO, Miguel MACHINSKI JUNIOR*

*Endereço para correspondência: Laboratório de Toxicologia, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá. Av. Colombo, 5790. Zona 07. CEP 87020-900. Maringá, PR, Brasil. e-mail: mmjunior@uem.br
Recebido: 03.05.2011 - Aceito para publicação: 09.11.2011

RESUMO

As tetraciclinas são um grupo de antimicrobianos amplamente utilizados no tratamento e prevenção de doenças infecciosas em gado leiteiro no Brasil, porém, o uso incorreto e o não cumprimento do período de carência podem resultar em resíduos destes medicamentos no leite. A presença de resíduos no leite pode causar o desenvolvimento de reações alérgicas nos consumidores desses produtos, resistência em bactérias e prejuízos na produção de produtos lácteos fermentados. Com a finalidade de fornecer informações a respeito dos métodos empregados na determinação de tetraciclinas em leite, foi realizada uma revisão das metodologias analíticas relatadas na literatura científica. Neste estudo foram abordadas as metodologias cromatográficas e de eletroforese capilar, que são comumente utilizadas.

Palavras-chave. tetraciclinas, cromatografia, eletroforese capilar, leite.

ABSTRACT

Tetracyclines are a group of antimicrobial drugs widely used in the treatment and prevention of infectious diseases in dairy cattle in Brazil. Intervals between tetracyclines administration and the withdrawal period should be complied with, in order to avoid the drug residues in milk. Milk containing antimicrobial residues might cause allergic reactions, occurrence of resistant bacteria and losses in manufacturing fermented dairy products. The present paper reviews the analytical methodology currently described in the literature for the determination of tetracyclines in milk. This study reviewed the chromatographic and the capillary electrophoresis, which have been the widely utilized methods.

Keywords. tetracyclines, chromatography, capillary electrophoresis, milk.

INTRODUÇÃO

As tetraciclina são uma classe de antibióticos que agem contra uma grande variedade de microrganismos, desde bactérias gram-positivas até gram-negativas, sendo utilizadas na medicina veterinária, no tratamento e profilaxia de infecções¹. A primeira tetraciclina descoberta foi a clortetraciclina a partir do *Streptomyces aureofaciens*, em 1948². Existem oito tetraciclina comercializadas atualmente, sendo quatro mais comumente utilizadas em tratamentos de animais destinados à alimentação humana: oxitetraciclina, tetraciclina, doxiciclina e clortetraciclina³ (Figura 1).

O uso de antimicrobianos em vacas pode levar à presença de resíduos no leite, podendo causar reações alérgicas em consumidores⁴, induzir resistência em bactérias ou ainda, afetar o desenvolvimento de culturas utilizadas na obtenção de produtos fermentados⁵. Desse modo, é importante que se identifique os níveis desses resíduos no leite para mantê-los dentro dos limites recomendados e controlar a qualidade de produtos lácteos⁶. Para tanto, testes de inibição microbiológica têm sido usados para a triagem de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos, porém, não são capazes de identificá-los e quantificá-los, assim como os testes imunológicos (ELISA e outros) que apresentam resultados falso-positivos ou falso-negativos, sendo necessárias ferramentas analíticas específicas⁷.

As etapas envolvidas no procedimento analítico para determinação de resíduos de antimicrobianos em leite compreendem: extração; limpeza; identificação/quantificação; e confirmação. A presente revisão apresenta informações sobre a metodologia analítica para a determinação de resíduos de tetraciclina no leite. Tais métodos são necessários para a fiscalização, monitoramento e pesquisa nos seus vários aspectos, como análise de alimentos, estudos epidemiológicos,

verificação da estabilidade durante o processamento de alimentos e condições para descontaminação.

Extração de tetraciclina da matriz leite

A extração consiste em um dos principais problemas na determinação de resíduos de antibióticos em leite, pois essa matriz contém altos teores de proteínas e lipídios, que podem interferir na análise dos resíduos⁸. Logo, para resolver esse problema, têm-se realizado uma desproteinização utilizando-se ácidos, como o ácido tricloroacético^{7,9}, ácido acético e metanol¹⁰, ácido oxálico e acetonitrila¹¹, ácido perclórico¹², seguida de centrifugação. A retirada de gordura de amostras de leite pode ser realizada com pipetas de Pasteur ou centrifugação, congelando-se as amostras e em seguida descongelando-as, à temperatura ambiente ou em banho de água com agitação à aproximadamente 50 °C¹³. A presença de gordura em leite pode obstruir a coluna de extração da fase sólida utilizada na etapa de limpeza, aumentando o tempo deste processo¹⁴. A Tabela 1 apresenta a evolução dos principais métodos de extração, limpeza e identificação/quantificação de resíduos de tetraciclina em leite.

Samanidou et al.¹⁵, para otimizar a extração de tetraciclina no leite, testaram ácido tricloroacético, ácido trifluoroacético, acetona e acetonitrila como agentes desproteinizantes e verificaram que os dois primeiros tiveram melhores resultados na recuperação dos analitos em amostras adicionadas.

As tetraciclina são solúveis em ácidos, bases, alcoóis e solventes orgânicos polares, sendo extraídas com solventes orgânicos como n-butanol, acetato de etila, acetona e acetonitrila³. Andersen et al.¹⁶ ao trabalharem com determinação de resíduos de tetraciclina em amostras de leite e camarão utilizaram como solvente da etapa de extração do leite o ácido succínico, obtendo bons resultados de recuperação para

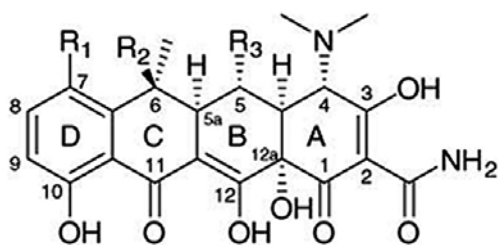


Figura 1. Estrutura química das tetraciclina

Tetraciclina	R ₁	R ₂	R ₃
Oxitetraciclina	H	OH	OH
Tetraciclina	H	OH	H
Clortetraciclina	Cl	OH	H
Doxiciclina	H	H	OH

Tabela 1. Levantamento dos principais métodos analíticos para determinação de resíduos de tetraciclina em leite

Tetraciclina	Extração	Limpeza	Equipamento	Fase móvel	Coluna	Detector	Limite de Detecção (ng/ml)	Limite de quantificação (ng/ml)	Recuperação (%)	Referência
OTC, TC, CTC, DC	TCA 10% e tampão McIlvaine	C18	HPLC	Ác. oxálico 0,01 M-MeOH-ACN (60:25:15)	C8 (5µm; 250 x 4,6mm)	DAD (365nm)	-	-	80,3 – 93,3	19
OTC, TC, CTC, DC	-	C8	HPLC	ACN-ác. acético 7% (35:65)	C8 (5µm; 250 x 4,6mm)	DAD (267 e 361nm)	-	-	80,8 – 95,5	21
OTC, TC, CTC	Tampão succinato de sódio	Resina de Sepharose	HPLC	Ác. oxálico 0,01 M-ACN-MeOH (72:20:8)	C18 (5 µm; 150 x 4,6mm)	UV-VIS (355nm)	10 – 40	10 – 50	79,7 – 90,5	13
OTC, TC, CTC	Ácido succínico	C18	HPLC	Ác. oxálico 0,01 M-ACN-MeOH (75:18:7)	C8 (5 µm; 150 x 4,6mm)	UV-VIS (370nm)	-	50	79,8 – 87,7	16
MNC, OTC, TC, CTC, DMC, DC, MTC, 4-EOTC, 4-ETC	Tampão McIlvaine	C18	HPLC	MeOH-Ác. trifluoroacético 0,01 M	C8 (5 µm; 150 x 2,1mm)	ESI-MS	1,5-10	50	74,4 – 101	34
OTC, TC, CTC, DC, 4-EOTC, 4-ETC	TCA 20%	C18	HPLC	Fase A: 1% de ác.fórmico.Fase B: MeOH-ACN (70:30)	C18 (3µm; 150 x 2,1mm)	MS	5 – 25	7,1 – 29,4	93,5 – 99,0	9
TC, OTC, 4-ETC	Tampão McIlvaine/ EDTA	C18	HPLC	Ác. oxálico 0,01 M-ACN-MeOH (150:20:20)	C18 (5 µm; 250 x 4,6mm)	DAD (365 e 280 nm)	2	-	71,5 – 91,5	14
MNC, TC, OTC, MTC, DMC, CTC, DC	Tampão oxalato e TCA 20%	C18	HPLC	Ác. oxálico 0,01 M-ACN	C18 (5 µm; 250 x 4mm)	DAD (355 nm)	-	-	93,8 – 107,2	15
CTC, OTC, TC	TCA 20% e tampão McIlvaine	C18	HPLC	Fase A: Ác. oxálico 0,01M em 5% ACN. Fase B: Ác. oxálico 0,01M em 95% ACN	C18 (3,5 µm; 150 x 2,1mm)	ESI-MS	0,5-3	-	72-106	25
OTC, DC, TC, CTC, ETC	Tampão McIlvaine	C18	HPLC	Ác. Oxálico 0,01 M- ACN	C8 (3,5 µm; 150 x 4,6mm)	FL (Em 500nm;Ex 385nm)	5,1 - 34,7	50	65-110	33
TC, OTC, CTC	Tampão McIlvaine	C18	HPLC	Tris, ác.fórmico, MeOH, ACN	C18	DAD (268nm)	7,14 - 14,9	-	89,83 – 105,2	36

OTC, TC, CTC, DC	Tampão McIl-vaine	C8	HPLC	Ác. Oxálico 0,01 M - ACN	C18 (5µm; 250 x 4,6 mm)	FL	3 - 15	-	50 - 90	18
OTC, DC, CTC, DMC, TC, MTC, 4-EOTC, 4-ETC, 4-EACTC, 4-ECTC, ACTC, ICTC, α-AOTC, β-AOTC, ATC, 4-EATC	Ác. oxálico 0,01 M em ACN	C18	HPLC	Fase A: Água. Fase B: ACN. Fase C: MeOH	C18 (3µm; 100 x 2mm)	MS	0,28 - 3,7	0,95 - 12,2	>88,6	11
OTC, TC, CTC, DC, EOTC, ETC, ECTC	TCA 20% e tampão McIl-vaine	C18	HPLC	Fase A: ác. Fórmico 0,2%. Fase B: ACN em 0,2% de ác. fórmico	C18 (3 µm; 150 x 2,1mm)	MS	-	-	94 - 103	17
TC, CTC, OTC.	TCA 30% em MeOH e tampão McIlvaine	C18	HPLC	Fase A: cloroeto de cálcio 0,075 M, acetato de sódio 0,035 M e EDTA. Fase B: MeOH-ACN (75:25)	DAD (385nm)	DAD (385nm)	20	60	83 - 107	20
TC, OTC, DC	Tampão McIl-vaine	C18	CE	Ác. cítrico 20nmol/L e Na ₂ HPO ₄ 40nmol/L	Capilar de sílica fundida (64,5 x 75 µm)	DAD (295nm)	0,5 - 1	1 - 2	81,8 - 99,1	22
TC, CTC, DC, OTC, MTC	TCA 20%	C18	HPLC	ACN-ác. oxálico 0,01 M	C18 (1,7 µm; 50 x 2,1mm)	DAD (380, 268, 229nm)	0,004 - 0,022	0,02-0,08	55,2 - 92	26
OTC, DC, TC, CTC	Ác. Perclórico	-	HPLC	Ác. oxálico 0,010 M - ACN	C18 (5 µm; 150 x 4,6mm)	DAD (360nm)	7,9 - 35,3	-	98,2 - 102,9	28
OTC, DC, TC, CTC	ACN e Sulfato de magnésio,	-	HPLC	Ác. oxálico 0,01 M - ACN	C18 (5 µm; 150 x 4,5mm)	DAD (360nm)	0,13 - 0,51	-	95,9 - 104,6	12
TC	TCA	C18	CE	NaOH 0,01 M eborato 0,02 M	Capilar de sílica fundida	DAD (200nm)	0,24	0,72	-	35

OTC = oxitetraclina; TC = tetraciclina; CTC = clortetraciclina; DC = doxiciclina; MNC = minociclina; DMC = demeclociclina; MTC = metaciclina; 4-EOTC = 4-epi-oxitetraclina; 4-ETC = 4-epi-tetraciclina; 4-EACTC = 4-epi-anidrotetraciclina; 4-EATC = 4-epianidrotetraciclina; ACTC = anidrotetraciclina; ICTC = isodortetraciclina; α-AOTC = α-epi-oxitetraclina; β-AOTC = β-epi-oxitetraclina; ATC = anidrotetraciclina; 4-EATC = 4-epianidrotetraciclina; EOTC = epioxitetraciclina; ETC = epitetraclina; ECTC = epiclortetraciclina; TCA = ácido tricloroacético; HPLC = cromatografia líquida de alta eficiência, CE = Eletroforese capilar; MeOH = metanol, ACN = acetronitrila; NaOH = hidróxido de sódio; DAD = detector de arranjo de diodos; MS = espectrometria de massas; ESJ = Ionização por eletrospray; FL = fluorescência; µm = micrômetro; mm = milímetro; ng = nanograma; ml = mililitro; nm = nanômetro; M = mol/l.

Referências apresentadas em ordem cronológica.

oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina (86; 87,7 e 79,8%, respectivamente).

Muitos estudos^{6,14,17-20} têm utilizado a solução tampão McIlvaine para extrair tetraciclina de amostras de leite. Alguns autores^{6,14,18,21} afirmam que esse tampão reduz a complexação das tetraciclina com íons metálicos e com grupos silanóis. A solução tampão é composta por 0,07 M ácido cítrico monohidratado, 0,1 M hidrogenofosfato dissódico dihidratado, 0,01 M ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) diluídos em um litro de água e o pH é ajustado para faixa desejada, com ácido fosfórico ou hidróxido de sódio⁶. As tetraciclina são facilmente destruídas em soluções alcalinas, por isso, justifica-se ajustar o pH da solução tampão para ácido²².

Chico et al.¹⁸ testaram o efeito do pH e a da concentração de EDTA na solução tampão McIlvaine e verificaram que ao diminuir o pH de 5,0 para 3,5 ocorre um aumento das taxas de recuperação e reprodutibilidade, porém em pH muito baixo pode ocorrer a precipitação do EDTA na solução. As concentrações de EDTA afetam de forma drástica a recuperação de tetraciclina e oxitetraciclina, verificando-se que a taxa de recuperação de oxitetraciclina aumentou de 20 para 60% quando a concentração de EDTA foi de 0,01 para 0,1 mol/l. Entretanto, altas concentrações desse ácido podem causar problemas de solubilidade.

A procura por procedimentos de extração que utilizem pouco ou nenhum reagente tóxico levou Furusawa²¹ a desenvolver um método de separação de tetraciclina do leite bovino, diluindo suas amostras em água à concentração de cinco vezes e passando por coluna de extração de fase sólida diretamente, resultando em amostras livres de compostos interferentes e sem necessidade da etapa de purificação. Essa metodologia permitiu taxas de recuperação maiores de 80% com desvios padrões variando de 1,3 a 4,8.

Etapas de limpeza de extratos para tetraciclina

Para reduzir interferentes e proteínas, e selecionar a concentração de analitos de interesse, é necessário que os extratos passem por uma etapa de limpeza antes da determinação de tetraciclina^{15,23}. Essa etapa é de extrema importância, pois influencia na reprodutibilidade e nas taxas de recuperação²⁴.

As técnicas mais utilizadas para purificação de antibióticos são extração líquido-líquido e extração por colunas de fase sólida, porém a segunda tem recebido maior atenção por realizar extração e purificação,

simultaneamente, em matrizes biológicas devido a sua simplicidade, curto tempo de operação e utilização de quantidades menores de solventes orgânicos²⁵.

Tsai et al.¹² trabalharam com extração líquido-líquido com partição induzida por sal (*salting-out*) utilizando Na₂SO₄ e NaCl e em seguida fizeram uma co-precipitação com hidróxido de magnésio, ajustando com água deionizada ao volume de 200 µl e filtrando em membrana de 0,45 µm, podendo ser diretamente injetado no cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE).

Wang e Li²⁶ determinaram simultaneamente 10 resíduos de antimicrobianos em leite e avaliaram diversas colunas comerciais na etapa de purificação. As colunas foram pré-lavadas com 5 ml de metanol e 5 ml de água ultra pura. A coluna empacotada com partículas C-8 (ENVI-8) resultou em menores recuperações de oxitetraciclina e tetraciclina do que as colunas do tipo C-18, tendo a coluna HLB (balanço hidrofílico-lipofílico) apresentado as melhores taxas de recuperação (acima de 80%) para todos os 10 antibióticos avaliados. Nesse mesmo trabalho, os autores testaram quatro reagentes de eluição (metanol e ácido oxálico em metanol nas concentrações de 5, 10, 15 mmol/l) e verificaram que todos resultaram em uma eficiência maior que 80,1%, sendo escolhido para o estudo 4 ml de metanol, não sendo necessária acidificação como recomendado por Gentili et al.²⁷.

No entanto, Tong et al.²² não conseguiram boa recuperação ao eluir as amostras da coluna de extração fase sólida com metanol, pois houve eluição de interferentes da matriz. Para corrigir este problema, diferentes proporções de metanol-água foram testadas, verificando-se que quanto maior a concentração de água, menos interferentes eram eluídos, porém altas concentrações de água dificultam o processo de concentração sob fluxo de nitrogênio. Desse modo, os autores testaram misturas de acetona e diclorometano como solvente de eluição e concluíram que acetona-diclorometano na proporção de 4:6 (v/v) resulta em boa recuperação para tetraciclina, doxiciclina e oxitetraciclina, eliminando as substâncias interferentes.

Identificação/quantificação de tetraciclina

A detecção e quantificação de resíduos de tetraciclina em amostras de leite são realizadas principalmente por técnicas cromatográficas e eletroforese capilar. Dentre as mais utilizadas estão a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com sistema de detecção

por absorção no ultravioleta (UV)^{19,21} ou por arranjo de diodos²⁸. A cromatografia gasosa, apesar de possuir alta resolução, necessita de uma etapa de derivação para determinação de antibióticos, por serem polares, não volatilizando suficientemente ou por serem termicamente instáveis²⁹.

Cromatografia em camada delgada e cromatografia em camada delgada de alta eficiência

Husain et al.³⁰ estudaram o comportamento cromatográfico de antibióticos em camada delgada de troca iônica inorgânica, silicato de titânio, com fases móveis orgânica, aquosa e mistura aquosa e orgânica e concluíram que houve uma boa resolução dos antimicrobianos.

Segundo Toldrá e Reig³¹, as vantagens da cromatografia em camada delgada de alta eficiência para detecção de antibióticos são o grande número de amostras para um único analito a ser analisado, o tempo reduzido para obtenção de resultados, a possibilidade de automação, a sensibilidade do método, a especificidade (dependendo da técnica de detecção) e os analitos, que separados, podem ser recuperados para as análises confirmatórias. A visualização dos componentes pode ser feita por agente cromogênico ou luz UV. Com o uso de densitômetro é possível realizar uma análise quantitativa medindo-se a intensidade relativa da mancha na placa e comparando-se com um padrão.

Apesar de ser uma técnica eficiente para detectar resíduos de antibióticos, tem-se procurado por métodos que possibilitem a identificação e quantificação de forma mais direta e sensível.

Cromatografia líquida de alta eficiência

As colunas analíticas tipicamente usadas na separação de tetraciclinas são as de fase reversa C_{18} ou C_8 , sendo que, as mais comuns são empacotadas esféricas e irregulares, geralmente com “end-capping”³². As colunas de fase reversa com “end-capping” são utilizadas preferencialmente pela sua habilidade intrínseca de reduzir interações silanóis. As tetraciclinas, devido às suas duplas ligações, oxigênio e nitrogênio substituintes, reagem com silanóis e traços de metais presentes no material de empacotamento de sílica e podem produzir picos com cauda³².

As fases móveis mais utilizadas na eluição gradiente para tetraciclinas são compostas por 0,01 mol/l de ácido oxálico e acetonitrila³³ ou $CaCl_2$ -acetato

de sódio- EDTA e metanol-acetonitrila (75:25, v/v)²⁰ ou água e mistura de metanol/acetonitrila⁹. Enquanto que, na eluição isocrática, podem ser utilizados ácido oxálico 0,01 M-acetonitrila-metanol em diferentes proporções^{13,14}.

Zhenfeng et al.³⁴ utilizaram a coluna C_8 para separação de 7 tetraciclinas e 3 produtos de biotransformação, com taxa de vazão de 0,3 ml/min com baixa pressão da coluna. Nesse estudo todas as tetraciclinas e seus produtos de biotransformação foram separados com o gradiente de metanol e solução aquosa de 0,01 M de ácido trifluoroacético.

As tetraciclinas apresentam forte absorção UV entre 270 e 360 nm em pH ácido e neutro, então o sistema de detecção mais comum é a absorção UV³. Porém, outros detectores acoplados à cromatografia líquida de alta eficiência podem ser utilizados para determinação de resíduos de tetraciclinas, como o detector eletroquímico testado por Casella e Picerno⁶. Neste estudo, os autores testaram o detector amperométrico usando eletrodo de ouro policristalino operando sob condições de detecção amperométrica e detecção amperométrica pulsada, verificando que em condições amperométricas a 1,6 V a determinação de tetraciclinas em amostras de leite foi eficiente, enquanto que, a detecção amperométrica pulsada produziu uma linha base instável e larga na região cromatográfica próxima a do solvente e onde as tetraciclinas foram eluídas, podendo ser resultado da presença de interferentes de matriz com pronunciada atividade eletroquímica.

A determinação de multirresíduos (tetraciclinas, sulfonamidas e cloranfenicol) em leite bovino foi realizada por Mamani et al.²⁰ usando cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos, em que os limites de detecção e quantificação achados foram 20 e 60 ng/ml, respectivamente para todos os antimicrobianos, concluiu-se que o método desenvolvido foi adequado para determinação de resíduo de antibióticos em leite e ainda pôde-se verificar que a estabilidade das tetraciclinas depende da estrutura química de cada uma, ou seja, a clortetraciclina sob condições de estresse alcalino foi a menos estável e a oxitetraciclina foi a menos estável ao ácido e oxidantes. Tsai et al.²⁸ também analisaram amostras de leite em cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com detector de arranjo de diodos e encontraram limites de detecção entre 7,9 e 35,3 ng/g para quatro tetraciclinas (oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina).

A fluorescência das tetraciclina depende da sua forma molecular, logo, para aumentar a sensibilidade do método, é necessário fazer uma derivação pós-coluna baseada em complexação de metais. Para analisar tetraciclina em amostras de leite bovino por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência, Spisso et al.³³ utilizaram Mg^{2+} em solução de dimetilformaldeído (alcalino) e obtiveram o máximo de fluorescência quando utilizaram uma taxa de vazão de 0,6 ml/min. Nesse trabalho, os autores encontraram limites de detecção de 5,1; 9,7 e 34,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina, respectivamente, e limites de quantificação de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para as três tetraciclina. Este método foi capaz de confirmar a presença de tetraciclina em amostras de leite.

A CLAE é uma das técnicas mais utilizadas por apresentar alta sensibilidade e possibilitar uma análise qualitativa e quantitativa eficiente, sendo possível ainda trabalhar com determinação simultânea de resíduos. Além disso, possibilita o uso do detector UV-Vis, não sendo necessário utilizar reagentes para derivação como no caso do detector e fluorescência. Assim, os detectores UV-Vis e de arranjo de diodos são mais utilizados em análises de resíduos de tetraciclina.

Eletroforese Capilar

A eletroforese capilar é uma técnica analítica de separação muito utilizada por sua capacidade de determinação de diferentes analitos simultaneamente, apresentando alta eficiência e resolução³⁵.

As principais vantagens da eletroforese capilar na determinação de resíduos de tetraciclina são simplicidade, rapidez, pouco consumo de solventes, pequena quantidade de amostra e baixa contaminação ambiental. Portanto, tem sido considerada uma alternativa efetiva ao método de CLAE, contudo, a eletroforese capilar acoplada ao arranjo de diodos é conhecida por apresentar baixa sensibilidade devido à limitada injeção de amostra e à pequena janela para detecção³⁶.

Resíduos de tetraciclina, oxitetraciclina e clortetraciclina em leite bovino foram determinados pela primeira vez em eletroforese capilar acoplada ao espectrômetro de massa por Wang et al.³⁶. A sensibilidade desse método foi 30 vezes maior do que a resultante no método de eletroforese capilar acoplada ao arranjo de fotodiodos.

Vera-Candioti et al.³⁵, analisando antibióticos em leite bovino cru em eletroforese capilar acoplada ao

detector de arranjo de diodos, concluíram que o método possui alta eficiência e tempo curto de análise (8 min), podendo ser utilizada para determinação de resíduos de antimicrobianos em amostras de leite.

A determinação simultânea de seis resíduos de antibióticos, incluindo a tetraciclina, foi realizada por Santos et al.³⁷. Nesse estudo, os autores compararam análises feitas em eletroforese capilar e CLAE, ambas acopladas ao detector UV-Vis, e concluíram que os resultados de recuperação foram semelhantes entre as duas técnicas, tendo obtido para tetraciclina a um nível de fortificação de 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 68,8% para CLAE e 66,1% para EC e a um nível de fortificação de 5,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 73,3% CLAE e 73,9% para EC. Ainda foi possível verificar qual dos dois métodos apresentaram boa repetibilidade e, embora a CLAE tenha apresentado menores limites de detecção e quantificação e, separação mais eficiente dos antibióticos, a EC utiliza menores volumes de solventes orgânicos, resultando em menor impacto ambiental.

Desse modo, verifica-se que o método por eletroforese capilar é econômico, traz menores prejuízos ao ambiente e pode ter bons resultados com uma simples troca de detector, apresentando resultados semelhantes à CLAE, que é uma das técnicas mais utilizadas para análise de resíduos de tetraciclina.

Confirmação da identidade das tetraciclina

A etapa final da metodologia analítica é a confirmação da identidade das tetraciclina. A espectrometria de massas acoplada ao cromatógrafo líquido de alta eficiência é um procedimento de confirmação altamente específico na análise de tetraciclina. Ruyck e Ridder⁹ desenvolveram um método de determinação de tetraciclina em leite bovino utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massa com uma interface de ionização de elétrons, que detectou concentrações de resíduos entre 5 e 20 $\mu\text{g}/\text{l}$.

Considerações finais

A determinação de resíduos de antimicrobianos em leite é necessária por tratar de medicamentos amplamente utilizados na medicina veterinária no Brasil e que podem trazer prejuízos para a saúde do consumidor. Além dos prejuízos econômicos para o produtor e os fabricantes de produtos lácteos. Há muitos fatores limitantes na análise de tetraciclina em leite, portanto, todas as etapas merecem atenção e cuidado. Recuperações melhores têm sido obtidas com o uso do tampão McIlvaine e colunas de

fase sólida (C-18) nas etapas de extração e limpeza. Dentre as técnicas analíticas, a mais utilizada é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com sistema de detecção por absorção no ultravioleta (UV) ou por arranjo de diodos, embora existam técnicas que apresentem bons resultados, porém, com menor sensibilidade como é o caso da eletroforese capilar, que ainda permite uma análise rápida e menos poluente. Muitos autores têm desenvolvido trabalhos para análise de tetraciclina em leite, porém, ainda há uma enorme busca e são necessárias melhorias para obtenção de metodologias rápidas, fáceis, acessíveis economicamente e ecologicamente corretas.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado ao primeiro autor.

REFERÊNCIAS

1. Chopra I, Roberts M. Tetracyclines antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2001; 65(2):232-60.
2. Duggar BM. Aureomycin: a product of the continuing search for new antibiotics. *Ann New York Acad Sci*. 1948; 51:177-81.
3. Oka H, Ito Y, Matsumoto H. Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. *J Chromatogr A*. 2000; 882(2):109-33.
4. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. Report Geneva; 1996. WHO-Food Additives Series 36;1996 [acesso 2010 Out 27]. Disponível em: [<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v36je01.htm>].
5. Cogan TM. Susceptibility of cheese and yogurt starter bacteria to antibiotics. *Appl Microbiol*. 1972; 23(5):960-5.
6. Casella IG, Picerno F. Determination of tetracycline residues by liquid chromatography coupled with electrochemical detection and solid phase extraction. *J Agric Food Chem*. 2009; 57(19):8735-41.
7. Bogianni S, D'Ascenzo G, Di Corcia A, Laganà A, Nicolardi S. A simple and rapid assay based on hot water extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry for monitoring quinolone residue in bovine milk. *Food Chem*. 2008; 108:354-60.
8. Aguilera-Luiz MM, Vidal JLM, Romero-González R, Frenich AG. Multi-residue determination of veterinary drugs in milk by ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2008; 1205:10-6.
9. Ruyck HD, Ridder HD. Determination of tetracycline antibiotics in cow's milk by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2007; 21:1511-20.
10. Msagati TAM, Nindi MN. Multiresidue determination of sulfonamides in a variety of biological matrices by supported liquid membrane with high pressure liquid chromatography-electrospray mass spectrometry detection. *Talanta*. 2004; 64:87-100.
11. Spisso BF, Araújo Junior MAG, Monteiro MA, Lima AMB, Pereira MU, Luiz RA, Nóbrega LAW. A liquid chromatography-tandem mass spectrometry confirmatory assay for the simultaneous determination of several tetracyclines in milk considering keto-enol tautomerism and epimerization phenomena. *Analytica Chimica Acta*. 2009; 656:72-84.
12. Tsai WH, Huang TC, Chen HH, Huang JJ, Hsue MH, Chuang HY et al. Determination of tetracyclines in surface water and milk by the magnesium hydroxide coprecipitation method. *J Chromatogr A*. 2010; 1217:415-8.
13. Ruela ICA, Lima JA, Souza SVC, Junqueira RG. Otimização e validação de método para determinação de resíduos de oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina em leite por cromatografia líquida de alta eficiência. *Cienc Tecnol Aliment*. 2005; 25(1):139-46.
14. Fritz JW, Zuo Y. Simultaneous determination of tetracycline, oxytetracycline, and 4-epitetracycline in milk by high-performance liquid chromatography. *Food Chem*. 2007; 105:1297-301.
15. Samanidou VF, Nikolaidou KI, Papadoyannis IN. Development and validation of an HPLC confirmatory method for the determination of seven tetracycline antibiotics residues in milk according to the European Union Decision 2002/657/EC. *J Sep Sci*. 2007; 30:2430-9.
16. Andersen WC, Roybal JE, Gonzales SA, Turnipseed SB, Pfenning AP, Kuck LR. Determination of tetracycline residues in shrimp and whole milk using liquid chromatography with ultraviolet detection and residue confirmation by mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 2005; 529:145-50.
17. Bohm DA, Stachel CS, Gowik P. Multi-method for the determination of antibiotics of different substance groups in milk and validation in accordance with Commission Decision 2002/657/EC. *J Chromatogr A*. 2009; 1216:8217-23.
18. Chico J, Meca S, Companyó R, Prat MD, Granados M. Restricted access materials for sample clean-up in the analysis of trace levels of tetracyclines by liquid chromatography application to food and environmental analysis. *J Chromatogr A*. 2008; 1181:1-8.
19. Cinquina AL, Longo F, Anastasi G, Giannetti L, Cozzani R. Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle. *J Chromatogr A*. 2003; 987:227-33.
20. Mamani MCV, Reyes FGR, Rath S. Multiresidue determination of tetracyclines, sulphonamides and chloramphenicol in bovine milk using HPLC-DAD. *Food Chem*. 2009; 117(3):545-52.
21. Furusawa N. Isolation of tetracyclines in milk using a solid-phase extracting column and water eluent. *Talanta*. 2003; 59:155-9.
22. Tong J, Rao Q, Zhu K, Jiang Z, Ding S. Simultaneous determination of five tetracycline and macrolide antibiotics in feeds using HPCE. *J Sep Sci*. 2009; 32:4254-60.

23. Yang M, Xu Y, Wang JH. Lab-on-valve system integrating a chemiluminescent entity and in situ generation of nascent bromine as oxidant for chemiluminescent determination of tetracycline. *Anal Chem*. 2006; 78:5900-5.
24. Zhang Y, Lu S, Liu W, Zhao C, Xi R. Preparation of anti-tetracycline antibodies and development of an indirect heterologous competitive enzyme-linked immunosorbent assay to detect residue of tetracycline in milk. *J Agric Food Chem*. 2007; 55:211-8.
25. Koesukwiwat U, Jayanta S, Leepipatiboon N. Solid-phase extraction for multiresidue determination of sulfonamides, tetracyclines, and pyrimethamine in bovine's milk. *J Chromatogr A*. 2007; 1149:102-11.
26. Wang L, Li YQ. Simultaneous determination of ten antibiotic residues in milk by UPLC. *Chromatographia*. 2009; 70(1/2):253-8.
27. Gentili A, Perret D, Marchese S. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for performing confirmatory analysis of veterinary drugs in animal food products. *Trends Anal Chem*. 2005; 24:704-33.
28. Tsai WH, Huang TC, Huang JJ, Hsue YH, Chuang HY. Dispersive solid-phase microextraction method for sample extraction in the analysis of four tetracyclines in water and milk samples by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. *J Chromatogr A*. 2009; 1216:2263-9.
29. Hernández F, Sancho JV, Ibáñez M, Guerrero C. Antibiotic residue determination in environmental waters by LC-MS. *Trends Anal Chem*. 2007;26(6):466-85.
30. Husain SW, Ghoulipour V, Sepahrian H. Chromatographic behaviour of antibiotics on thin layers of an inorganic ion-exchanger. *Acta Chromatographica*. 2004; 14:102-9.
31. Toldrá F, Reig M. Methods for rapid detection of chemical and veterinary drug residues in animal foods. *Trends Food Science & Technology*. 2006; 17:482-9.
32. Anderson CR, Rupp HS, Wu WH. Complexities in tetracycline analysis – chemistry, matrix extraction, cleanup, and liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 2005; 1075:23-32.
33. Spisso BF, Jesus ALO, Araújo Junior MAG, Monteiro MA. Validation of a high-performance liquid chromatographic method with fluorescence detection for the simultaneous determination of tetracyclines residues in bovine milk. *Analytica Chimica Acta*. 2007; 581:108-17.
34. Zhenfeng Y, Yueming Q, Xiuyun L, Caini J. Determination of multi-residues of tetracyclines and their metabolites in milk by high performance liquid chromatography-tandem positive-ion electrospray ionization mass spectrometry. *Chin J Anal Chem*. 2006; 34(9):1255-9.
35. Vera-Candiotti L, Olivieri AC, Goicoechea HC. Development of a novel strategy for preconcentration of antibiotic residues in milk and their quantitation by capillary electrophoresis. *Talanta*. 2010; 82:213-21.
36. Wang S, Yang P, Cheng Y. Analysis of tetracycline residue in bovine milk by CE-MS with field-amplified sample stacking. *Electrophoresis*. 2007; 28:4173-9.
37. Santos SM, Henriques M, Duarte AC, Esteves VI. Development and application of a capillary electrophoresis based method for the simultaneous screening of six antibiotics in spiked milk samples. *Talanta*. 2007; 71:731-7.

Chlamydia trachomatis e suas implicações na reprodução humana

The effects of *Chlamydia trachomatis* on human reproduction

RIALA6/1398

Antonio Sérgio VALLADÃO¹, Carolina Marques da Silva Procópio COSTA², Jocelito Alves de CAMARGO², Veronica Cristina Gomes SOARES^{3*}

*Endereço para correspondência: ¹ Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, UNESP/SP. Filiação Associação Instituto Sapiientiae de Reprodução Humana. Rua 18 de junho, 248, Jardim Morumbi, Jundiaí-SP CEP: 13209-260. Fone: (11) 8262-7196. E-mail: vcgsoares@gmail.com

² Biomedicina Universidade Paulista - UNIP Campus Jundiaí-SP.

³ Instituto de Biologia em Biologia Funcional e Molecular – Unicamp/SP. Biomedicina e Farmácia da Universidade Paulista – UNIP - Campus Jundiaí-SP.

Recebido: 21.05.2011 - Aceito para publicação: 21.10.2011

RESUMO

Chlamydia trachomatis é um parasita intracelular obrigatório e tem sido considerado como um dos problemas para a reprodução humana. Para o presente estudo, foi realizada uma busca referente aos principais fatores relacionados à infertilidade ou falhas em técnicas de reprodução assistida em virtude da infecção aguda ou crônica causada pela clamídia. Trata-se de uma revisão por levantamento retrospectivo de artigos científicos publicados nas últimas duas décadas (1984 - 2011). A maioria das infecções por clamídia em mulheres é assintomática e a infecção persistente pode ocasionar danos às tubas uterinas, infertilidade, parto prematuro, conjuntivites no recém-nascido, doença inflamatória pélvica e endometrite pós-parto. Na infecção em seres humanos por *C. trachomatis*, as proteínas expressas da família HSP60 (Chsp60) são reconhecidas como antígenos. HSP60 são também proteínas expressas pelo zigoto de mamíferos após a fertilização; portanto, nas mulheres com imunidade pré-existente induzida pelo Chsp60 pode ocorrer resposta imunológica secundária nos estágios iniciais da gravidez. O levantamento bibliográfico evidenciou a carência de artigos que comprovem que a falha de fertilização *in vitro* seja causada pela infecção por *C. trachomatis*.

Palavras-chave. *Chlamydia trachomatis*, infertilidade, FIV, reprodução humana, infecção genital.

ABSTRACT

Chlamydia trachomatis is an obligate intracellular parasite, which is believed to be one of the agents that cause problems in human reproduction. The aim of this bibliographical review was to search the main factors correlated with infertility or failure in the *in vitro* reproduction technique due to acute or chronic infections with *Ct*. This retrospective review was performed on scientific articles published during the last two decades (from 1984 to 2011). Chlamydia infections in women are mostly asymptomatic, and a persistent infection may increase the risk of injuring the fallopian tubes, causing infertility, premature birth, newborn conjunctivitis, pelvic inflammatory disease, and postpartum endometritis. *C. trachomatis* express HSP60 family proteins (Chsp60), and human recognize them as antigens. The HSP60 are also proteins expressed by mammal zygote after fertilization; consequently, women who had previously exposed to Chsp60 antigen, a secondary immune response might be produced in the early stages of pregnancy. This investigation showed a lack of papers which evidence the potential role of *C. trachomatis* infection *in vitro* fertilization failure, and also of the controversies on the best diagnostic methodologies and treatment protocols.

Keywords. *Chlamydia trachomatis*, infertility, IVE, human reproduction, genital infection.

INTRODUÇÃO

Chlamydia trachomatis é o micro-organismo sexualmente transmissível de maior frequência nos países desenvolvidos e está relacionado como um dos maiores problemas para a reprodução humana¹.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), em algumas partes do mundo desenvolvido, mais de 90% da população está infectada. Apesar dos esforços de controle de longa data, a estimativa é de que mais de 500 milhões de pessoas estejam em alto risco de infecção, mais de 140 milhões de pessoas já estão infectadas e, em torno de 6 milhões desenvolveram cegueira na África, Oriente Médio, Ásia e alguns países da América Latina como consequência direta da infecção².

A *C. trachomatis* é uma bactéria intracelular obrigatória classificada como coco Gram-negativo, com genoma de aproximadamente um milhão de pares de bases e com capacidade de codificar mais de 600 proteínas. Foram descritos 18 sorotipos distintos, sendo os responsáveis por infecções do trato genital os sorotipos D e K1.

O ciclo celular clamidial é totalmente distinto das demais bactérias. A endocitose pela célula hospedeira permite a formação de um complexo de inclusão celular ligado à membrana. A habilidade da clamídia em sofrer conversão da forma inativa para a forma metabolicamente ativa, dentro da célula hospedeira, aumenta a dificuldade para a eliminação desse micro-organismo pelo sistema imunológico³.

Mundialmente, a morbidade associada à infecção por *C. trachomatis* é bastante pronunciada³. Foi observado que 70 a 80% das infecções em mulheres são assintomáticas e, portanto, não diagnosticadas e não tratadas⁴, o que mostra uma grande inter-variabilidade entre o curso e o resultado final das infecções causadas por essa bactéria. Algumas mulheres curam a infecção adequadamente, sem o desenvolvimento de dano tecidual, enquanto outras desenvolvem uma infecção persistente o que aumenta o risco de danos às tubas uterinas e infertilidade⁵.

A patogênese da *C. trachomatis* associada aos danos tubários ainda não é totalmente compreendida. Dois mecanismos foram propostos: o primeiro, mais importante e provável, seria desencadeado por uma infecção persistente que causaria uma doença crônica de baixo grau de resposta imune, que ataca e destrói as células do hospedeiro; o segundo propõe que a própria *C. trachomatis* poderia danificar as células epiteliais tubárias do hospedeiro quando conclui o seu ciclo de

replicação e corpos elementares são liberados por citólise. O último mecanismo não parece desempenhar um papel importante em infecções crônicas porque a persistência é caracterizada pela replicação reduzida do patógeno, que permaneceria por longos períodos em fase dormente⁶.

Eggert-Kruse et al.⁷ realizaram um estudo com um total de 1303 casais com histórico de infertilidade na Alemanha e determinaram que, embora não diretamente responsáveis pelos quadros de infertilidade, as infecções por *C. trachomatis* agravaram os casos por modificarem diversos aspectos da fisiologia reprodutiva feminina e masculina. Esses fatores de infertilidade são encontrados em mais de 50% das pacientes com sorologia positiva para *C. trachomatis*, no entanto, a oclusão tubária total é rara (4%)⁷.

A infertilidade devido à obstrução da tuba uterina é uma causa comum para a indicação de fertilização *in vitro* (FIV) e transferência de embriões. A maioria das mulheres com infertilidade tubária apresenta infecção silenciosa, com evidência sorológica de exposição à *C. trachomatis*⁷, mas sem histórico de infecção sintomática pélvica ou aquisição de uma doença sexualmente transmissível (DST)⁷.

A infecção por *C. trachomatis* pode causar risco de ruptura prematura de membranas e de parto prematuro, conjuntivites e manifestações respiratórias no recém-nascido. A infecção do trato genitourinário, geralmente se manifesta de forma assintomática e como consequências desta manifestação silenciosa pode ocorrer Doença Inflamatória Pélvica (DIP), gestação ectópica e endometrite pós-parto⁸.

A Doença Inflamatória Pélvica refere-se à infecção do útero, tuba uterina e estruturas pélvicas adjacentes, que não estão associadas a cirurgias ou gravidez⁹.

A gravidez ectópica é a principal causa de morbidade e mortalidade materna em gravidez precoce¹⁰ e tem sido associada com sorologia positiva para *C. trachomatis* em vários estudos. Casos de infecção por clamídia não tratada, além de resultarem em dor pélvica crônica em mulheres, favorecem a transmissão vertical¹¹.

Em um estudo com mais de 13.000 participantes, a probabilidade de subfertilidade foi avaliada na sequência de um teste positivo para *C. trachomatis*, em amostras obtidas do colo do útero e/ou uretra. As taxas de natalidade e hora do nascimento foram comparadas entre mulheres com testes positivo e negativo. Constatou-se que quase todos os casos positivos receberam antibióticos como tratamento, assumindo-se que a probabilidade de subfertilidade deva ser maior¹².

As proteínas de choque térmico (HSP - *heat shock proteins*) são proteínas de estresse existentes em diversos organismos e estão envolvidas com a sobrevivência desses organismos em condições ambientais adversas. Durante o desenvolvimento embrionário dos mamíferos as HSPs exibem vias de expressão específicas. As HSPs e chaperonas desenvolvem funções importantes para a regulação da diferenciação, divisão e apoptose celular. Assim acredita-se que a presença de HSPs seja essencial para a multiplicação celular¹³.

Apesar de estarem, inicialmente, associadas a propriedades benéficas e fisiológicas, a expressão das HSPs tem sido associada a várias condições patológicas. Membros da família HSP 60 (Chsp60), são especialmente reconhecidos como antígenos imunodominantes de alguns patógenos, como a *C. trachomatis*³. A infecção detectada e prolongada por *C. trachomatis* poderia induzir hidrossalpinge, bem como a produção de anticorpos contra proteínas de choque térmico de clamídia que possuem 60 kDa (Chsp 60). A presença de imunidade cervical contra a proteína Chsp 60 foi associada com insucessos de FIV, possivelmente devido à indução de autoimunidade contra as proteínas de choque térmico homóloga humana de 60 kDa (HSP 60)¹⁴.

HSP60 é uma das primeiras proteínas expressas pelo zigoto de mamíferos após a fertilização e está presente tanto nos estágios embrionários iniciais quanto logo após o parto¹³. Portanto, mulheres com imunidade pré-existente para Chsp60, nos estágios iniciais de gravidez podem sofrer reativação de linfócitos sensibilizados contra HSP60 por meio de uma reação cruzada. A resposta imunológica pró-inflamatória subsequente pode promover rejeição imunológica ao embrião. Resposta imune dirigida contra HSP60 tem sido associada a abortos espontâneos e dificulta o sucesso de técnicas de fertilização¹⁵.

Spandorfer et al.¹⁶ realizaram um estudo correlacionando infecções silenciosas por clamídia, infertilidade tubária e a presença de anticorpos contra as Chsp 60 e insucessos com técnicas de FIV. Os resultados demonstraram que pelo menos 75% das mulheres no estudo, que eram incapazes de engravidar devido à oclusão das tubas uterinas, não tinham história prévia de DST. No entanto, a oclusão tubária foi fortemente associada aos anticorpos circulantes para os antígenos estruturais de *C. trachomatis*. Isto destaca o caráter assintomático das infecções do trato genital e a relação entre o "silêncio" da DIP assintomática e infertilidade tubária. Os resultados ressaltam a necessidade de técnicas de rastreamento para

infecções assintomáticas em mulheres sexualmente ativas, podendo auxiliar no controle e tratamento da paciente, bem como a busca desse micro-organismo em casais com problemas de fertilidade¹⁶.

A *C. trachomatis* atinge pessoas de ambos os sexos e tal infecção independe da idade, número de parceiros e condições socioeconômicas, entretanto a infecção possui um maior impacto na saúde reprodutiva das mulheres¹.

No que diz respeito à sorologia positiva para clamídia nos homens, os resultados também foram significativamente correlacionados com um fator para danos tubário em suas parceiras, o que sugere a infecção como causa ou cofator de infertilidade dos casais. No entanto, os demais fatores envolvidos com a fertilidade masculina como: volume de ejaculação, pH, viabilidade e concentração de frutose no líquido seminífero e motilidade de espermatozoides não estavam alterados em pacientes positivos para infecção⁷.

Os potenciais mecanismos para o efeito na fertilidade de infecções por clamídia em homens não foram ainda bem descritos, porém existem teorias que sugerem efeitos diretos e/ou indiretos em espermatozoides ou inflamação dos túbulos acarretando obstrução e/ou danos epiteliais que resultam em diminuição da espermatogênese¹⁷.

Diagnóstico

Alguns critérios clínicos objetivos como secreção mucopurulenta endocervical, eritema e sangramento de mucosa podem ser utilizados para o diagnóstico de infecção por *C. trachomatis*, no entanto, a maioria dos casos de infecção clamidial são assintomáticos ou minimamente sintomáticos, e não demonstram sinais clínicos específicos¹⁸.

Os principais testes para o diagnóstico de infecção por clamídia são a pesquisa de antígenos, por meio de cultura, imunofluorescência direta (IFD), imunoensaio enzimático, pesquisa de ácidos nucleicos por métodos de amplificação (PCR) ou pesquisa de anticorpos por imunofluorescência indireta (IFI), microimunofluorescência indireta e imunoensaio enzimático indireto⁸.

A técnica considerada padrão ouro para teste de anticorpos específicos para clamídia é a microimunofluorescência (MIF), porém esta é muito trabalhosa e precisa de muito treinamento do analista para uma correta interpretação dos dados, o que limita a sua utilização pela maioria dos laboratórios¹⁹.

Anticorpos Anticlamidial (IgG CAT) são utilizados como marcadores de contato prévio com estes micro-organismos²⁰. Desde que a associação entre as infecções por *C. trachomatis*, a presença de IgG em soro e a patologia tubária foi observada, o teste sorológico para pesquisa de anticorpo IgG (CAT) foi introduzido como padrão para triagem de DIP no tratamento de infertilidade humana²⁰.

Infecções recorrentes por *C. trachomatis* afetam principalmente os adolescentes e persistem por uma década ou mais. Estas infecções podem permanecer silenciosas até que as mulheres apresentem subfertilidade ou infertilidade. Os anticorpos séricos IgG são conhecidos por permanecer detectáveis durante muitos anos²¹.

Chlamydia hsp 60 (chsp60) é uma proteína clamidial gênero específica que pode ser utilizada pelo sistema imune como fator antigênico. A presença de anticorpos para chsp60 foi sugerida como marcadora para inflamação crônica e pode ser um bom indicador para o risco de patologia tubária²².

Impacto na Reprodução

Uma melhor compreensão do papel de infecções persistentes por *C. trachomatis* na infertilidade, associada ao fator tubário, pode ser útil na otimização de técnicas de fertilização, incorporando-se os testes de seleção para persistência de infecções de *C. trachomatis*.

Mesmo sendo um assunto de interesse, os trabalhos presentes em bancos de dados (SciELO, Pubmed, Bireme) são genéricos quanto ao assunto e deixam algumas perguntas sem respostas, entre elas: qual o melhor exame para detectar infecções silenciosas? Quanto tempo após o tratamento recomenda-se a fertilização? Qual a porcentagem de insucessos na fertilização em decorrência de infecções por *C. Trachomatis*?

Nos últimos 25 anos cerca de 11.780 artigos foram publicados sobre *C. trachomatis*, no entanto, quando o termo é associado à fertilização (78) ou falha do processo de fertilização *in vitro* (8), o número de publicações sofre uma drástica redução. Estes dados demonstram que existe uma carência em relação ao número de artigos publicados sobre infecções por *C. trachomatis* e insucessos de fertilização *in vitro*. Esse fato é curioso, pois este é um assunto de grande importância, visto que infecções associadas à essa bactéria têm sido constantemente relacionadas aos problemas de fertilidade humana.

Esses artigos estão distribuídos em diversas áreas do conhecimento como: medicina, imunologia e

microbiologia, bioquímica, genética e biologia molecular, farmacologia, toxicologia, farmácia e veterinária, porém poucas revistas especializadas no assunto publicaram sobre o tema. Revistas científicas como: Human Reproduction, Human Reproduction Update, Ceska Gynekologie e Fertility Sterility, publicaram em média apenas cinco artigos sobre o tema *C. trachomatis* no período referido.

Outras palavras-chave foram associadas a infecções por *C. trachomatis*. As mais recorrentes, no período avaliado, foram: doença sexualmente transmissível (508) e infecção sexualmente transmissível (463). No entanto, novas pesquisas são necessárias, principalmente aquelas relacionadas à conduta clínica após uma infecção por *C. trachomatis* para garantir que a fertilização seja bem sucedida.

Técnicas de fertilização *in vitro* são dispendiosas e requerem dedicação especial por parte do casal. Esse esforço pode ser perdido em decorrência das falhas na conduta pré-fertilização, como a falta de diagnóstico para infecções por *C. trachomatis*.

Os ginecologistas, muitas vezes, conseguem estimar as chances de sucesso com os procedimentos e gravidez, bem como a melhor conduta para a fertilização, com base em experiências clínicas. No entanto, um estudo relatou que essa estimativa é mais assertiva para casos de gravidez espontânea quando comparada aos casos de gravidez após fertilização *in vitro*²³. A importância de estimar as chances de concepção após a conclusão da fertilização gerou trabalhos baseados nas taxas de sucesso do tratamento no histórico dos pacientes, principalmente no diagnóstico das DSTs, entre elas a infecção por *C. trachomatis*²⁴. Essa previsão pode diminuir o estresse e a angústia após a fertilização e ajudar no sucesso da técnica empregada.

Diversos artigos descrevem a infecção por *C. trachomatis* como a principal causa de infertilidade e, também sua associação com a falha de FIV e consequente aborto espontâneo¹⁹. No entanto, não se encontram artigos epidemiológicos que comprovem especificamente que a falha de FIV seja causada pela infecção por essa bactéria.

O problema para os centros especializados em reprodução assistida reside na avaliação de pacientes que desconhecem se tiveram ou não infecção por clamídia ou ainda, que fizeram tratamento com antibióticos, mas que apresentam sequelas condizentes com infecções assintomáticas causadas por clamídia, uma vez que a reativação da doença pode levar ao insucesso das técnicas de fertilização.

Embora uma vasta revisão da literatura tenha sido realizada, os resultados apresentados nestes artigos são contraditórios, concluindo que, ambos os anticorpos anti-estrutural clamídia e anti-chsp60, não podem ser considerados padrão ouro para prever o resultado de FIV em casais infectados por *C. trachomatis*. Portanto, a fim de definir o melhor marcador, ou a melhor associação de marcadores, estudos mais aprofundados são necessários²⁵.

A busca de informações sobre os mecanismos pelos quais as infecções causadas por *C. trachomatis* provocam insucessos em FIV direcionam a investigação para causas relacionadas às sequelas ou à infertilidade masculina. Raros trabalhos abordam o problema do ponto de vista da infecção masculina, entretanto, quando a profilaxia é necessária, o tratamento do casal é recomendado.

Os baixos índices de publicação sobre infecção masculina por clamídia pode ser justificado pelo tratamento prévio de centrifugação do material seminal que é realizado na técnica de FIV. No entanto, Al-Mously et al.²⁶ realizaram um experimento com 100 amostras de sêmen, sendo que 13 continham níveis detectáveis de DNA de *C. trachomatis* e, em apenas 7 amostras, este componente foi completamente removido depois da lavagem do esperma. Nas 6 amostras restantes com a presença de DNA positivo, o número de cópias após preparação variou, mas permaneceu capaz de provocar uma infecção *in vitro*. Como conclusão o trabalho alerta para o fato de que infecções não diagnosticadas por *C. trachomatis* em homens poderia levar à infecção ou contaminação do sistema de cultura pela FIV, pois o método de lavagem de esperma não é 100% eficaz²⁶.

Outro ponto relevante é a contaminação após a fertilização, ou a reativação da infecção. Este fato pode ocorrer caso o parceiro não seja tratado para infecção clamidial. Caso a exposição aconteça durante a gravidez, pode ocorrer ectopia cervical. A corioamnionite pode ocorrer devido à emissão de citocinas no líquido amniótico, promovendo secreção de prostaglandinas (PGE2), responsável por contrações uterinas que levam ao aborto espontâneo²⁵. Em mães não tratadas, o fator de risco de contaminação para o feto, que não é totalmente protegido pelos anticorpos maternos, é de 20-50% para conjuntivite e 10-20% para síndrome da doença respiratória com pneumonia. Estes resultados reforçam a necessidade de detecção de clamídia entre 24-26 semanas de gestação²⁷.

O levantamento realizado demonstrou que embora muito se saiba sobre a infertilidade por oclusão de tuba uterina em infecções silenciosas decorrentes de

reações autoimunes. Ainda não existe consenso quanto ao melhor exame para detecção dessas infecções e qual a melhor conduta para evitar falhas em técnicas de fertilização *in vitro*. A falha em FIV por infecções por clamídia é um assunto relevante que, portanto, necessita ainda de extensa pesquisa.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- *C. trachomatis* está relacionada como um dos maiores problemas para a reprodução humana, podendo causar ruptura de membranas, parto prematuro, DIP, gestação ectópica e endometrite pós-parto;
- Foi observado, de acordo com a literatura, que a maioria dos homens e das mulheres apresenta infecção assintomática;
- O mecanismo de infertilidade está associado à presença de autoanticorpos contra hsp60, induzidos por infecções silenciosas de clamídia, responsáveis por danificar o embrião. Isso ocorre quando os embriões em estágios iniciais de desenvolvimento expressam hsp60 que são reconhecidas pelos anticorpos maternos, levando à destruição do embrião e conseqüente falha da FIV;
- Os principais testes para diagnóstico de infecção por clamídia são imunofluorescência direta (IFD), pesquisa de ácidos nucléicos por método de amplificação (PCR), imunofluorescência indireta (IFI), microimunofluorescência (MIF), imunoenensaio enzimático indireto e pesquisa de anticorpos para Chsp60;
- Há poucos trabalhos que discorrem sobre o melhor exame para a detecção de infecções silenciosas, o tempo recomendado para a fertilização após tratamento e a porcentagem de insucessos em fertilização em decorrência de infecção por *C. trachomatis*.

REFERÊNCIAS

1. Guzzatto P, Scarton J, Anzolch KJ, Oliveira OLM. Prevalência de *Chlamydia trachomatis* em pacientes com leucocitospermia. *RBAC*. 2010; 42(3):205-7.
2. World Health Organization (WHO). Department of Reproductive Health and Research. Sexually transmitted and other reproductive tract infections: a guide to essential practice. 2005; 92(4):196.
3. Paavonen J, Eggert-Kruse W. *Chlamydia trachomatis*: impact on human reproduction. *Hum Reprod Update*. 1999; 5(5):433-47.
4. Carter TC, Olney RS, Mitchell AA, Romitti PA, Bell EM, Druschel CM, et al. Maternal self-reported genital tract infections during

- pregnancy and the risk of selected birth defects. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2011; 91(2):108-16.
5. Den Hartog JE, Morré SA, Land JA. *Chlamydia trachomatis*-associated tubal factor subfertility: Immunogenetic aspects and serological screening. *Hum Reprod Update.* 2006; 12(6):719-30.
 6. Mpiga P, Ravaoarino M. *Chlamydia trachomatis* persistence: an update. *Microbiol Res.* 2006; 161(1):9-19.
 7. Eggert-Kruse W, Rohr G, Demirakca T, Rusu R, Näher H, Petzoldt D, et al. Chlamydial serology in 1303 asymptomatic subfertile couples. *Hum Reprod.* 1997; 12(7):1464-75.
 8. Carvalho NSd, Pegoraro MG, Takimura M, Oliveira FCJ. Prevalência da Infecção por *Chlamydia trachomatis* em Parturientes Jovens Atendidas em uma Maternidade Pública. DST - J Bras Doenças Sex Transm. 2010; 22(3):141-4.
 9. McCormack WM. Pelvic inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1994; 330(2):115-9
 10. Beatty WL, Byrne GI, Morrison RP. Repeated and persistent infection with *Chlamydia* and the development of chronic inflammation and disease. *Trends Microbiol.* 1994; 2(3):94-8.
 11. Refaat B, Al-Azemi M, Geary I, Eley A, Ledger W. Role of activins and inducible nitric oxide in the pathogenesis of ectopic pregnancy in patients with or without *Chlamydia trachomatis* infection. *Clin Vaccine Immunol.* 2009; 16(10):1493-503.
 12. Andersen B, Østergaard L, Puho E, Skriver MV, Schönheyder HC. Ectopic pregnancies and reproductive capacity after *Chlamydia trachomatis* positive and negative test results: a historical follow-up study. *Sex Transm Dis.* 2005; 32(6):377-81.
 13. Neuer A, Spandorfer SD, Giraldo P, Dieterle S, Rosenwaks Z, Witkin SS. The role of heat shock proteins in reproduction. *Hum Reprod Update.* 2000; 6(2):149-59.
 14. Neuer A, Mele C, Liu HC, Rosenwaks Z, Witkin SS. Monoclonal antibodies to mammalian heat shock proteins impair mouse embryo development in vitro. *Hum Reprod.* 1998; 13(4):987-90.
 15. Kligman I, Jeremias J, Rosenwaks Z, Witkin SS. Cell-mediated immunity to human and *Escherichia coli* 60-kDa heat shock protein in women: association with a history of spontaneous abortion and endometriosis. *Am J Reprod Immunol.* 1998; 40(1):32-6.
 16. Spandorfer SD, Neuer A, LaVerda D, Byrne G, Liu HC, Rosenwaks Z, et al. Previously undetected *Chlamydia trachomatis* infection, immunity to heat shock proteins and tubal occlusion in women undergoing in-vitro fertilization. *Hum Reprod.* 1999; 14(1):60-4.
 17. Cunningham KA, Beagley KW. Male genital tract chlamydial infection: implications for pathology and infertility. *Biol Reprod.* 2008; 79(2):180-9.
 18. Brunham RC, Paavonen J, Stevens CE, Kiviat N, Kuo CC, Critchlow CW, et al. Mucopurulent cervicitis--the ignored counterpart in women of urethritis in men. *N Engl J Med.* 1984; 311(1):1-6.
 19. Witkin SS, Linhares IM. *Chlamydia trachomatis* in subfertile women undergoing uterine instrumentation: an alternative to direct microbial testing or prophylactic antibiotic treatment. *Hum Reprod.* 2002; 17(8):1938-41.
 20. Punnonen R, Terho P, Nikkanen V, Meurman O. Chlamydial serology in infertile women by immunofluorescence. *Fertil Steril.* 1979; 31(6):656-9.
 21. Gijzen AP, Land JA, Goossens VJ, Slobbe ME, Bruggeman CA. *Chlamydia* antibody testing in screening for tubal factor subfertility: the significance of IgG antibody decline over time. *Hum Reprod.* 2002; 17(3):699-703.
 22. Kaufmann SH. Heat shock proteins and the immune response. *Immunol Today.* 1990; 11(4):129-36.
 23. Wiegerinck MA, Bongers MY, Mol BW, Heineman MJ. How concordant are the estimated rates of natural conception and in-vitro fertilization/embryo transfer success? *Hum Reprod.* 1999; 14(3):689-93.
 24. Gnoth C, Godehardt E, Frank-Herrmann P, Friol K, Tigges J, Freundl G. Definition and prevalence of subfertility and infertility. *Hum Reprod.* 2005; 20(5):1144-7.
 25. Askienazy-Elbhar M. Immune consequences of *Chlamydia* infections in pregnancy and in vitro fertilization outcome. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 1996; 4(3):143-8.
 26. Al-Mously N, Cross NA, Eley A, Pacey AA. Real-time polymerase chain reaction shows that density centrifugation does not always remove *Chlamydia trachomatis* from human semen. *Fertil Steril.* 2009; 92(5):1606-15.
 27. Bell TA, Stamm WE, Kuo CC, Wang SP, Holmes KK, Grayston JT. Risk of perinatal transmission of *Chlamydia trachomatis* by mode of delivery. *J Infect.* 1994; 29(2):165-9.

Rotulagem de alimentos: avaliação da conformidade frente à legislação e propostas para a sua melhoria

Food labeling: conformity evaluation with legislation and proposals for improvements

RIALA6/1399

Ana Carolina de Lima SMITH*, Ligia Bicudo de ALMEIDA-MURADIAN

*Endereço para correspondência: Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 14, Cidade Universitária, Butantã, São Paulo, SP, Brasil. Tel: 3091-3684. E-mail: ligiabi@usp.br

Recebido: 04.10.2010 – Aceito para publicação: 19.12.2011

RESUMO

O enorme desenvolvimento que tem ocorrido na área alimentícia gera a necessidade de legislações que regulamentem o setor nos âmbitos de qualidade, segurança e rotulagem. Entretanto, o cumprimento das legislações muitas vezes não tem sido observado. Este trabalho teve o objetivo de verificar a conformidade da rotulagem de 13 categorias de produtos alimentícios comercializados na cidade de São Paulo frente à legislação brasileira em vigor e apresentar propostas para sua melhoria. Dos 52 rótulos analisados, 80,8% apresentaram no mínimo um tipo de não conformidade frente à legislação vigente e, apenas 19,2% estavam plenamente de acordo com o estabelecido na legislação. A categoria que apresentou maior número de itens não-conformes foi a categoria de alimentos para praticantes de atividade física. Com relação ao número de rótulos não conformes, quatro categorias (bombons, leites UHT, biscoitos e alimentos infantis) apresentaram 100% de rótulos não conformes. Já com relação ao tipo de irregularidade, a tabela nutricional foi o item avaliado que apresentou maior número de irregularidades. Desta forma, alguns itens da legislação são discutidos, a fim de proporcionar uma melhor adequação dos rótulos às necessidades dos consumidores.

Palavras-chave. alimento, rotulagem, legislação sanitária, consumidor.

ABSTRACT

The huge development that has occurred in the food sector generates the necessity of laws regulating the industry in the areas of quality, safety and labeling. However, compliance with legislation is not always observed. The study verified labeling conformity in 13 categories of food products sold in São Paulo city with Brazilian legislation and proposed suggestions for their improvement. Among 52 labels analyzed, 80.8% presented at least one type of non-conformity with legislation and only 19.2% were fully in accordance with the established in the legislation. The category that presented the largest amount of non-compliant items was the food category for practitioners of physical activity. With respect to the number of non-compliant labels, four categories (chocolates, UHT milk, biscuits and infant food) presented 100% non-compliant labels. Regarding the type of non-conformity, the nutritional table was the item analyzed which presented the largest number of irregularities. Thus, some items of the legislation are discussed in order to provide a proper adequacy of labels to consumer's needs.

Keywords. food, labeling, legislation, label, consumer.

INTRODUÇÃO

É fundamental a existência de legislações que estabeleçam critérios de qualidade que compreendam todas as etapas de produção, processamento, armazenamento, conservação e exposição à venda. As normas devem ser constantemente atualizadas e revisadas, de modo a atender o dinamismo crescente do desenvolvimento tecnológico¹.

A importância da existência de legislações que regulamentem os padrões de identidade e qualidade e que determinem as normas de rotulagem dos produtos alimentícios torna-se cada vez mais evidente pelo enorme desenvolvimento que tem ocorrido no setor alimentício. Este crescimento pode ser observado nos dados de faturamento da indústria de alimentos, R\$112 bilhões em 2001 para R\$184,6 bilhões² em 2005. Também se podem citar os dados do IBGE 2008, que apresentou distribuição de consumo de alimentos pela população brasileira de 85% de alimentos industrializados e somente 15% de alimentos *in natura*³.

Com este grande desenvolvimento do setor alimentício, o direito do consumidor à informação sobre o valor nutritivo de cada alimento e das condições sanitárias dos mesmos já tem provocado polêmica quanto ao grau em que esta informação deverá ser obrigatoriamente fornecida ao consumidor. Na elaboração de um rótulo de um alimento, deve sempre existir preocupação com o consumidor e, as informações devem estar ao alcance da sua compreensão¹.

Teoricamente, as legislações deveriam ser suficientes para coibir qualquer desentendimento entre as partes envolvidas: setor industrial e consumidores. Acontece porém, que na prática uma das partes não respeita as regras estabelecidas⁴.

Facilmente observa-se a não conformidade de muitos produtos comercializados livremente. Como exemplo, pode-se citar um estudo descrito por Maio et al.⁵ para avaliação dos teores de minerais e contaminantes inorgânicos em águas minerais o qual identificou que 63% das marcas de águas minerais nacionais não atendiam a legislação com relação à declaração do teor de minerais na rotulagem.

O trabalho de Araújo e Araújo⁶ pesquisaram, 27 produtos lácteos enriquecidos com vitamina D, cálcio e ferro, comercializados em Brasília/DF e, verificaram que 23% dos produtos comercializados como enriquecidos, não atendiam às especificações legais com relação às

informações nutricionais de rotulagem e que 22% utilizavam atributos não previstos na legislação.

Desde o início da década de 1980, a conscientização do público a respeito da relação entre dieta e saúde tem aumentado marcadamente. Atualmente, a maioria das pessoas já considera que a dieta é um importante determinante da saúde. Entretanto, há muita informação em rótulos alimentícios que pode ser enganosa, considerando-se o frequente uso de palavras ambíguas, confusas e termos vagos⁷.

De acordo com Coutinho⁸, 43% dos consumidores brasileiros, no ato da compra dos alimentos, buscam nas embalagens informações sobre os benefícios para a saúde. Muitos entrevistados afirmaram acreditar na capacidade de prevenção e controle que a alimentação pode exercer sobre doenças como o câncer, a hipertensão arterial, a obesidade e as doenças do coração. Outro estudo, realizado com frequentadores de supermercados, concluiu que 61% dos entrevistados liam os rótulos dos produtos que compravam; porém, a autora ressaltou que tal conduta referia-se, particularmente, àqueles consumidores com problemas de saúde ou de classe social mais elevada⁹.

Vários estudos identificaram a dificuldade do consumidor em compreender as informações disponibilizadas nos rótulos dos alimentos por não serem claras. Além disso, muitos consumidores não conheciam a rotulagem nutricional e, alguns não demonstraram interesse por esses dados¹⁰.

Medidas legislativas, como é o caso das regulamentações sobre rotulagem alimentar, são vistas como importantes atividades de promoção de saúde. O uso destas justifica-se como modo de auxiliar as pessoas a melhorar suas dietas⁷. Ademais, é importante atualizar regulamentos já ultrapassados, incorporar conhecimento novo, preencher lacunas e recomendar ações integradas e contínuas de educação alimentar subsidiadas por pesquisas científicas. A legislação na área de alimentos deve ser vista como estratégia para auxiliar na redução dos índices de obesidade, das deficiências nutricionais e das doenças crônicas não transmissíveis associadas ao padrão de consumo¹¹.

Portanto, é importante a identificação dos itens da legislação que requerem maior aprimoramento, uma vez que o setor necessita de estudos que disponibilizem informações para uma melhor adequação dos rótulos às necessidades dos consumidores.

Este estudo tem o objetivo de verificar a conformidade da rotulagem de algumas categorias de

produtos alimentícios comercializados na cidade de São Paulo frente à legislação brasileira em vigor, analisando dados quantitativos e qualitativos da conformidade e da não conformidade dos rótulos dos alimentos frente à legislação brasileira e apresentar propostas para melhoria das normas atualmente em vigor.

MATERIAL E MÉTODOS

Conforme os levantamentos bibliográficos realizados pelo Departamento Econômico da Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação (ABIA) e pela Associação Brasileira da Indústria de Alimentos para Fins Especiais e Congêneres (ABIAD), foram escolhidas 11 categorias de produtos de grande consumo pela população e duas categorias de produtos para grupos populacionais específicos.

Foram analisados rótulos de produtos das seguintes categorias de alimentos: sorvetes, picolés, sobremesas congeladas, chocolate ao leite, bombons, chocolate branco, leites UHT, leites em pó, biscoitos, produtos refrigerados (iogurtes e leites fermentados), alimentos à base de soja, alimentos para praticantes de atividade física (repositores hidroeletrólitos e repositores energéticos) e alimentos infantis (cereais para alimentação infantil e alimento nutricionalmente completo para nutrição enteral ou oral para crianças).

Para cada categoria de alimento foram analisados os rótulos de quatro marcas diferentes de produto, tanto de grandes como de menores produtores e importadores, totalizando um estudo completo de 52 rótulos adquiridos em mercados e supermercados da cidade de São Paulo.

Para verificação da conformidade e não conformidade da rotulagem foram utilizadas todas as legislações em vigor pertinentes aos produtos estudados.

Para rotulagem geral, utilizaram-se as legislações do Ministério da Saúde - Resolução RDC nº 259, de 20 de setembro de 2002¹², do Ministério da Agricultura - Instrução Normativa nº 22, de 24 de novembro de 2005¹³ e do INMETRO - Portaria nº 157, de 19 de agosto de 2002¹⁴.

Quanto à declaração da informação nutricional, foram utilizadas as legislações: Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003¹⁵; Resolução RDC nº 359, de 23 de dezembro de 2003¹⁶; e Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005¹⁷.

Além destas legislações citadas, foram utilizados também: normas básicas de alimentos; normas que regulamentam o registro de produtos alimentícios; os

Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade (Padrão de Identidade e Qualidade - PIQ), que estabelecem os requisitos a que deve atender cada tipo de alimento; os Regulamentos Técnicos que estabelecem limites máximos de utilização de Aditivos; e os Regulamentos Técnicos Específicos, que determinam normas para alimentos com alguma finalidade ou característica específica, como os regulamentos de alimentos com informação nutricional complementar e alimentos para fins especiais.

A análise foi realizada com relação a toda legislação brasileira em vigor pertinente para cada um dos produtos por meio de um questionário criado exclusivamente para esta finalidade.

O questionário foi elaborado considerando-se os seguintes critérios: tamanho de letra; legibilidade dos textos; denominação; marca; indicação de peso líquido/conteúdo; identificação de origem; informação nutricional complementar; alegações funcionais e/ou de saúde; lista de ingredientes; utilização de aditivos; modo de preparo; modo de conservação; modo de conservação após aberta a embalagem; data de validade; validade após aberta a embalagem; data de fabricação; identificação do lote; número de registro; carimbo do Serviço de Inspeção Federal - SIF; dados do fabricante; expressão "Contém Glúten" ou "Não Contém Glúten"; expressão "Contém Fenilalanina" (para produtos com aspartame em sua formulação); frases relativas ao uso de corantes artificiais; tabela nutricional; figuras, símbolos, ilustrações e desenhos; frases específicas dos Regulamentos Técnicos; frases não previstas nos Regulamentos Técnicos; frases/ilustrações para alimentos para lactentes e crianças de primeira infância.

Com relação à análise estatística dos resultados obtidos, foi realizada análise estatística de comparação entre as categorias de produtos e entre os tipos de irregularidades pelo teste apropriado para avaliar diferenças de proporções em dados provenientes de contagens, Qui-Quadrado ou Exato de Fisher, quando uma das casas das tabelas 2X2 apresentasse valores inferiores a cinco.

Além disso, em busca de uma visão global acerca da relação entre os tipos de irregularidades encontradas e as categorias de produtos analisadas, realizou-se uma análise multivariada dos dados. Realizou-se Análise de Variância e Análises de Agrupamento ("Cluster") que permitiram averiguar a existência de padrões de produtos de acordo com os erros de rotulagem que os mesmos apresentaram. Para tanto, realizou-se a Análise de Agrupamento Hierárquica adotando-se o método

de Ward's e o coeficiente de dissimilaridade distância Euclidiana (quanto menor a distância entre dois locais, mais similares eles são)¹⁸ e, também a Análise de Agrupamento não hierárquica (K-means).

Esse conjunto de análises possibilitou o agrupamento de categorias de produtos com itens irregulares em comum e, seus respectivos efeitos em subgrupos com a máxima homogeneidade entre as categorias no grupo e máxima heterogeneidade entre os grupos¹⁸.

Os resultados foram expressos em porcentagem e as análises estatísticas realizadas adotando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Para expressão dos resultados foram enfatizadas as diferenças que representam maior significância experimental. Todas as análises estatísticas e exploratórias foram realizadas pelo programa STATISTICA 8.0¹⁹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Panorama geral

Considerando os 52 rótulos analisados, 42 rótulos apresentaram no mínimo um tipo de não conformidade frente à legislação, o que representa 80,8% dos rótulos analisados. Apenas 10 rótulos estavam plenamente de acordo com a legislação e, portanto, apenas 19,2% dos rótulos analisados atendem ao estabelecido na legislação brasileira.

Rótulos conformes e não conformes por categoria

A Figura 1 apresenta os resultados de conformidade e não conformidade dentro de cada uma das categorias de alimentos analisadas.

É possível observar que todas as categorias apresentaram grande quantidade de rótulos não conformes. Identificou-se que das treze categorias analisadas, quatro delas (bombons, leites UHT, biscoitos e alimentos infantis) apresentaram 100% de rótulos não conformes, significando que para estas quatro categorias de produtos, todos os rótulos analisados estavam não conformes.

Isto se deve a alguns erros que se repetem comumente dentro de uma mesma categoria de produtos. Os alimentos infantis são um exemplo claro desta repetição de irregularidades, uma vez que apresentaram erros comuns de utilização de ilustrações e frases não permitidas pelos Regulamentos técnicos e não conformidades ou ausência das frases exigidas em produtos para crianças de primeira infância.



Figura 1. Representação gráfica dos rótulos conformes e não conformes por categoria

A maioria das categorias analisadas apresentou 75% de rótulos não conformes. Apenas uma categoria de produtos, sobremesas congeladas, apresentou 50% de rótulos conformes e 50% de rótulos não conformes.

Itens não conformes

Na Figura 2 estão ilustrados os números de irregularidades encontradas dentro de cada uma das categorias analisadas, ou seja, o número de itens não conformes que cada categoria de produtos apresentou.

Pode-se observar que todas as categorias apresentaram irregularidades quanto à legislação brasileira vigente, somando um total de 217 itens não conformes.

Entre as categorias de produtos analisados, é possível identificar que a categoria que mais apresentou irregularidades foi a categoria de alimentos para praticantes de atividade física. Isso se deve, principalmente, por esta ser uma categoria com grande número de alimentos importados, os quais muitas vezes não seguiam a legislação brasileira de rotulagem e, portanto, contrariaram as determinações legais de que os rótulos devem trazer todas as informações obrigatórias do país onde serão comercializados.

As categorias picolés, alimentos à base de soja, leites em pó, biscoitos e alimentos infantis também apresentaram grande número de irregularidades.

A categoria que apresentou menor número de irregularidades foi a categoria de bombons, em que foram identificados cinco itens não conformes.

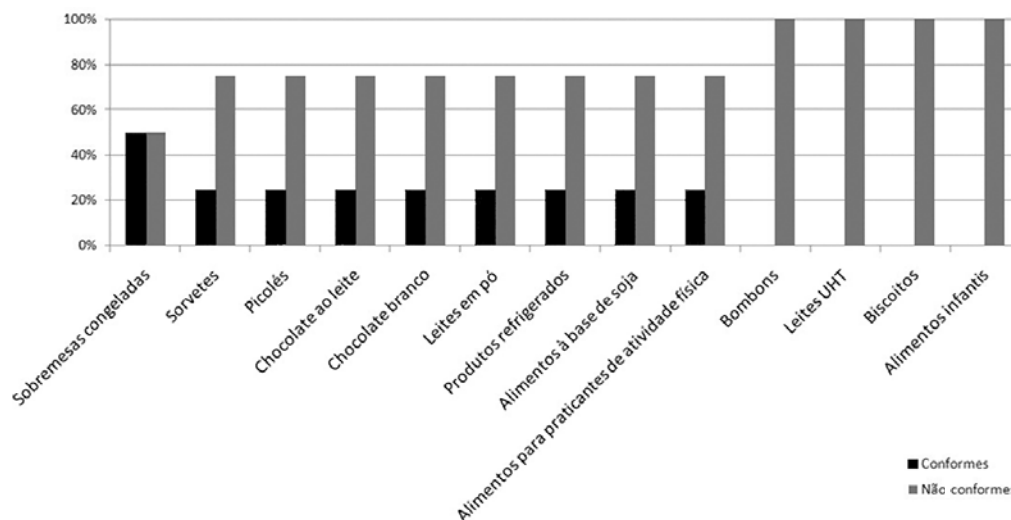


Figura 2. Números de itens não conformes por categoria de produto

Comparativamente foi possível observar algumas diferenças significativas em relação aos números de itens não conformes entre as categorias de produtos.

Os alimentos para praticantes de atividade física foram os que apresentaram maior proporção de itens não conformes, chegando a apresentar até 18,6% a mais de não conformidades com relação a outras categorias, como é o caso de bombons ($p < 0,05$).

Com relação aos alimentos para fins especiais, os alimentos para praticantes de atividade física apresentaram resultado da ordem de 10% a mais de não conformidades quando comparado aos alimentos infantis ($p < 0,05$).

A segunda categoria que apresentou maior número de itens não conformes, que foi a categoria de picolés, chegou a apresentar aproximadamente 13% a mais de não conformidades com relação à categoria de bombons ($p < 0,05$), 10% em relação à categoria de sobremesas congeladas ($p < 0,05$) e 8% quando comparado às categorias de chocolate ao leite e leites UHT ($p < 0,05$).

Entre sorvetes e picolés houve diferença de conformidades apenas marginalmente significativa ($p < 0,10$), embora percentualmente a diferença tenha sido de 7,7% em relação aos itens não conformes destas duas categorias de alimentos.

Considerando-se as categorias de chocolates analisadas, os bombons apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos chocolates brancos, sendo que os chocolates brancos apresentaram 7% a mais de não conformidades em relação aos bombons.

Quanto aos produtos lácteos, não houve diferença estatisticamente significativa entre leites em pó, leites UHT e produtos refrigerados.

Resultados por tipo de irregularidade

A partir da Figura 3, é possível observar quais foram os pontos de irregularidades encontrados nos rótulos analisados com suas respectivas porcentagens.

Foi possível obter algumas informações interessantes a partir da análise estatística (Teste Qui-quadrado ou Exato de Fisher) de comparação das não conformidades entre os itens avaliados.

A tabela nutricional apresentou uma proporção de até 61,5% mais erros do que os demais itens avaliados ($p < 0,05$), como é o caso do item Marca, que foi identificado em todos os rótulos analisados.

As tabelas nutricionais apresentaram diversos tipos de irregularidades, como por exemplo: não adequação aos requisitos da Resolução 360/03¹⁵ de rotulagem nutricional; tabela sem a identificação dos nutrientes para os quais se faz informação nutricional complementar; coluna de Valor diário considerando valores para crianças; entre outros.

Desse modo, a tabela nutricional, que apresentou maior número de não conformidades entre os itens avaliados, apresentou diferença significativa em relação à todos os demais itens avaliados ($p < 0,05$).

O item avaliação de figuras, símbolos, ilustrações e desenhos dos rótulos apresentaram aproximadamente 19% mais erros ($p < 0,05$) que outros itens avaliados como data de validade e informações de painel principal, os quais também apresentaram alto número de não conformidades.

Observou-se que diversos rótulos (32,7%), apresentaram figuras, símbolos, ilustrações e desenhos que não correspondiam à composição do alimento. Foi identificado que 30,8% dos rótulos

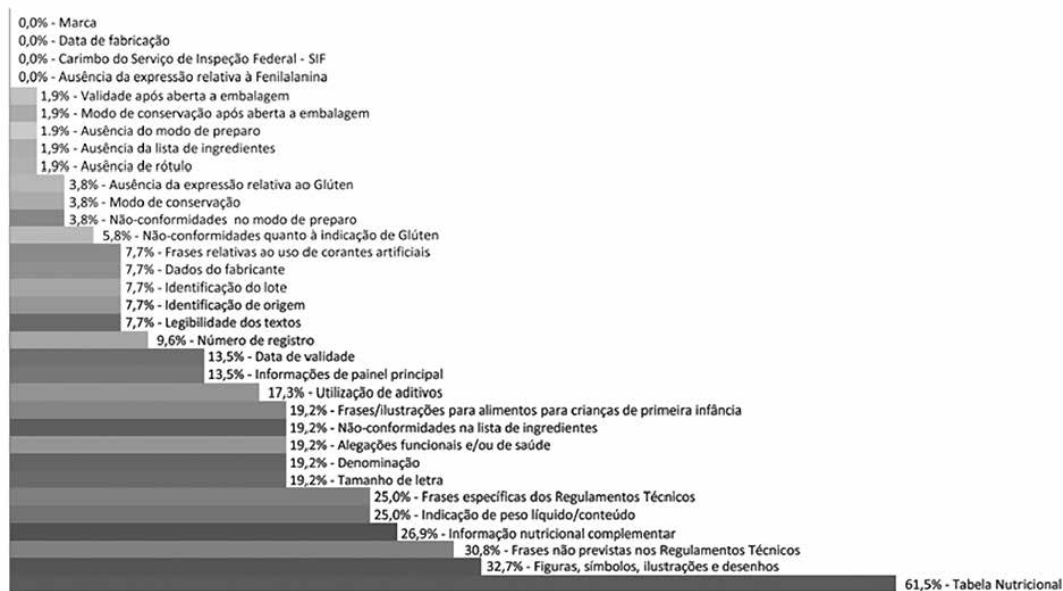


Figura 3. Resultados por tipo de irregularidades com as respectivas porcentagens de não conformidades

apresentaram frases que não estão previstas nos Regulamentos Técnicos que podem induzir o consumidor ao erro e alegações funcionais que podem levar também o consumidor ao falso conceito sobre as propriedades do produto.

Com relação à informação nutricional complementar, 26,9% dos rótulos analisados apresentaram no mínimo uma das seguintes irregularidades: utilização de informação nutricional complementar que não correspondia à quantidade de nutriente presente no alimento; não atendimento aos critérios para utilização de informação nutricional complementar de gorduras trans, light e reduzido valor energético; e informação nutricional complementar diferente ou não prevista pela legislação.

Quanto ao número de registro, observou-se ausência do número de registro em dois tipos de produtos com registro obrigatório: alimentos com alegações de propriedades funcionais e alimentos para praticantes de atividade física.

Os itens “indicação de peso líquido/contéudo” e “frases específicas dos Regulamentos técnicos”, obtiveram também alto número de não conformidades (25%).

Com relação às alegações funcionais, pode-se observar utilização de alegações não aprovadas pela ANVISA; uso de alegações que extrapolam o conteúdo de alegações aprovadas; fragmentação das alegações funcionais aprovadas e ausência de informações adicionais exigidas pela ANVISA.

Quanto à denominação, denominações incorretas foram identificadas, que não seguiam o

estabelecido no Padrão de identidade e qualidade do produto, e denominações que não correspondiam à composição do alimento. Já na lista de ingredientes, houve rótulos que apresentaram listas de ingredientes ilegíveis, confusas e listas em que o modo de declaração de ingredientes e aditivos não estava de acordo com o estabelecido na legislação. Também se observou a adição de ingredientes que não são permitidos pela legislação para a categoria do produto.

O uso de aditivos também apresentou problemas, como a utilização de aditivos que não são permitidos para a categoria de produto correspondente, como por exemplo, uso de edulcorantes em produto que não atingia os critérios para utilização de informação nutricional complementar relativa a açúcares ou a valor energético.

Identificou-se também um rótulo em que os aditivos listados na etiqueta do produto atendiam à legislação, entretanto, observou-se que haviam aditivos descritos na lista de ingredientes do rótulo (em inglês) que não constava da etiqueta com as informações em português. Inclusive entre os aditivos faltantes estava o corante tartrazina, o qual a legislação estabelece que deve obrigatoriamente ter seu nome citado por extenso na lista de ingredientes, devido ao seu alto grau de alergenicidade na população.

Quanto ao uso das expressões “Contém Glúten” ou “Não Contém Glúten”, observou-se desde ausência das expressões até impossibilidade de avaliação do correto uso das expressões por falta de legibilidade na lista de ingredientes.

Comparação de irregularidades entre as categorias

Foram realizadas análises multivariadas exploratórias para comparação de irregularidades entre as categorias de produtos selecionados.

A análise estatística de variância permitiu a identificação dos itens com maior diferença significativa entre as categorias de produtos analisadas. Identificou-se que os itens que apresentaram maior diferença significativa entre as categorias ($p < 0,05$) foram: glúten; legibilidade dos textos; data de validade; informações de painel principal; frases/ilustração para alimentos para crianças de primeira infância; tamanho de letra; frases específicas dos Regulamentos técnicos e figuras; símbolos; ilustrações; e desenhos. Os itens frases relativas ao uso de corantes artificiais, dados do fabricante e identificação de origem apresentaram apenas diferença marginalmente significativa ($p < 0,10$).

Já a análise estatística de agrupamento pelo Método Ward's, gerou o dendrograma, ou diagrama em forma de árvore (Figura 4), que permite identificar agrupamentos de algumas categorias de produtos alimentícios.

Pode-se observar que a maior separação das chaves ocorreu com um subgrupo composto pelas categorias de alimentos à base de soja, leites em pó e leites UHT.

Isto demonstra que o agrupamento realizado com todas as variáveis identificou categorias de produtos com erros mais similares. As categorias de alimentos à base de soja, leites em pó e leites UHT, por serem considerados alimentos direcionados ao público infantil, apresentaram maior número de repetição dos mesmos erros.

Nestas categorias, observaram-se muitos erros que se repetiam com relação às frases específicas dos Regulamentos Técnicos e ausência das frases para alimentos para crianças de primeira infância, além de presença de figuras, símbolos, ilustrações e desenhos não permitidos pela legislação específica para estes alimentos.

Dentro deste subgrupo também se observa que leites em pó e alimentos à base de soja apresentaram ainda mais repetição de itens incorretos entre si do que os leites UHT, uma vez que foram separados em uma nova chave no dendrograma.

Também foi realizada análise exploratória não hierárquica de K-means (Figura 5), a qual separou três grupos com repetição de irregularidades, confirmando os grupos identificados no dendrograma.

No grupo 1, formado pelas categorias picolés, biscoitos e alimentos para praticantes de atividade física, foram identificados erros que se repetiram em diversos

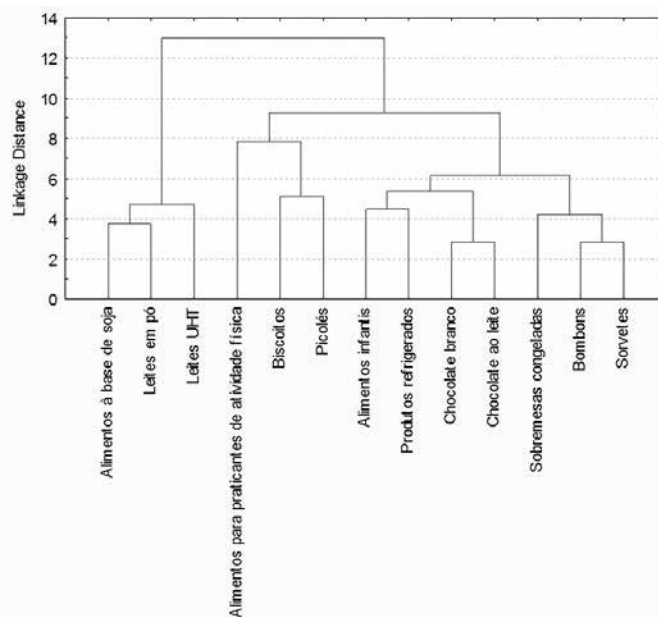


Figura 4. Dendrograma Método Ward's

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Picolés	Sorvetes	Leites UHT
Biscoitos	Sobremesas congeladas	Leites em pó
Alimentos para praticantes de atividade física	Chocolate ao leite	Alimentos à base de soja
	Bombons	
	Chocolate branco	
	Produtos refrigerados	
	Alimentos infantis	

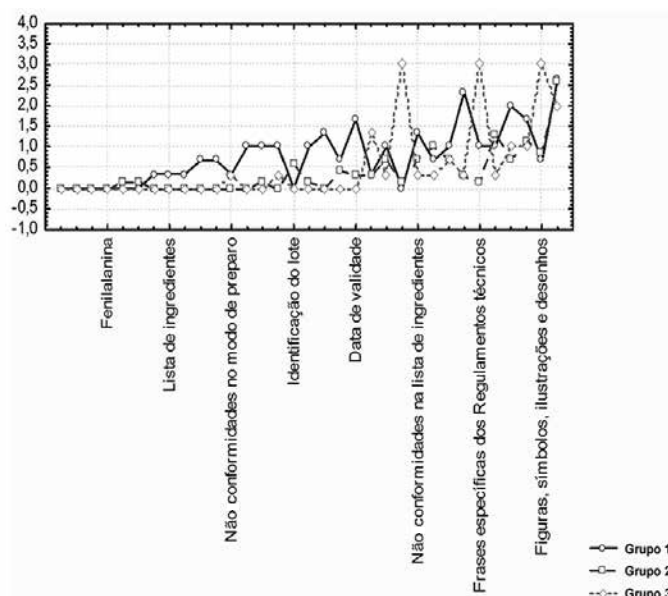


Figura 5. Análise não hierárquica de K-means

itens analisados: não conformidades na indicação de Glúten; legibilidade dos textos; data de validade; utilização de aditivos; não conformidades na lista de ingredientes; tamanho de letra; frases não previstas nos Regulamentos Técnicos e tabela nutricional.

No grupo 2 também foi possível identificar erros similares pela similaridade entre os produtos deste grupo. Com relação ao grupo 3, como apontado pelo dendograma, as categorias de produtos alimentícios à base de soja, leites em pó e leites UHT, por serem produtos direcionados ao público infantil, apresentaram maior número de repetição de irregularidades.

Propostas para melhoria da legislação

Conforme os resultados observados, a tabela de informação nutricional foi o item analisado que apresentou maior número de irregularidades, assim, algumas propostas podem ser feitas para melhoria da legislação de informação nutricional.

Uma delas é a elaboração de valores diários de referência considerando as necessidades nutricionais de crianças, inclusive com diferenciação por faixas etárias, e previsão em legislação do uso destes valores diários de referência para crianças quando o produto for destinado ao público infantil. Desse modo, a tabela nutricional teria sua informação muito mais clara e precisa ao apresentar valores diários para crianças quando se tratar de alimento destinado a este público alvo.

A fortificação de produtos e a utilização de informação nutricional complementar em produtos destinados aos grupos populacionais específicos, como os alimentos infantis, também não estão estabelecidos em legislação. A fortificação de alimentos está em discussão atualmente no Codex Alimentarius. Entretanto, segundo a diretriz de fortificação de alimentos da Organização Mundial da Saúde e da Organização das Nações Unidas²⁰, a fortificação acima do recomendado para determinada faixa etária significa um risco em potencial de ingestão desnecessária de altos níveis de micronutrientes por crianças se a mesma porção do alimento fortificado é direcionada a todos os membros da família considerando as necessidades nutricionais de adultos. É recomendado que a regulamentação garanta que o consumo destes alimentos não resulte em excessiva ingestão de micronutrientes por crianças.

Assim, há necessidade de aprimoramento da legislação de informação nutricional complementar a fim de que seja claramente estabelecido que para utilização

de informação nutricional complementar de proteínas, vitaminas e minerais devem ser utilizados os valores de referência de IDR (Ingestão Diária Recomendada) conforme o grupo populacional para o qual o produto é destinado.

Como foram identificados muitos erros comuns relativos às frases específicas dos Regulamentos Técnicos e ausência das frases para alimentos para crianças de primeira infância, além de presença de figuras, símbolos, ilustrações e desenhos não permitidos pela legislação específica em leites UHT, leites em pó e alimentos à base de soja, seria interessante que a legislação deixasse mais claro que estes alimentos fazem parte do grupo de alimentos para crianças de primeira infância, e que como tal, precisam cumprir com os todos os regulamentos específicos para produtos destinados a este público.

Em alguns dos rótulos analisados foram observadas frases não previstas nos Regulamentos Técnicos. Entre elas, algumas frases que poderiam ser estabelecidas em legislação foram identificadas, com seus respectivos critérios de utilização. Como é o caso de frases que são informações nutricionais complementares ainda não previstas em legislação, como por exemplo, frases que tratam dos teores de lactose, gorduras trans, ácidos graxos ômega 3 e ácidos graxos ômega 6.

Para as alegações funcionais, a legislação poderia auxiliar sendo mais clara e objetiva quanto ao conteúdo das alegações funcionais, por meio de listas de alegações funcionais aprovadas contendo os respectivos requisitos mínimos necessários para utilização de alegações funcionais relativas a um determinado ingrediente ou produto.

Na União Europeia, há lista de alegações de conteúdo de nutrientes com os critérios para utilização e lista de alegações funcionais baseada em alegações cientificamente comprovadas. Para novas alegações funcionais, há necessidade de aprovação prévia pelo EFSA (*European Food Safety Authority*) com apresentação da comprovação científica.

Nos Estados Unidos da América há lista positiva de alegações de conteúdo de nutrientes e não há lista positiva para alegações funcionais, mas estas são permitidas sem aprovação prévia desde que possuam comprovação científica. Alegações de saúde, como alegações de redução do risco de doenças, possuem lista positiva aprovada.

Na Argentina é exigida aprovação da alegação funcional antes do lançamento do produto. No México e

no Peru há apenas princípios gerais de uso de alegações funcionais. No Brasil há uma lista positiva de alegações funcionais, mas é exigida a aprovação caso a caso antes do lançamento do produto.

Nos países asiáticos, o Japão possui necessidade de aprovação prévia, mas China, Tailândia, Taiwan, Malásia e Cingapura possuem lista positiva de alegações funcionais. Na Austrália e Nova Zelândia, alegações de conteúdo de nutrientes e algumas alegações funcionais são permitidas, entretanto, alegações de saúde não são permitidas. Na Índia, alegações de redução do risco de doenças são permitidas desde que comprovadas cientificamente.

Como pode ser observado, mundialmente tem sido permitido o uso de alegações funcionais pré-aprovadas coerentes do ponto de vista científico e com comprovação de eficácia, o que possibilita ao setor industrial o desenvolvimento de produtos direcionados para as necessidades dos consumidores, e concomitantemente, proporciona ao consumidor mensagens claras e cientificamente comprovadas a respeito das propriedades do alimento que está sendo consumindo.

Foram identificados rótulos em que o nome do aditivo não era apresentado escrito por extenso, mas apenas com seu número INS correspondente. Os consumidores não conhecem todos os números INS de cada um dos aditivos alimentares e, portanto, não possuem um acesso adequado a esta informação na lista de ingredientes. Assim, o item referente aos aditivos alimentares na legislação de rotulagem geral poderia ser modificado de forma que torne obrigatória a declaração do nome do aditivo por extenso na lista de ingredientes, possibilitando ao consumidor o acesso adequado à informação referente aos aditivos adicionados no produto.

CONCLUSÃO

Este trabalho permitiu identificar dados de conformidade da rotulagem de algumas categorias de produtos alimentícios frente à legislação brasileira em vigor.

A maioria das categorias de produtos analisadas apresentou alto índice de rótulos não conformes, sendo que em quatro categorias de produtos (bombons, leites UHT, biscoitos e alimentos infantis), todos os rótulos analisados apresentaram irregularidades.

Entre as categorias de produtos analisados, observou-se que a categoria que mais apresentou irregularidades foi a categoria de alimentos para praticantes de atividade física, em que um total de 34 itens não conformes foi identificado. Isto representa até 18,6% a mais de itens não conformes na categoria de alimentos para praticantes de atividade física em comparação com outras categorias, como é o caso de bombons ($p < 0,05$).

A tabela de informação nutricional foi o item analisado que apresentou maior número de irregularidades. A tabela nutricional apresentou uma proporção de até 61,5% mais erros do que os demais itens avaliados ($p < 0,05$), como é o caso do item Marca, por exemplo.

A verificação dos maiores pontos de irregularidades nos rótulos permitiu identificar quais itens da legislação requerem maior aprimoramento para adequação dos rótulos às necessidades dos consumidores com uma rotulagem mais clara e precisa.

Também foi possível identificar que irregularidades encontradas em alguns itens dos rótulos não apresentam falta de legislação que regulamente o assunto, no entanto, estes não eram cumpridos conforme o estabelecido na norma correspondente.

Portanto, a correta aplicação da legislação vigente depende também do comprometimento do setor industrial, além de uma intensificação na fiscalização por parte dos órgãos responsáveis e na capacitação adequada dos agentes fiscalizadores, para que a fiscalização seja realizada a partir das determinações legais vigentes.

O aumento da fiscalização também em portos e aeroportos referente à rotulagem dos produtos importados poderia evitar que produtos irregulares fossem comercializados livremente no mercado brasileiro.

O acesso à educação nutricional também é uma alternativa para o melhor entendimento dos rótulos pelos consumidores. Com melhores informações a respeito da constituição dos alimentos e seus rótulos, os consumidores teriam melhores condições de fazer escolhas corretas e conscientes de acordo com suas necessidades.

AGRADECIMENTOS

As autoras agradecem à Nestlé Brasil Ltda. pelo apoio à pesquisa e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pela bolsa concedida à segunda autora.

REFERÊNCIAS

1. Almeida-Muradian LB, Penteado MVC. *Vigilância Sanitária: Tópicos sobre Legislação e Análise de Alimentos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2007. 203p.
2. Indústria da Alimentação. Principais Indicadores Econômicos; 2006. Disponível em: [http://www.abia.org.br/visit/ecoserv.asp].
3. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Departamento de economia e estatística da Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação - Pesquisa de Orçamentos Familiares; 2009. Disponível em: [http://www.abia.org.br/ecopublall.asp#90].
4. Penteado MVC. *Fiscalização de Alimentos*. São Paulo; 1998. 169p.
5. Maio FD, Okada IA, Carvalho MFH, Kira CS, Duran MC, Zenebon O. Avaliação da rotulagem e dos teores de minerais e contaminantes inorgânicos em águas minerais nacionais e importadas. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2002; 61:27-32.
6. Araújo ACMF, Araújo WMC. Adequação à legislação vigente da rotulagem de produtos lácteos enriquecidos com cálcio e ferro. *Rev Hig Aliment*. 2001; 15(88):34-49.
7. Celeste RK. Análise comparativa da legislação sobre rótulo alimentício do Brasil, Mercosul, Reino Unido e União Européia. *Rev Panam Salud Pública*. 2001; 35(3): 217-23.
8. Coutinho JG. Estabelecimento de alegação de saúde nos rótulos de alimentos e bebidas embalados [dissertação de mestrado]. Brasília (DF): Universidade de Brasília; 2004.
9. Marins BR. Avaliação do uso e entendimento das informações contidas nos rótulos de alimentos/bebidas embalados, pela população adulta frequentadora de supermercados, no município de Niterói [dissertação de mestrado]. Rio de Janeiro (RJ): Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; 2004.
10. Câmara MCC, Marinho CLC, Guilam MC, Braga AMCB. A produção acadêmica sobre a rotulagem de alimentos no Brasil. *Rev Panam Salud Pública*. 2008; 23(1): 52-8.
11. Ferreira AB, Lanfer-Marquez UM. Legislação brasileira referente à rotulagem nutricional de alimentos. *Rev Panam Salud Pública*. 2007; 20(1): 83-93.
12. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução RDC nº 259, de 20 de setembro de 2002. Aprovar o Regulamento Técnico sobre Rotulagem de Alimentos Embalados. Disponível em: [http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=1261&word].
13. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. Instrução Normativa nº 22, de 24 de novembro de 2005. Aprova o Regulamento Técnico para rotulagem de produto de origem animal embalado. Disponível em: [http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal].
14. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - INMETRO. Regulamentos Técnicos. Portaria nº 157, de 19 de agosto de 2002. Estabelecer a forma de expressar a indicação quantitativa do conteúdo líquido dos produtos pré-medidos. Disponível em: [http://www.inmetro.gov.br/legislacao/detalhe.asp?seq_classe=1&seq_ato=786].
15. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Aprova o Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional. Disponível em: [http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=9059&word].
16. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução RDC nº 359, de 23 de dezembro de 2003. Aprovar o Regulamento Técnico de Porções de Alimentos Embalados para Fins de Rotulagem Nutricional. Disponível em: [http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=9058&word].
17. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005. Aprovar o Regulamento Técnico sobre a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. Disponível em: [http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=18828&word].
18. Martel JHI, Ferraudo A, Môro JR, Percin D. Estatística Multivariada na discriminação de raças amazônicas de pupunheiras (*Bactris gasipaes* Kunth) em Manaus (Brasil). *Rev Bras Frutic*. 2003; 25(1):115-8.
19. STATISTICA; version 8.0 for Windows [software]. Tulsa: StatSoft, 2007. v.1.
20. World Health Organization - WHO/FAO. Guidelines on Food Fortification with Micronutrients Geneva: WHO Press; 2006. Disponível em: [www.who.int/nutrition/.../guide_food_fortification_micronutrients.pdf].

Caracterização de leite em pó, soro de leite em pó e suas misturas por eletroforese em gel de poliacrilamida

Characterization of milk powder, whey powder and its blends by polyacrylamide gel electrophoresis

RIALA6/1400

Felippe Macedo MARQUES¹, Jaqueline Flaviana Oliveira de SÁ^{2*}, Marcelo Cerqueira dos SANTOS³, Marta Fonseca MARTINS⁴, Marco Antonio Moreira FURTADO⁵

*Endereço para correspondência: ²Instituto de Laticínios Cândido Tostes (ILCT), Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG). Rua Tenente Freitas, 116 - Santa Terezinha. Juiz de Fora/MG. CEP 36045.560. Telefone: 32-3224-3116. e-mail: jaquelinesa@epamig.br

¹Oxetil-FGF

³Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais - Campus Rio Pomba (IF SUDESTE MG)

⁴Embrapa Gado de Leite

⁵Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF)

Recebido: 23.05.2011 – Aceito para publicação: 05.11.2011

RESUMO

Pela legislação brasileira o leite em pó não pode conter sólidos de soro de leite. As autoridades competentes enfrentam dificuldades no controle desse tipo de fraude, apesar de diversos métodos terem sido estudados e propostos para detectar a adulteração. Neste estudo foi realizada a caracterização do leite em pó, utilizando-se a técnica de eletroforese adaptada, para determinar adulteração em amostras de leite em pó contendo diferentes concentrações de soro (2%, 4%, 6%, 8% e 10%) e pelos perfis protéicos. Foi empregada a técnica de SDS-PAGE com modificações nos procedimentos de conservação dos géis após preparo, tempo entre preparo e aplicação, voltagem e corrente na fonte eletroforética, tempos de revelação e secagem, obtendo-se géis com resultados satisfatórios quando analisados por meio de *software* Image Quant TL. A técnica de SDS-PAGE adaptada foi eficiente para avaliar as características das amostras de leite em pó e de soro em pó separadamente. Houve possibilidade de identificar a adição de soro de leite, porém sem discernimento da correlação entre o nível de adição e a quantidade de soro adicionada. A SDS-PAGE modificada mostrou bom desempenho na caracterização de proteínas de leite em pó, de soro de leite em pó e de suas misturas.

Palavras-chave. eletroforese, proteínas, adulterações, SDS-PAGE.

ABSTRACT

According to the Brazilian legislation the sterile pasteurized milk and the milk powder should not contain cheese whey solids. Although several methods have been studied and proposed for detecting this adulteration, it has been hard to be controlled by the competent authorities. This study characterized the milk powder by using a modified electrophoresis technique for determining the adulteration of milk powder samples containing different concentrations of whey (2%, 4%, 6%, 8% and 10%), and by analyzing the protein profiles. Modifications in the SDS-PAGE technique procedures were done on the prepared gel preservation, the time between preparation and application, the electrophoretic source current and voltage and on the gel developing and drying time, which produced an satisfactory effect on the final results. The adapted technique showed to be efficient for characterizing the milk powder and whey powder samples separately. Addition of whey was identified, but the correlation between the adulteration level and the added amount of whey could not be determined. The adapted SDS-PAGE technique showed a suitable performance for assessing the milk protein powder, whey powder and its blended products characteristics.

Keywords. electrophoresis, proteins, adulteration, SDS-PAGE.

INTRODUÇÃO

A qualidade do leite consumido é uma constante preocupação de técnicos, autoridades e demais profissionais nacionais e internacionais, ligados à área de saúde, laticínios e dos consumidores¹. O soro de leite em pó tornou-se um importante componente de muitos produtos formulados. O aproveitamento deste sub-produto deve ser incentivado a fim de que se possa usufruir do seu considerável valor nutricional e, preservar a natureza do impacto ambiental representado pela eliminação do mesmo sem o adequado tratamento². Contudo, sua adição aos produtos comercializados com a denominação de leite em pó constitui fraude contra a economia popular³. Devido ao preço reduzido do soro com relação ao leite, e a complexidade destas misturas, essa prática é alvo atrativo de adulterações⁴.

Vários métodos têm sido desenvolvidos para a detecção desse tipo de fraude: composição de aminoácidos (cistina e cisteína; ácido aspártico, alanina e prolina); relação entre constituintes (relação nitrogênio soroproteico/nitrogênio caseínico); método crioscópico; observação microscópica com luz polarizada; imunoenzimático; cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE); determinação do ácido siálico livre; entre outros⁵⁻⁸. A adição fraudulenta de soro ao leite é normalmente detectada e quantificada pela determinação do CMP (Caseinomacropéptido). As caseínas do leite de vaca são compostas por aproximadamente 50% α -caseína (incluindo a α_1 -caseína e α_2 -caseína), 30% de β -caseína, 15% de k-caseína e 5% de γ -caseína e as proteínas do soro de leite são constituídas de β -lactoglobulina e α -lactoalbumina, albumina do soro bovino, lactoferrina, imunoglobulinas e glicomacropéptidos⁹. A caseína é uma fosfoproteína que estabelece ligações com o cálcio, o que lhe confere certa estabilidade, motivo pelo qual não coagula no ponto de ebulição do leite¹⁰. A α -lactoalbumina desnatura-se a 65,2 °C, em pH 6,7, sendo 90% da desnaturação revertida com resfriamento, essa alta capacidade de renaturar-se explica sua aparente resistência térmica¹¹. A desnaturação da β -lactoglobulina é dependente do tempo de exposição à temperatura. Acima de 70 °C ocorrem extensivas alterações de conformação, com exposição de grupos SH e NH₂. Sofre desnaturação de polimerização irreversível com a formação de ligações S-S intermoleculares¹².

O Caseinomacropéptido (CMP) é um polipeptídeo resultante da quebra da ligação peptídica da

k-caseína entre os aminoácidos 105-106 (fenilalanina-metionina). Desta cisão, forma-se o paracaseinato de cálcio (1-105), hidrofóbico e insolúvel, pela agregação das micelas de caseína, e o caseinomacropéptido (106-169), hidrofílico e solúvel, que permanece no soro¹³. O CMP é liberado pela ação da quimosina durante a fase primária da coagulação do leite e por se tratar de um componente específico do soro e que deve estar ausente no leite, o CMP é um excelente indicador da presença de fraude por adição de soro ao leite¹³.

Métodos que utilizam eletroforese capilar têm sido utilizados com sucesso na identificação e quantificação deste CMP em leite^{13,14}. Em experimentos conduzidos por Olieman e Riel¹⁵, utilizou-se CLAE em coluna de fase reversa (CLAE-FR) para estudar o comportamento da proteólise extensa no leite, causada por bactérias psicrotróficas. Alvin¹⁶ fez um estudo da influência da qualidade do leite nos resultados do método de CLAE-FG (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência por Filtração em Gel), quando utilizado para detectar soro adicionado neste produto, e concluiu que os resultados positivos, quando há presença de CMP, podem ser interpretados como adição de soro ao leite, ou como provenientes da detecção de produtos de degradação proteica do leite de péssima qualidade. O maior inconveniente da determinação do CMP é a atividade proteolítica de enzimas termorresistentes liberadas por bactérias psicrotróficas em leite cru e a plasmina que permanece ativa no leite, pois estas podem acarretar liberação e surgimento de certa quantidade de CMP e outro peptídeo denominado "pseudo-CMP", devido à capacidade das enzimas proteolíticas de hidrolisar a caseína em locais parecidos com os locais hidrolisados pela quimosina¹⁷. Deste modo, toda análise baseada na identificação de CMP pode apresentar resultados falso-positivos, quanto à adição de soro de leite ao leite. Este pseudo-CMP pode diferir do CMP por um único aminoácido (metionina terminal no CMP, resíduo 106 – alanina terminal no pseudo-CMP, resíduo 107)¹⁸.

A legislação brasileira estabelece que o leite em pó deverá conter somente as proteínas, açúcares, gorduras e outras substâncias minerais do leite e nas mesmas proporções relativas deste, sendo aceitos como aditivos unicamente a lecitina, atuando como emulsionante, e alguns anti-umectantes¹⁹. Em concentrações de até 30 mg/L de CMP, o leite poderá ser destinado ao abastecimento direto. Quando o índice de CMP no leite estiver entre 30mg/L e 75mg/L, este poderá ser destinado

à produção de derivados lácteos, e acima de 75mg/L, poderá ser destinado à alimentação animal ou à indústria química em geral³.

Outro método capaz de detectar a presença de CMP em leite pasteurizado e leite em pó foi desenvolvido por Vilela²⁰, utilizando eletroforese em gel de poli(acrilamida) (PAGE) para realizar a separação e densitometria, para quantificação. Embora a metodologia apresente alta sensibilidade (0,5% de soro de leite adicionado), o tempo total de análise pode ser considerado longo, além de exigir condições especiais de análise. Entretanto, esta apresenta muitas vantagens em relação aos diversos métodos que têm sido estudados e propostos para a detecção da adulteração do leite com soro de leite, especialmente no que diz respeito ao custo dos materiais em geral, necessidade de especialistas qualificados dedicados ao método e custo dos equipamentos¹.

O objetivo deste trabalho foi a adaptação de uma metodologia de eletroforese para determinar adulteração de leite em pó com diferentes concentrações de soro, por meio da verificação dos perfis protéicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Seguiu-se a metodologia proposta por Laemmli²¹, com algumas adaptações, devido à demora na corrida do processo clássico e à má resolução das bandas quando reveladas. As amostras de leite em pó foram adquiridas nos mercados da cidade de Juiz de Fora - MG entre agosto e dezembro de 2009, sendo analisadas seis diferentes marcas. O soro de leite em pó

foi adquirido de fornecedor industrial. Em laboratório, foram produzidas, cinco amostras fraudulentas, misturando-se soro de leite em pó nas concentrações de 2%, 4%, 6%, 8% e 10% ao leite em pó, sendo 100g a quantidade de mistura final preparada. O leite em pó e o soro de leite em pó foram reconstituídos a 12% em água destilada. Adicionou-se em microtubo, 24 µL de cada amostra reconstituída e 1 mL de tampão da amostra (4,0 mL de água destilada; 1,0 mL de Tris-HCl 0,5 mol/L em pH 6,8; 0,8 mL de glicerol; 1,6 mL SDS 10% m/v; 0,4 mL de 2-mercaptoetanol; 0,2 mL de azul de bromofenol 2% m/v). As amostras, após a dissolução no tampão de amostra, foram submetidas a 1000 °C por 5 minutos e centrifugadas em temperatura ambiente por 15 minutos a 12.500 x g. Utilizaram-se marcadores de baixa massa molecular (*Amersham Biosciences - Buckinghamshire, Inglaterra*), aplicados nos poços de números 2 e 13 e padrões α -caseína, β -caseína e k-caseína de leite bovino (*Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA*) - aplicados, respectivamente, nos poços de números 3, 4 e 5 de cada gel. Os poços dos extremos dos géis não foram utilizados. A seguir, foram aquecidos a 40 °C por 1 hora, sendo armazenados a -20 °C aproximadamente no próprio recipiente. Como marcadores moleculares foram utilizados fosforilase b, albumina bovina, ovoalbumina, anidrase carbônica, inibidor de tripsina e α -lactoalbumina, variando de 14.400 Da a 97.000 Da. Os géis de separação e empilhamento foram preparados utilizando-se as soluções descritas na Tabela 1.

Estas soluções foram misturadas nas quantidades descritas e em seguida, colocadas nos

Tabela 1. Composição dos géis de poli(acrilamida) utilizados para eletroforese de proteínas das amostras de leite em pó, soro de leite em pó e suas misturas

Componentes	Gel de separação 12,5%	Gel de separação 15,0%	Gel de separação 15,5%	Gel de Concentração
Acrilamida/Bis (sol. estoque 30%)	12,5 mL	15 mL	15,5 mL	1,5 mL
Tampão *Tris-HCl 1,5 mol/L pH 8,8	7,5 mL	7,5 mL	7,5 mL	2,5 mL
**SDS 10% m/v	0,3 mL	0,3 mL	0,3 mL	0,1 mL
Água destilada	9,4 mL	6,9 mL	6,4 mL	5,9 mL
Persulfato de amônio	0,3 mL	0,3 mL	0,3 mL	0,05 mL
***TEMED	30 µL	30 µL	30 µL	20 µL

*TRIS = tris (hidroximetil) aminometano

**SDS = dodecil sulfato de sódio

***TEMED = tetrametiletilenodiamina

moldes de vidro, até atingir a altura de 9,5 cm na placa. Uma fina camada de butanol foi colocada sobre esta solução, evitando-se assim a formação de um menisco côncavo, efeito provocado pela tensão superficial do gel. Após a preparação dos géis, as placas foram fixadas em cuba vertical (modelo Z35280-2, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EUA). Nos reservatórios das cubas, foi colocado tampão Tris-glicina, pH 8,3, diluído 1:5. Foram aplicados volumes que continham aproximadamente 30µg de proteínas. Fixou-se a voltagem em 60 V para o gel de empilhamento, com corrente livre e, 120 V para o gel de separação, mantendo a corrente livre. Ao término da corrida, os géis foram imersos em solução fixadora por 40 minutos. Em seguida, foram colocados em solução corante, por uma noite. A descoloração, onde se utilizou 500 mL de metanol, 200 mL de ácido acético e água destilada até completar 1000 mL de solução, transcorreu por 2 horas, até a completa evidenciação das bandas. Os géis foram imersos em solução de secagem por 15 minutos e secos pelo método do bastidor Alfenas²². Cada gel analisado corresponde a um tratamento, em duplicata, tendo em vista que o equipamento possibilitar a corrida simultânea de dois géis. As imagens dos géis foram escaneadas e posteriormente analisadas pelo *software Image Quant TL V2005* da Amersham Biosciences. Após a análise, o programa fornece dados sobre a distância percorrida pela fração de proteína em função da distância total, o que aqui foi denominado “mobilidade eletroforética relativa”, massa molecular (expressa em kDa) e volume de cada fração protéica analisada. A área da banda eletroforética então é vista como uma curva gaussiana. Algumas proteínas-padrão de massas moleculares conhecidas são usadas para a confecção de uma reta no gráfico de peso molecular versus mobilidade relativa, após a incubação em SDS e β-mercaptoetanol e a eletroforese desnaturante. A partir desta reta é possível estimar a massa molecular de uma proteína qualquer, submetida concomitantemente à mesma eletroforese²³.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verificou-se que, as massas moleculares na faixa da β-lactoglobulina e α-lactoalbumina ficaram prejudicadas nos géis de separação com concentrações de 12,5% e 15% de acrilamida, não permitindo a adequada caracterização das proteínas do soro. Deste modo, não foram executadas avaliações

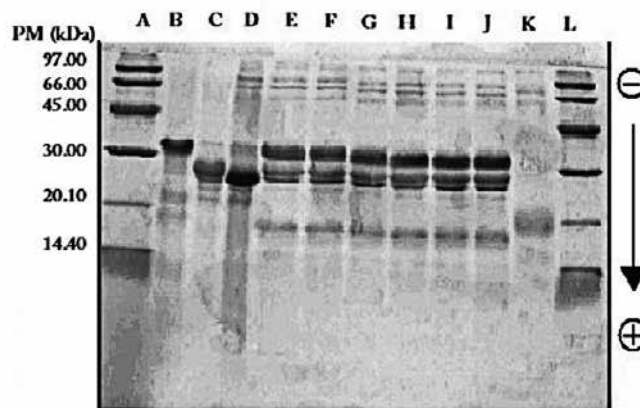


Figura 1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 15,5%. A. padrão de massa molecular; B. α-caseína; C. β-caseína; D. κ-caseína; E. amostra de leite em pó 1; F. amostra de leite em pó 2; G. amostra de leite em pó 3; H. amostra de leite em pó 4; I. amostra de leite em pó 5; J. amostra de leite em pó 6; K. soro de leite em pó padrão; L. padrão de massa molecular

densitométricas dos géis nestas concentrações. Os géis de concentração 15,5% de acrilamida possibilitaram a análise correta pelo *software* específico, gerando valores de mobilidade eletroforética relativa e massas moleculares das respectivas frações protéicas. Os poços de E até J da Figura 1 representam perfis típicos de leite em pó, de acordo com trabalhos conduzidos em condições similares^{23,24}.

As frações caseínicas aparecem na seguinte ordem crescente de mobilidade eletroforética: α_{s1}; α_{s2}; β; e κ-CN. Esta sequência concorda com os valores médios das massas moleculares das frações obtidas, onde os maiores picos de mobilidade eletroforética relativa, para

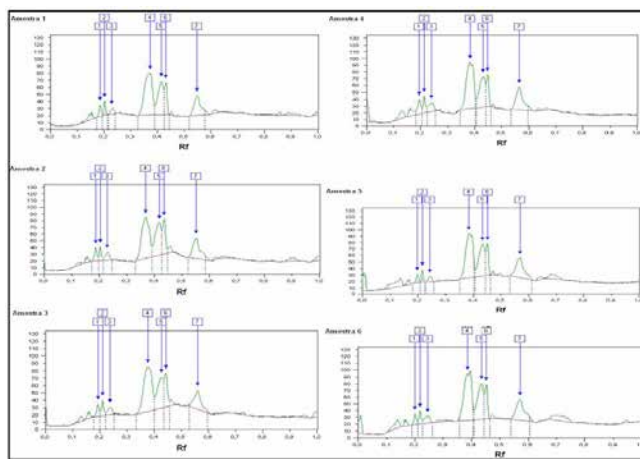


Figura 2. Densitogramas de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) relativos às amostras de leite em pó

as frações caseínicas, devem ser correspondentes à α -CN, β -CN e κ -CN (Figura 2) nesta ordem.

No presente trabalho, as bandas correspondentes a α_{s1} e α_{s2} encontram-se agrupadas em uma única faixa densitométrica, correspondente a α -caseína cujo pico é o mais expressivo.

De acordo com Farrell Jr. et al.²⁵, as massas moleculares das mais importantes frações caseínicas estão na faixa de 19,00 a 25,00 kDa. Neste experimento, elas parecem migrar até a faixa próxima ou maior que 30,00 kDa, o que demonstra que as caseínas exibem comportamento anormal nestas condições. Isto pode ser justificado pela ligação em proporções variadas ao SDS pelas diferentes frações caseínicas ou pela interação entre as frações caseínicas separadas.

A avaliação destes resultados mostra que os perfis das amostras de leite em pó apresentaram mínimas variações, principalmente nas frações caseínicas, permitindo assim sua caracterização. Embora os valores das massas moleculares detectadas sejam maiores que os descritos na literatura, sua sequência concorda com o perfil eletroforético das caseínas, já que os padrões apresentaram valores semelhantes.

A Figura 3 apresenta o perfil eletroforético das amostras de leite em pó, misturadas com soro, permitindo a identificação dos perfis típicos de leite em pó (poço E), soro de leite em pó (poço K) e misturas (poços F a J).

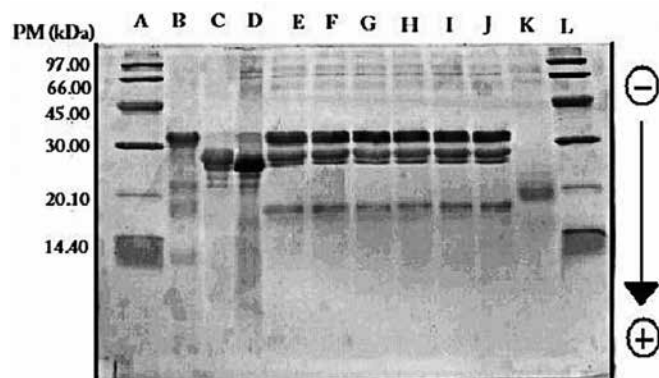


Figura 3. Perfil eletroforético das amostras de leite em pó, adulteradas com soro, obtido por eletroforese em gel de poliácridamida na presença de dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE). Gel de separação com 15,5% de poliácridamida. A. padrão de massa molecular; B. α -caseína; C. β -caseína; D. κ -caseína; E. leite em pó padrão; F. mistura de leite em pó com 2% de soro em pó; G. mistura de leite em pó com 4% de soro em pó; H. mistura de leite em pó com 6% de soro em pó; I. mistura de leite em pó com 8% de soro em pó; J. mistura de leite em pó com 10% de soro em pó; K. soro de leite em pó padrão; L. padrão de massa molecular

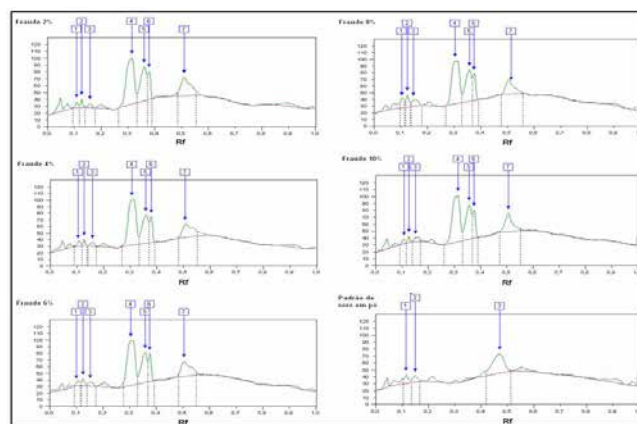


Figura 4. Densitogramas de eletroforese em gel de poliácridamida na presença de dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) relativos ao soro em pó e suas misturas ao leite em pó. De acordo com Dzurec e Zall²⁶, o tratamento térmico sofrido pelo leite em pó pode induzir associação entre proteínas do soro, como entre α -lactoalbumina e β -lactoglobulina, o que é verificado pela presença de única banda na região destas proteínas²⁶. Estudos mostram que, por meio de aquecimentos mais severos, a desnaturação de soroproteínas ocorre por associação entre proteínas do soro ou com micelas de caseína, podendo justificar o perfil observado²⁷

Com relação ao soro (linha k), as bandas que apresentam mais alta coloração e, conseqüentemente, concentração, parecem se referir as frações lactoferrina, representada pelo pico de número 1, soro albumina bovina, representada pelo pico de número 2, β -lactoglobulina e α -lactoalbumina, representadas pelo pico de número 3 no respectivo densitograma da amostra (Figura 4).

Ao avaliar as amostras de leite em pó adicionadas de quantidades crescentes de soro em pó, observa-se que não há semelhança entre o padrão de leite em pó e as amostras de fraude, onde era esperado um aumento dos picos densitométricos nas frações protéicas do soro, como β -lactoglobulina e α -lactoalbumina, não ocorrendo este acréscimo. Este fenômeno pode ser justificado por diversos fatores como a má homogeneização das amostras durante o preparo, solubilidade do soro em pó inferior à solubilidade do leite em pó, temperatura de dissolução das amostras não ideal, alíquota retirada não representativa da amostra ou a dispersão não uniforme do pó em solução. O trabalho realizado por Vilela²⁰ utilizando técnica SDS-PAGE similar à apresentada, mostrou-se eficaz na detecção de fraude em leite por adição de soro em pó. Entretanto, as amostras foram tratadas previamente, de modo a realizar a determinação a partir do glicomacropéptido.

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que:

- Na técnica de SDS-PAGE, entre as concentrações de acrilamida testadas no gel de separação, a que apresentou melhor resolução das bandas protéicas foi a de 15,5%.
- As amostras de leite em pó são semelhantes quanto aos perfis eletroforéticos, possibilitando sua caracterização eletroforética, onde os picos de maior expressão foram os correspondentes a α -caseína, β -caseína e k-caseína.
- O perfil eletroforético do soro em pó, apresentou única banda na faixa de β -lactoglobulina e α -lactoalbumina, provavelmente justificada pelo tratamento térmico empregado na secagem do soro.
- Nas condições analíticas empregadas, o método SDS-PAGE possibilitou apenas a visualização da presença do soro, entretanto, não se revelou eficiente no estabelecimento de uma boa correlação entre o nível da adulteração e a quantidade de soro adicionado.

REFERÊNCIAS

1. Magalhães MA. Determinação de fraude de leite com soro de leite pela análise de CMP e pseudo-CMP por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa com detecção por espectrometria de massa. [dissertação de mestrado]. Viçosa (MG): Universidade Federal de Viçosa; 2008.
2. Serpa L. Concentração de proteínas de soro de queijo por evaporação a vácuo e ultrafiltração [dissertação de mestrado]. Erechim (RS): Universidade Regional Integrada; 2005.
3. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 69, de 13 de dezembro de 2006. Institui o critério de avaliação da qualidade do leite in natura, concentrado e em pó, reconstituídos, com base no método analítico oficial físico-químico denominado "Índice CMP", de que trata a IN 68 de 12 de dezembro de 2006. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 14 de dez 2006. Seção 1, nº 239. p. 8.
4. De Souza EMT, Arruda SF, Brandão PO, Siqueira EMA. Electrophoretic analysis to detect and quantify additional whey in milk and dairy beverages. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2000; 20(3): 314-7.
5. Carvalho BMAC, Lorendane M, Pereira Alcântara LA, Ferreira Bonomo RC. Métodos de detecção de fraude em leite por adição de soro de queijo. [acesso em 2011 Abr 18]. Disponível em: [http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n060607/060704.pdf].
6. Furtado MAM. Desenvolvimento de um novo método analítico para a determinação de soro adicionado ao leite pasteurizado [dissertação de mestrado]. Lavras (MG): Universidade Federal de Lavras; 1989.
7. Wolfschoon-Pombo AF, Furtado MAM. Detection of adulteration of pasteurised milk with whey by determination of the casein-bound phosphorus and protein nitrogen content. *Z. Lebensm-Unters.-Forsch., A Food Res Technol*. 1989; 188: 16-21.
8. Pereira DBC, Silva PHF, Júnior LCGC, Oliveira LL. Físico-Química do leite e derivados – Métodos Analíticos. Juiz de Fora (MG): Templo Gráfica e Editora Ltda; 2001.
9. Buraglia, BM. Detección de caseinato y suero em leche y productos lácteos mediante técnicas electroforéticas, cromatográficas y espectroscópicas [tese de doutorado]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2001.
10. Spreer, E. Lactologia industrial: leche, preparación y elaboración, maquinas, instalaciones e aparatos, productos lácteos. 2.ed: Zaragoza: Acribia; 1991
11. Spreer, E. Lactologia industrial. Zaragoza: Acribia; 1973.
12. Antunes, AJ. Funcionalidade de proteínas de soro de leite. Barueri (SP): Editora Manole; 2003.
13. Mollé D, Léonil J. Heterogeneity of the bovine K-casein caseinomacropetide, resolved by liquid chromatography on-line with electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 1995; 708(2):223-30.
14. Van Riel J, Olieman C. Determination of caseinomacropetide with capillary zone electrophoresis and its application to the detection and estimation of rennet whey solids in milk and buttermilk powder. *Electrophoresis*. 1995; 16(4):529-33.
15. Olieman C, Van Riel JAM. Detection of rennet whey solids in skin milk and buttermilk powder with reversed-phase HPLC. *Neth. Milk Dairy J*. 1989; 43: 171-89.
16. Alvin TC. Efeito da qualidade do leite na detecção do soro lácteo por cromatografia líquida de alto desempenho filtração géllica (GF-HPLC) [dissertação de mestrado]. Viçosa (MG): Universidade Federal de Viçosa; 1992.
17. Recio I, Garcia-risco MR, Ramos M, Lòpez-fandino R. Characterization of peptides produced by the action of psychrotrophic proteinases on Kappa-casein. *J Dairy Res*. 2000; 67(4):625-30.
18. Recio, I, Frutos M, Olano, A.; Ramos, M. Protein changes in stored ultra-high-temperature-treated milks studied by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. *J Agric Food Chem* 1996, 44(12):3955-9.
19. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria no 369, de 4 de setembro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite em Pó. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 08 set. 1997. Seção 1, nº 172. p. 19699.
20. Vilela SC. Deteccion de suero de queseria agregado a leche pasteurizada y leche em polvo. Determinación del glicomacropetido por electroforesis. [dissertação de mestrado]. Valdivia: Universidad Austral de Chile; 1987.
21. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259):680-5.

22. Alfenas AC, Peters-Robinson I, Brune W. Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais. Viçosa (MG): Universidade Federal de Viçosa, 1991.
23. Silva Jr JG. Eletroforese de proteínas. Rio de Janeiro: Editora Interciência; 2001.
24. Basch JJ, Junior FWD, Procino LG, Holsinger VH, Junior HMF. Quantitation of caseins and whey proteins of processed milks and whey protein concentrates, application of gel electrophoresis, and comparison with Harland-Ashworth procedure. *J Dairy Sci*. 1985; 68(1):23-31.
25. Farrel HMJr, Jimenez-Flores R, Bleck GT, Brown EM, Butler JE, Creamer LK, et al. Nomenclature of the proteins of cow's milk – Sixth Revision. *J Dairy Sci*. 2004; 87(6):1641-74.
26. Dzurec DJ, Zall RR. Effect of heating, cooling, and storing milk on casein and whey proteins. *J Dairy Sci*. 1985; 68(2): 273-80.
27. Law, AJR, Leaver, J. Effect of pH on the thermal denaturation of whey proteins in milk. *J Agric Food Chem*. 2000; 48: 672-9.

Mycological analysis of *ambrosia* and creamy *dulce de leche*

Análise micológica de ambrosia e doce de leite pastoso

RIALA6/1401

Nathalie Almeida LOPES¹, Kélia Della Vechia SCARABELOT¹, Patrícia da Silva NASCENTE², Helenice de Lima GONZALEZ¹, Priscila Alves DIAS¹, Cláudio Dias TIMM^{1*}

*Endereço para correspondência: ¹Laboratório de Produtos de Origem Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Prédio 34, Campus Capão do Leão, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brasil, e-mail: inspleit@ufpel.tche.br

²Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas

Recebido: 21.06.2011 – Aceito para publicação: 08.12.2011

ABSTRACT

Creamy *dulce de leche* is a product made from concentrated milk by heating, and adding sucrose. *Ambrosia* is a variety of *dulce de leche* prepared by adding eggs and sugar into milk. Aiming at identifying the genera of filamentous fungi isolated from creamy *dulce de leche* and *ambrosia*, 40 *ambrosia* and 20 creamy *dulce de leche* samples were analyzed in the present study. Filamentous fungi and yeast counts and the identification of genera of the isolated filamentous fungi were performed. Thirty-nine samples (65%) showed filamentous fungi and yeast counts that exceeded the acceptable limits. Six fungus genera were identified, and among them the *Penicillium* was the most frequent. These findings are a warning of the requirement for strict control on good manufacturing practices as well as on the inspection and monitoring of *ambrosia* and creamy *dulce de leche* trading.

Keywords. filamentous fungi, creamy *dulce de leche*, *ambrosia*.

RESUMO

O doce de leite pastoso é um produto obtido por concentração do leite, adicionado de sacarose, sob ação do calor. A *ambrosia* é um tipo de doce de leite preparado com leite, ovos e açúcar. Com o objetivo de identificar os gêneros de fungos filamentosos isolados de amostras de doce de leite pastoso e *ambrosia*, foram analisadas 40 amostras de *ambrosia* e 20 de doce de leite. Foram realizadas contagens de bolores e leveduras e identificação dos gêneros de fungos filamentosos isolados. Trinta e nove (65%) amostras apresentaram contagens de bolores e leveduras acima dos limites aceitáveis. Seis gêneros fúngicos foram identificados, sendo *Penicillium* o mais frequente. Os resultados obtidos são um alerta quanto à necessidade de rigoroso controle nas boas práticas de fabricação, bem como na inspeção e fiscalização do comércio da *ambrosia* e do doce de leite pastoso.

Palavras-chave. bolores, doce de leite pastoso, *ambrosia*.

INTRODUCTION

Dulce de leche is a product obtained from the concentration and heating of milk with the addition of sucrose, developing characteristic color and taste¹. It may either have a pasty texture or be manufactured in tablets. *Ambrosia* is a kind of *dulce de leche* prepared by the addition of eggs and sugar to milk. Both *ambrosia* and pasty *dulce de leche* are largely consumed in South America, especially in Brazil, Uruguay and Argentina².

Hygiene procedures and food safety are constant concerns to consumers, as well as to institutions which are responsible for monitoring food quality. Foods can be contaminated by inadequate practices on the farm, during the manufacturing process, in the distribution centers, in the retail markets or in the consumers' homes³. However, there are few papers on *dulce de leche* in scientific bibliography. Most studies have been developed in Argentina or Brazil and focus either on the manufacturing process or on the physical and chemical characteristics of the product⁴⁻⁸.

Filamentous fungi and yeasts counts provide information on general conditions of hygiene in food processing, storage and transportation and are important indicators of food spoilage⁹. Additionally, the control of the contamination caused by these microorganisms is necessary due to the possibility of mycotoxin production by some species. According to Vechia e Castilhos-Fortes¹⁰, fungi of the *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium* genera are thought to be important toxin producers in food. Some heat and cold resistant mycotoxins can remain viable even in foods that have been subjected to technological processes and are a health hazard to the consumer. Aflatoxins are secondary metabolites synthesized by fungi of the *Aspergillus* genus and have been held responsible for the poisoning of different animal species, including man¹¹. The MAPA – Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Ministry of Agriculture, Livestock and Supply) establishes limits for filamentous fungi and yeast occurrence in *dulce de leche* in Brazil¹. The identification of filamentous fungi that are carried by highly manipulated dulces de leche, such as homemade *ambrosia* and pasty *dulce de leche* fractioned for sale, is important to evaluate the quality of these foods.

The present work aimed to identify the genera of filamentous fungi isolated from pasty *dulce de leche* and *ambrosia* samples marketed in Pelotas city, Rio Grande do Sul, Brazil.

MATERIAL AND METHODS

Twenty samples of pasty *dulce de leche* sold by local supermarkets and 40 *ambrosia* samples, 20 of which from supermarkets and 20 others from street markets, were obtained in Pelotas city, Rio Grande do Sul, Brazil. The collected samples were referred to a laboratory in their sales packages and immediately processed. Twenty-five grams of each sample were weighed and analyzed according to the Official Analytical Methods for Microbiological Analysis for Animal Product and Water Control⁹ so that filamentous fungi and yeast counts could be performed.

After the counts, spread on potato dextrose agar (Acumedia, Baltimore, MD, USA) of at least one colony showing a distinct morphology for each plate was done. After growth at 25 ± 2 °C, the cultures were kept in cool storage awaiting identification.

The isolated filamentous fungi were identified according to Lacaz et al.¹² and Sidrim & Rocha's¹³ suggested procedures by observing macroscopic characteristics of the colonies (color, texture and topography) as well as microscopic characteristics from micro cultivations kept at room temperature for a seven-day period and then viewed by lacto phenol cotton blue at a 10 and 40 fold increase.

RESULTS

Of the 40 *ambrosia* samples analysed, 30 (75 %) presented filamentous fungi and yeast counts above the limit allowed by MAPA for *dulce de leche*, which is 1.0×10^2 CFU/g¹; 15 of these samples came from supermarkets and 15 from street markets. Of the pasty *dulce de leche* samples, nine (45 %) had results exceeding the limit allowed. Only 21 (35 %) out of a total of 60 studied samples had filamentous fungi and yeast counts within acceptable limits (Table 1).

Six fungal genera were identified in *ambrosia* and pasty *dulce de leche* samples (Table 2). Yeast occurrence was observed in 9 (22.5%) out of 40 *ambrosia* processed samples, and pasty *dulce de leche* had yeasts in 3 (15 %) out of 20 studied samples.

DISCUSSION

Ambrosia and pasty *dulce de leche* for human consumption were studied as to their contamination level by filamentous fungi and yeasts and the kind of filamentous fungi found. A great number of the analysed samples had filamentous fungi and yeast counts that exceeded the limits

Table 1. Mould and yeast counts from *ambrosia* and pasty *dulce de leche* samples marketed in the city of Pelotas, RS

<i>Ambrosia</i>		<i>Pasty dulce de leche</i>
Street markets (CFU/g)	Supermarkets (CFU/g)	Supermarkets (CFU/g)
5.0 x 10 ¹	2.0 x 10 ¹	1.0 x 10 ²
5.0 x 10 ¹	1.0 x 10 ¹	4.0 x 10 ¹
8.5 x 10 ¹	6.0 x 10 ¹	<1.0 x 10 ¹
7.0 x 10 ¹	1.0 x 10 ²	<1.0 x 10 ¹
6.5 x 10^{3*}	<1.0 x 10 ¹	<1.0 x 10 ¹
5.0 x 10²	5.0 x 10³	<1.0 x 10 ¹
1.0 x 10³	7.1 x 10³	2.4 x 10²
2.2 x 10⁴	1.1 x 10³	1.1 x 10²
<1.0 x 10 ¹	1.2 x 10³	1.3 x 10²
5.5 x 10²	6.0 x 10²	2.1 x 10³
5.7 x 10³	9.2 x 10²	6.0 x 10²
3.5 x 10³	1.4 x 10³	1.1 x 10³
9.2 x 10²	7.3 x 10³	9.7 x 10³
2.8 x 10²	2.9 x 10³	2.7 x 10³
3.4 x 10³	9.4 x 10³	1.0 x 10³
3.8 x 10⁴	1.4 x 10²	7.0 x 10 ¹
6.7 x 10²	6.6 x 10²	2.1 x 10 ³
2.4 x 10²	7.3 x 10²	<1.0 x 10 ¹
8.2 x 10³	3.5 x 10²	1.1 x 10 ³
2.1 x 10³	1.6 x 10²	<1.0 x 10 ¹

* The values in bold exceed the limits determined by Brazilian law (BRASIL, 1997)

established by Brazilian law, and potentially mycotoxigenic fungus genera were identified.

The preparation of the homemade *ambrosia*, as well as the fractionation of the *dulce de leche* for sale in small portions, result in higher product handling and exposure to potential sources of contamination, which may be related to the filamentous fungi and yeast counts observed.

The *ambrosia* sold at street markets is a non-industrialized product that has often no official inspection and no guarantee of having been manufactured according to Good Manufacturing Practices (GMP). These processing conditions can affect the product's microbiological quality, as demonstrated by Sousa et al.¹⁴ in a study on homemade buffalo *dulce de leche* in which eleven out of a total of 18 analysed samples had filamentous fungi and yeast counts over 10³ CFU/g. Conversely, counts within legal standards are expected to be found in inspected products, as observed by Esser et al.¹⁵ upon analyzing *dulce de leche* (samples from different counties in the State of Minas Gerais), when they found that only 6.6 % of the samples were exceeding acceptable limits.

Supermarkets display mostly industrialized goods that have been inspected and manufactured following adequate and hygienic-sanitary procedures. However, the sheer fact that a product has undergone inspection does not guarantee that it is consumption-appropriate when acquired by the consumer. These products are often manipulated, fractioned and repacked by stores, which expose them to contamination. Timm et al.¹⁶, upon analysing pasty *dulce de leche* samples from supermarkets that were fractioned upon retail sale found filamentous fungi and yeast counts that

Table 2. Fungal genera isolated from *ambrosia* and pasty *dulce de leche* samples from supermarkets and street markets in the city of Pelotas, Rio Grande do Sul

Genus	Samples			Total Nº (%)
	<i>Ambrosia</i>		<i>Pasty dulce de leche</i>	
	Street markets Nº (%)*	Supermarkets Nº (%)	Supermarkets Nº (%)	
<i>Penicillium</i>	11 (55)	10 (50)	6 (30)	27 (45)
<i>Cladosporium</i>	3 (15)	3 (15)	0 (0)	6 (10)
<i>Aspergillus</i>	4 (20)	2 (10)	0 (0)	6 (10)
<i>Rhizopus</i>	1 (5)	0 (0)	1 (5)	2 (3.3)
<i>Alternaria</i>	0 (0)	0 (0)	1 (5)	1 (1.7)
<i>Paecilomyces</i>	0 (0)	0 (0)	1 (5)	1 (1.7)
<i>Sterile mycelium</i>	0 (0)	5 (25)	6 (30)	11 (18.3)

* (Nº) Number of isolates; (%) percentage in relation to the number of studied samples

varied from 1.4×10^1 to 6.0×10^4 CFU/g. Only one sample had filamentous fungi and yeast counts within acceptable values according to Brazilian standards. Castro et al.¹⁷ also obtained counts exceeding legal limits for both inspected and non-inspected *dulce de leche* samples.

The fungi isolated from the analyzed samples belong to genera that promote food deterioration³. In addition, some species belonging to the *Aspergillus* and *Penicillium* genera can produce mycotoxins^{18,19}. The *Penicillium* genus was the most frequently found in the analysed pasty *dulce de leche* samples. *Aspergillus* ssp. grows in high sugar concentrations¹⁰, which can be considered an important factor in the occurrence of this genus in the *ambrosia* analysed samples. In spite of the fact that the toxin occurrence in *dulce de leche* was not the focus of this study, this possibility cannot be overruled. Taniwaki et al.²⁰ isolated *Aspergillus* ssp. and *Penicillium* ssp. strains in cheese samples and found two citrinin- and patulin-producing species. According to Gava²¹, spores and mycelium fragments can contain high toxin concentrations, which makes the *Aspergillus* occurrence in *dulce de leche* a public health hazard.

CONCLUSION

The *ambrosia* and pasty *dulce de leche* marketed in the city of Pelotas had filamentous fungi and yeast counts that exceeded the admissible limit, including species that are potentially mycotoxigenic, which justifies the adoption of a stricter control on the good manufacturing practices, on the inspection and also on the monitoring of the food trade.

REFERENCES

1. Brasil. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de doce de leite. Portaria nº 354, de 04/09/97. Diário Oficial [da] União, Brasília, DF, 08 set. 1997. Seção I, p. 19685.
2. Paylovic S, Santos RC, Silva ME, Gloria MBA. Effect of processing on the nutritive value of *Doce de Leite*, a typical Latin-American confectionary product. *Arq Biol Tecnol*. 1992; 35(4): 691-8.
3. Franco BDGM. Importância dos microrganismos nos alimentos. In: Franco BDGM, Landgraf M. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Editora Atheneu; 2003, p. 1-12.
4. Demiate IM, Konkel FE, Pedrosa RA. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de doce de leite pastoso - composição química. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2004; 24(2):249-54.
5. Garitta L, Hough G, Sánchez R. Sensory Shelf Life of *Dulce de Leche*. *J Dairy Sci*. 2004; 87:1601-7.
6. Konkel FE, Oliveira SMR, Simões DRS, Demiate IM. Avaliação sensorial de doce de leite pastoso com diferentes concentrações de amido. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2004; 24(2):249-54.
7. Malec LS, Llosa RA, Vigo MS. Sugar formulation effect on available lysine content of *dulce de leche*. *J Dairy Res*. 1999; 66:335-9.
8. Pauletti MS, Castela EL, Seguro E. Kinetics of Heat Coagulation of Concentrated Milk Proteins at High Sucrose Contents. *J Food Sci*. 1996; 61(6):1207-10.
9. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Instrução Normativa nº62, de 26/08/2003. Diário Oficial [da] União, Brasília, DF, 18 set. 2003. Seção I, p. 14-51.
10. Vechia AD, Castilhos-Fortes R. Contaminação fúngica em granola comercial. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2007; 27(2):324-7.
11. Pereira MMG, Carvalho EP, Prado G, Rosa CAR, Veloso T, Souza LAF, et al. Aflatoxinas em alimentos destinados a bovinos de leite e em amostras de leite da região de Lavras, Minas Gerais - Brasil. *Ciênc Agrotecnol*. 2005; 29(1):106-12.
12. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT. Tratado de Micologia Médica Lacaz. São Paulo: Sarvier; 2002. 1104 p.
13. Sidrim JJC, Rocha MFG. *Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos*. São Paulo: Guanabara Koogan; 2004. 408 p.
14. Sousa CL, Neves ECA, Carneiro CAA, Farias JB, Peixoto MRS. Avaliação microbiológica e físico-química de doce de leite e requeijão produzidos com leite de búfala na Ilha de Marajó - PA. *Boletim CEPPA*. 2002; 20(2):191-202.
15. Esser LR, Baião RC, Rego IOP, Klein RWT, Figueiredo TC, Lima AL. Avaliação da qualidade microbiológica de amostras industriais de doce de leite em Minas Gerais. Anais II Congresso Latino-Americano de Analistas de Alimentos; 2009; São Paulo: Sociedade Brasileira de Analistas de Alimentos.
16. Timm CD, Conceição RCS, Coelho FJO, Roos TB, Tejada TS, Quevedo PS, et al. Avaliação microbiológica de doce de leite pastoso. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2007; 66(3): 275-7.
17. Castro PL, Brandão CO, Leal DIB, Costa DSS, Oliveira IS, MoraesTPN, et al. Resultados preliminares da bacteriologia de doce de leite pastoso comercializado em Teresina, PI. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária; 35º, 2008; Gramado: Conselho Federal de Medicina Veterinária. [acesso 2010 Mai 25]. Disponível em: [http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R0740-3.pdf].
18. Hocking AD. Toxigenic *Aspergillus* species. In: Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ. *Food microbiology: fundamental and frontiers*. 2ª ed. Washington: ASM; 2001. p. 451-465.
19. Pitt JI. Toxigenic *Penicillium* species. In: Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ. *Food microbiology: fundamental and frontiers*. 2ª ed. Washington: ASM; 2001, p. 467-82.
20. Taniwaki MH, Van Dender AGF. Occurrence of toxigenic molds in Brazilian cheese. *J Food Protect*. 1992; 55(3):187-191.
21. Gava MA. Desempenho de diferentes meios de cultura utilizados na avaliação de fungos presentes em ambientes de produção de alimentos [dissertação de mestrado]. Piracicaba (SP): Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo; 2002.

Avaliação do teor de retinol em leite UHT suplementado em conformidade com a rotulagem

Assessing the retinol concentration in supplemented UHT milk and the compliance with the information on the product label

RIALA6/1402

Mayara Santa Rosa LIMA¹, Larissa Queiroz de LIRA², Roberto DIMENSTEIN^{3*}

*Endereço para correspondência: 3Laboratório de Bioquímica de Alimentos e Nutrição, Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Av. Senador Salgado Filho, nº3000 Bairro: Lagoa Nova, Natal/RN CEP: 59072-970 Fone: 55(0**84) 3215-3416 ramal 205. Fax 55(0**84)32119208 e-mail: rdimenstein@gmail.com

¹Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte

²Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Recebido: 18.01.2011 – Aceito para publicação: 05.09.2011

RESUMO

O consumo de leite bovino UHT (*ultra-high temperature*) suplementado com nutrientes essenciais apresenta-se como uma forma de amenizar a ingestão insuficiente dos mesmos pela população. Dentre esses nutrientes, destaca-se a vitamina A, cuja deficiência é uma das principais causas de problemas de saúde no mundo. O objetivo deste estudo foi verificar a conformidade do teor de retinol especificado no rótulo de leites UHT suplementados com a quantidade detectada no produto. Foram analisadas três marcas de leite UHT comercializadas em Natal/RN. A determinação do retinol foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Somente uma marca de leite suplementado (B) continha a concentração de vitamina A condizente com a do rótulo. As demais (A e C) apresentaram informações de rotulagem conflitantes com os níveis de retinol encontrados nos produtos. Nas amostras da marca A foi detectado, em média, 61% a mais da vitamina e na marca C cerca de 30% menos, em relação às quantidades declaradas nas embalagens. Há necessidade de efetuar maior controle quanto ao enriquecimento de leites para garantir a confiabilidade das informações nutricionais presentes nos rótulos e evitar a ingestão insuficiente de vitamina A ou, até mesmo, uma possível toxicidade pelo seu consumo excessivo.

Palavras-chave. leite de vaca, vitamina A, alimentos suplementados.

ABSTRACT

The consumption of UHT (ultra-high temperature) bovine milk supplemented with essential nutrients is a practice to reduce the inadequate nutrients intake by population. Vitamin A is one of these nutrients, whose deficiency is a major reason in causing health problem in the world. The aim of this study was to verify the compliance of the retinol concentration specified on the label of supplemented UHT milk package with the amount detected in the product. Three brands of UHT milk marketed in Natal/RN were analyzed. The retinol concentration was determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). One brand of supplemented milk (B) contained the vitamin A concentration in compliance with that stated on the label. The brands A and C showed the label information inconsistent with the retinol contents found in the products. The milk A showed a higher average about 61% more vitamin and the milk C about 30% lower than those quantities informed on the label. A special concern on the milk enrichment should be taken to ensure the reliable nutritional information stated on the labels, and to avoid an insufficient vitamin A intake or even a probable toxicity due to excessive nutrient consumption.

Keywords. cow's milk, vitamin A, food, supplemented.

INTRODUÇÃO

O leite constitui um item básico na alimentação humana, especialmente na alimentação infantil, contribuindo para o crescimento e desenvolvimento das crianças por meio do fornecimento de nutrientes essenciais^{1,2}. A vitamina A, uma das principais vitaminas lipossolúveis encontradas no leite, é essencial na infância, devido ao fundamental papel que exerce em períodos de proliferação e diferenciação celular, além da participação em diversos mecanismos biológicos, como a reprodução, a visão normal e a manutenção do sistema imune^{3,4}.

O leite materno é, sem dúvida, o melhor alimento para crianças até seis meses de idade, por proporcionar vantagens nutricionais, imunológicas e psicológicas ao lactente⁵. A partir dos seis meses, alimentos complementares são introduzidos na alimentação da criança, dentre estes o leite de outras espécies ou fórmulas especiais⁶.

O leite bovino é o “produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições adequadas de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas”⁷. Esse leite pode passar por diversos tipos de tratamentos na indústria, entre eles o processo UHT (*ultra-high temperature*). Este consiste em submeter o leite homogeneizado, por 2 a 4 segundos, a uma temperatura entre 130 °C e 150 °C, mediante um processo térmico de fluxo contínuo, após o qual é feito um resfriamento imediato a uma temperatura inferior a 32 °C e o produto é envasado sob condições assépticas em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas⁸. O tratamento UHT promove a destruição de quase todas as formas de microrganismos do leite, aumentando de maneira significativa a vida comercial do produto, cuja conservação é assegurada por meses⁹.

No Brasil, o leite bovino UHT é hoje, o mais consumido, estando presente em 85% dos lares e representando 76% do volume de leite fluído consumido¹⁰. No Estado do Rio Grande do Norte, o consumo deste leite predomina nas três principais cidades¹¹.

Atualmente, pode-se encontrar no mercado algumas marcas de leite UHT suplementado com nutrientes essenciais, como forma de amenizar a ingestão insuficiente de alguns desses por parte da população^{12,13}. Nesse sentido, destaca-se a suplementação de produtos com vitaminas lipossolúveis¹⁴, dentre elas a vitamina A, cuja deficiência é considerada um problema de saúde pública de grande relevância no mundo¹⁵.

O uso de vitaminas para o enriquecimento de leites também é uma prática comum para compensar perdas decorrentes do processamento ou durante a estocagem. Desse modo, é habitual a indústria de alimentos adicionar maior quantidade de vitaminas do que a descrita no rótulo, o que é permitido, desde que justificado tecnologicamente^{16,17}. Porém, apesar da concentração do nutriente adicionado não poder corresponder a uma ingestão insignificante, também não pode ultrapassar o limite máximo diário tolerável, considerando as quantidades derivadas de outros alimentos da dieta e as necessidades do consumidor a que se destina¹⁷.

A preocupação em relação à confiabilidade dos valores de nutrientes declarados nos rótulos dos alimentos suplementados é crescente e alguns fatores, como a possível toxicidade de alguns deles, aumentam a necessidade de se determinar a composição química de micronutrientes em alimentos¹⁴.

Dessa maneira, a análise de vitamina A em leites suplementados torna-se importante tanto pelo papel que este nutriente exerce para a saúde, quanto para garantir a qualidade destes produtos e assegurar que a legislação vigente sobre esse tipo de alimento seja cumprida. Além disso, quantificar o conteúdo dos nutrientes adicionados ao leite após a etapa de processamento e o período de estocagem pode colaborar para o entendimento da forma mais adequada de suplementação desse alimento, evitando perdas ou excessos durante o procedimento.

No entanto, as análises de vitaminas não são consideradas de rotina na indústria de laticínios e estudos sobre os teores de vitamina A em leites integrais esterilizados são escassos. Neste aspecto, este estudo foi realizado com o objetivo de quantificar os níveis de retinol de leites UHT suplementados com esta vitamina e verificar sua conformidade com os valores especificados nos rótulos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas três marcas de leite UHT suplementado com vitamina A comercializadas em supermercados da cidade de Natal - RN. Para cada marca de leite UHT foram utilizadas quatro caixas de 1 L pertencentes ao mesmo lote, totalizando doze amostras. Os produtos datavam tempo inferior a trinta dias de fabricação e não possuíam danos aparentes nas embalagens.

Para extração da vitamina A, o conteúdo de cada recipiente foi previamente homogeneizado durante 10

minutos em agitador magnético Fanem®, modelo 257 (São Paulo, Brasil), utilizando béquer de 1 L devidamente protegido da luz. De cada amostra, foram retiradas duas alíquotas de 1 mL de leite, que foram transferidas para tubos de polipropileno, também protegidos da luminosidade.

A extração foi realizada segundo o método de Giuliano et al.¹⁸ modificado. Para tanto, a cada tubo contendo 1 mL de leite foram adicionados 1 mL de hidróxido de potássio 50% (Vetec) e 1 mL de álcool etílico 95% (Vetec), para as etapas de hidrólise alcalina e desnaturação protéica. Em seguida, as alíquotas foram homogeneizadas durante 1 minuto e mantidas em banho-maria a 45 °C por duas horas, sendo agitadas a cada 15 minutos.

O reagente extrativo utilizado foi o hexano (Quimex), sendo adicionados 2 mL deste a cada tubo. Feita a adição, os tubos foram agitados por 1 minuto e centrifugados durante 10 minutos, após os quais o extrato hexânico foi transferido para outro tubo. Esse procedimento foi realizado três vezes, até a obtenção de 6 mL do extrato de cada amostra, que foram agitados e centrifugados por 5 minutos, para retirada de alíquotas de 2 mL. Estas foram evaporadas em banho-maria a 37 °C, sob atmosfera de nitrogênio.

Para a análise bioquímica do retinol, o extrato seco foi redissolvido em 500 µl de etanol absoluto (Merck) em grau de pureza para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). A concentração de retinol das amostras foi determinada por CLAE em cromatógrafo LC-10 AD Shimadzu, acoplado a um detector SPD-10 A Shimadzu UV-VIS e integrador Chromatopac C-R6A Shimadzu com uma coluna LC Shim-pack CLC-ODS (M) 4,6 mm x 25 cm. O comprimento de onda utilizado para detecção do retinol foi 325 nm. O cromatograma evoluiu nas seguintes condições: metanol 100% e fluxo 1,0 mL/min. A identificação e quantificação do retinol nas amostras foram estabelecidas por comparação com o tempo de retenção e a área do respectivo padrão (Figura 1A). A concentração do padrão foi confirmada pelo coeficiente de extinção específico (ϵ 1%, 1 cm = 1850 a 325 nm) em etanol absoluto (Merck)¹⁹.

Para avaliar a exatidão do método, foi adicionado padrão de retinol acetato a amostras de 1 mL de leite, procedendo-se a extração (exceto saponificação, pois o retinol acetato não resiste a essa etapa) e aplicação em CLAE, obtendo-se uma recuperação total do padrão interno de retinol adicionado às amostras.

A precisão foi avaliada por meio do teste de repetitividade, no qual triplicatas de uma amostra de leite,

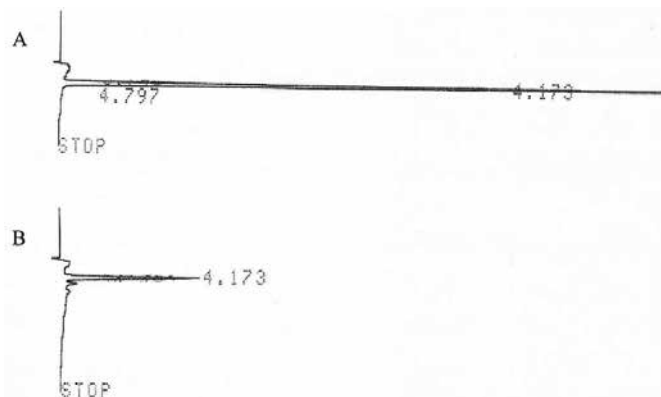


Figura 1. Perfis cromatográficos a 325nm do padrão de retinol (26,12ng/20µL) (A) e extrato de leite enriquecido com vitamina A (B).

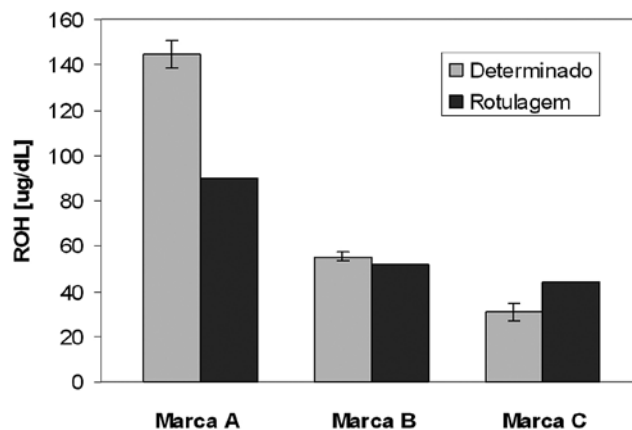


Figura 2. Concentração de retinol (µg/dL) em leites UHT suplementados, em comparação às quantidades de vitamina A declaradas na rotulagem.

que passaram pela etapa de extração, foram aplicadas em CLAE durante 3 dias alternados. O coeficiente de variação encontrado foi de 2,7%.

A curva padrão foi realizada utilizando padrão referência retinol todo trans (Sigma) em diferentes concentrações, que variavam de 2 a 32 ng/20µL. Os limites de detecção e quantificação foram baseados na linearidade da curva do padrão, sendo obtidos valores de 0,05 µg/mL e 0,1 µg/mL, respectivamente.

A concentração de retinol foi expressa em µg/dL e os resultados foram apresentados em média e desvio-padrão.

RESULTADOS

O perfil cromatográfico do retinol visualizado a partir da análise de um extrato de leite UHT suplementado com vitamina A é demonstrado na Figura 1B.

As concentrações médias de vitamina A encontradas nas marcas A, B e C foram, respectivamente, $144,7 \pm 6,1$ $\mu\text{g/dL}$; $55,4 \pm 1,9$ $\mu\text{g/dL}$; $30,7 \pm 3,9$ $\mu\text{g/dL}$. Os valores expressos nos rótulos, por sua vez, eram 90 $\mu\text{g/dL}$ (A), 52 $\mu\text{g/dL}$ (B) e 44 $\mu\text{g/dL}$ (C), como pode ser visto na Figura 2.

Verificou-se que somente uma marca de leite suplementado analisada (B) obteve concentração de vitamina A condizente com a declarada no rótulo do produto. A marca A apresentou, em média, 61% a mais da vitamina em relação à quantidade expressa na rotulagem. Já na marca C, a concentração média encontrada para a vitamina foi 30% menor do que a apresentada no rótulo.

DISCUSSÃO

As informações presentes nos rótulos dos alimentos são destinadas a identificar a origem destes, assim como sua composição e características nutricionais. Essas informações orientam o consumidor em relação à qualidade e quantidade dos nutrientes que compõem o produto, o que pode levar à escolha de determinados alimentos pelo público. Neste sentido, é de grande importância a fidedignidade das informações contidas na rotulagem²⁰.

No entanto, algumas pesquisas constataram resultados conflitantes no que diz respeito à declaração da concentração de nutrientes nos rótulos de alimentos. Em estudo sobre os teores de vitamina A em produtos enriquecidos, Fávoro et al.²¹ observaram que menos da metade das amostras analisadas apresentavam teor de vitamina A dentro da variação permitida pela legislação, que corresponde ao conteúdo vitamínico 20% inferior ou superior ao declarado no rótulo. Os autores constataram que 14% das amostras apresentavam teor abaixo da faixa permitida e 41% acima.

No presente estudo, duas das três marcas de leite enriquecido analisadas apresentaram quantidades de retinol conflitantes com as declaradas no rótulo, o que mostra a falta de cuidado em relação à suplementação de produtos com vitamina A.

A adição, em quantidades adequadas, de vitamina A em alimentos é uma estratégia válida, principalmente em regiões com populações carentes, para evitar as consequências da deficiência dessa vitamina, tais como: xerofalmia; cegueira noturna; alterações do paladar, anorexia; aumento da pressão intracraniana; entre outros. A deficiência desse micronutriente afeta milhões

de pessoas no mundo inteiro, principalmente crianças, sendo uma das principais causas evitáveis de cegueira. Por outro lado, a ingestão crônica excessiva de vitamina A também pode implicar em vômitos, perda de peso, febre, dor de cabeça, alopecia, pele seca, hepatomegalia, dores ósseas e articulares, entre outros sintomas¹⁵.

Ao comparar as concentrações de retinol encontradas nos leites analisados neste trabalho ao valor disponível na literatura referente a leites integrais não suplementados (21 $\mu\text{g/dL}$), pode-se inferir que a adição de vitamina A foi realizada nos produtos analisados. Porém, no caso específico da marca C, a suplementação ocorreu de maneira insuficiente. Isso destaca o fato de que a adição de micronutrientes em produtos industrializados também tem sido utilizada apenas como estratégia de marketing, na qual os interesses comerciais prevalecem sobre as necessidades nutricionais do indivíduo¹⁴.

Abranches et al.¹⁶, com base em diversos autores, ressaltam que a estabilidade das vitaminas durante a estocagem do leite processado depende das quantidades de ácido ascórbico e oxigênio presentes, uma vez que um é protetor e o outro atua na degradação da vitamina. Esse fato pode ter contribuído para uma diminuição no teor de vitamina A no leite da marca C, uma vez que o oxigênio residual nas embalagens UHT pode ocasionar perdas¹⁶, fazendo com que o conteúdo da vitamina fique inferior ao referido no rótulo.

Além disso, as condições de processamento do leite também podem ter levado à perda vitamínica, visto que a adição de nutrientes essenciais ocorre previamente ao processamento. Soma-se a este fato, a observação de que a vitamina A adicionada aos produtos alimentícios é menos estável, em relação à vitamina presente naturalmente nos alimentos²³.

Uma vez que a degradação nutricional ocorre durante o processamento e o armazenamento do produto, é recomendado que o teor de vitamina A utilizado no enriquecimento do leite garanta que sua concentração seja mantida em conformidade com a declarada no rótulo, até o momento do seu consumo. Para alcançar este objetivo, também são necessárias análises quanto à definição das condições ideais para a estabilização do conteúdo nutricional durante o período que antecede o consumo do leite¹⁶.

Em relação à marca A, a superdosagem de vitamina A pode ter sido feita prevendo as possíveis perdas desse micronutriente durante o processamento e estocagem do leite. No entanto, existe a necessidade do

controle das quantidades adicionadas, uma vez que o consumo do leite não pode implicar em ingestão excessiva da vitamina por parte do consumidor, considerando o consumo dos demais alimentos que são fontes naturais do micronutriente¹⁷.

Como forma de contornar problemas como esses, é importante que se estabeleçam os níveis mínimo e máximo de vitamina A por porção habitualmente consumida de produtos enriquecidos, visando à satisfação das necessidades nutricionais e à segurança do consumidor²¹.

CONCLUSÃO

Das três marcas de leite UHT suplementado estudadas, duas apresentaram diferenças entre o teor de retinol determinado e o especificado no rótulo do produto, estando o teor vitamínico fora da faixa de 20% de variação estabelecida pela legislação. Com base nisso, recomenda-se maior controle no que diz respeito à adição de vitamina A aos leites, a fim de que a quantidade a ser adicionada ao produto seja suficiente para garantir a conformidade com a rotulagem, sem, no entanto, implicar em teores excessivos no produto final.

REFERÊNCIAS

1. Guzmán EC, de Pablo SV, Yanes CGG, Zacarias IH, Nieto SK. Estudio comparativo de calidad de leche fluida y en polvo. *Rev Chil Pediatr* 2003; 74(3): 277-86.
2. Ferreira IM. Quantification of non-protein nitrogen components of infant formulae and follow-up milks: comparison with cows' and human milk. *Br J Nut* 2003; 90(1): 127-33.
3. Almeida-Muradian LB, Penteado MVC. Vitamina A. In: Penteado MVC. *Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos*. 1ª ed. São Paulo: Ed. Manole; 2003. p.55-72.
4. Saunders C, Ramalho RA, Leal MC. Estado nutricional de vitamina A no grupo materno-infantil. *Rev Bras Saúde Materno-Infantil* 2001; 1: 21-9.
5. World Health Organization - WHO. The optimal duration of exclusive breastfeeding. Note for the press no. 7. 2001, April 2. [acesso 2004 Jul 05]. Disponível em: [http://www.who.int/inf-pr-2001/en/note2001-7.html].
6. Ribeiro ELA, Ribeiro HJSS. Uso nutricional e terapêutico do leite de cabra. *Semin Cienc Agrárias*. 2001; 22(2): 229-35.
7. Brasil. Instrução Normativa nº 51, de 18 de set. 2002 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Aprova os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, e o Regulamento Técnico da Coleta do Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 18 set. 2002. Seção 1, p. 13.
8. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146, de 07 de mar. 1996. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Produtos Lácteos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 07 mar. 1996. Seção 1, p. 3977.
9. Souza LG, Santos GT, Sakaguti, ES, Damasceno JC, Matsushita M, Horst JA et al. Avaliação da composição do leite UHT proveniente de dois laticínios da Região Norte e Noroeste do Estado do Paraná. *Acta Scientiarum* 2004; 26(2): 259-64.
10. Associação Brasileira da Indústria de Leite Longa Vida - ABVL: uma trajetória de 15 anos de conquistas. São Paulo; 2009. [acesso 2010 Nov 03]. Disponível em: [http://www.abvl.org.br/Historia.asp].
11. Soares KMP, Góis VA, Aroucha EMM, Verissimo AMOT, Silva JBA. Hábitos de consumo de leite em três municípios do Estado do Rio Grande do Norte. *Rev Verde*. 2010; 5(3): 160-4.
12. Soares FB, Sousa JM, Dimenstein R. Avaliação da concentração de retinol em leite UHT ("Ultra High Temperature") comercializado em Natal. *Quim Nova* 2008; 31(2): 268-9.
13. Lima JA, Catharino RR, Godoy HT. Ácido fólico em leite e bebida láctea enriquecidos: estudo da vida-de-prateleira. *Ciênc Tecnol Aliment* 2004; 24(1): 82-7.
14. Paixão JA, Stanford TLM. Vitaminas lipossolúveis em alimentos - uma abordagem analítica. *Quim Nova* 2004; 27(1): 96-105.
15. Asakura L, Castro TG, Tomita LY. Vitamina A, retinóides e carotenóides. In: Cardoso MA, coordenadora, Vannucchi H, editor. *Nutrição e Metabolismo*. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan; 2006. p. 81-103.
16. Branches MV, Della Lucia CM, Sartori MA, Pinheiro-Sant'ana HM. Perdas de vitaminas em leites e produtos lácteos e possíveis medidas de controle. *Alim Nutr* 2008; 19(2): 207-17.
17. Brasil. Portaria nº 31, de 13 de jan. 1998 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Aprova o Regulamento Técnico referente a Alimentos Adicionados de Nutrientes Essenciais. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 31 jan. 1998. Seção I-E, p. 4.
18. Giuliano AR, Neilson EM, Kelly BE, Canfield LM. Simultaneous quantitation and separation of carotenoids and retinol in human milk by high-performance liquid chromatography. *Methods Enzymol* 1992; 213: 391-9.
19. Nierenberg DW, Nann SL. A method for determining concentrations of retinol, tocopherol and five carotenoids in human plasma and tissue samples. *Am J Clin Nutr* 1992; 56: 417-26.
20. Câmara, MCC, Marinho CLC, Guilam MC, Braga AMCB. A produção acadêmica sobre a rotulagem de alimentos no Brasil. *Rev Panam Salud Publica* 2008; 23(1): 52-8.
21. Fávoro RMD, Garrido NS, Garotti WDO, Yokosawa CE, Ilha MH, Jordão Junior AA et al. Teor de vitamina A em alimentos enriquecidos. *Rev Inst Adolfo Lutz* 1998; 57(1): 41-8.
22. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação [NEPA]. *Tabela Brasileira de Composição de Alimentos [TACO]*. Versão II. 2ª ed., Campinas (SP): NEPA-UNICAMP; 2006.
23. Bartholomew BP, Ogden LV. Effect of emulsifiers and fortification methods on light stability of vitamin A in milk. *J Dairy Sci* 1990; 73(6): 1485-8.

Elaboração de iogurte com leite caprino e geleia de frutas tropicais

Development of a goat milk yogurt flavored with tropical fruits

RIALA6/1403

Rita de Cássia Ramos do Egypto QUEIROGA^{1*}, Yasmim Regis Formiga de SOUSA¹, Márcia Gabrielle Ferreira da SILVA¹, Maria Elieidy Gomes de OLIVEIRA², Heloisa Maria Holtz SOUSA¹, Carlos Eduardo Vasconcelos de OLIVEIRA²

*Endereço para correspondência: ¹Departamento de Nutrição - Universidade Federal da Paraíba. Campus I, João Pessoa-PB. Av. Umbuzeiro, 185, Apto. 401, Manaira, João Pessoa, PB, CEP: 58038-180. Fone (83) 3216-7826. E-mail: rcqueiroga@uol.com.br

²Departamento de Nutrição - Universidade Federal de Pernambuco.

Recebido: 07.04.2011 – Aceito para publicação 24.10.2011

RESUMO

O objetivo desse estudo foi elaborar o iogurte caprino com adição de frutas tropicais e realizar a caracterização físico-química, microbiológica e sensorial das amostras. Aos iogurtes foram adicionadas diferentes concentrações (15% e 20%) de geleia de abacaxi, cajá, maracujá e umbu. Os valores médios obtidos na determinação do extrato seco total, resíduo mineral fixo, acidez, proteínas, carboidratos totais e lipídeos variaram, respectivamente, entre 15,30 – 20,58%; 0,63 – 0,72%; 0,75 – 1,13%; 2,61 – 3,33%; 3,24 – 8,40% e 1,40 – 5,90%. Não foi detectada a presença de coliformes totais, coliformes termotolerantes ou *Salmonella* nas amostras. Os atributos aparência, sabor, textura e avaliação global dos iogurtes naturais, abacaxi, cajá e maracujá foram semelhantes ($p>0,05$). Da mesma maneira, a cor dos iogurtes natural e sabor maracujá, e o aroma para os iogurtes sabor abacaxi e maracujá não apresentaram diferenças ($p>0,05$). O iogurte de umbu indicou menores escores médios em relação a todos os atributos avaliados. No que diz respeito à intenção de compra, todos receberam boa aceitação pelos consumidores.

Palavras-chave. derivados lácteos, caprinos, frutas, composição, sensorial.

ABSTRACT

This study aimed at producing and assessing the physical-chemical, microbiological and sensory characteristics of a goat milk yogurt flavored with tropical fruits. Two different concentrations (15% and 20%) of pineapple, *cajá*, passion fruit and *umbu* jellies were added to the goat milk yogurt samples. The average values for total solids, ash, acidity, protein, carbohydrate and lipids ranged of 15.30 to 20.58%; 0.63 - 0.72%; 0.75 to 1.13%; 2.61 - 3.33%; 3.24 - 8.40% and 1.40 to 5.90%, respectively. The total coliforms, fecal coliforms or *Salmonella* were not detected. The attributes of appearance, flavor, texture and general features for natural yogurt, pineapple, passion fruit and *cajá* added in samples were similar ($p>0.05$). Also, the color of natural yogurt and passion fruit flavor, as well as the aroma and the flavor of pineapple and passion fruit flavor yogurts did not show any difference ($p>0.05$). The yogurt prepared with *umbu* jelly has showed the lowest averages for all of tested attributes. Regarding to the purchase intention, all of them were scored as good acceptance by consumers.

Keywords. dairy products, goats, fruits, composition, sensory.

INTRODUÇÃO

A caprinocultura leiteira tem aumentado de forma significativa sua participação no cenário agropecuário brasileiro, superando o constante desafio de conquistar e manter novos mercados para o leite de cabra e seus derivados. Esta atividade pecuária tem crescido, principalmente, na região Nordeste que possui quase 93% do rebanho caprino nacional, destacando os Estados da Bahia e Pernambuco, detentores dos maiores efetivos de caprinos e produção leiteira^{1,2}. O que torna isso possível é o fato do leite caprino ser considerado um produto de alto valor nutritivo, além disso, esses animais apresentam boa capacidade adaptativa em condições criatórias variáveis, comuns na zona semiárida, podendo proporcionar às famílias de baixa renda e à população em geral, uma melhoria do nível nutricional da dieta³.

O Nordeste do Brasil possui a maior produção de caprinos do país, a região apresenta limitações para o desenvolvimento dessas atividades, o que dificulta significativamente o aumento da produção e a sustentabilidade desse segmento, principalmente, aqueles vinculados à pequena produção. Isto decorre, sobretudo, da pouca eficiência dos atuais sistemas de produção, bem como, da inexistência de tecnologias para o processamento dos derivados, que é realizado de modo artesanal no meio rural, com ineficiência, insuficiente capacitação e pouca organização dos produtores. Na opinião dos consumidores, o leite de cabra e seus derivados são produtos diferenciados, sendo vistos como alimentos de alto valor nutritivo, muito saudável e de boa qualidade. Porém, o mercado é ainda restrito, sendo necessários estudos sobre o processamento do leite caprino e pesquisas que venham contribuir para seu desenvolvimento, a fim de difundir seu potencial no mercado. Isso inclui a diversificação dos produtos derivados, campanhas de incentivo ao consumo e divulgação das características únicas do leite caprino⁴⁻⁶.

Os alimentos lácteos caprinos são uma alternativa interessante do ponto de vista nutricional, tendo em vista que o leite de cabra possui proteínas e lipídios de comprovado valor nutricional, além de elevada digestibilidade^{7,8}. No entanto, ainda são necessárias pesquisas que contribuam para o melhor aproveitamento tecnológico do leite de cabra, obtendo-se produtos de qualidade e alto valor nutricional. Dubeuf et al.⁹ afirmam que derivados lácteos de cabra podem ser produzidos com qualidade e baixo custo, desde que haja pesquisa e

incentivo para novas alternativas para os mercados locais, nacionais e internacionais.

Entre os derivados lácteos, o iogurte vem se tornando mais popular devido ao modo de vida da população, sendo incluído na rotina diária por ser prático e de fácil consumo, além da imagem positiva de alimento saudável, nutritivo, saboroso e com destacado potencial funcional^{10,11}. Dentro deste contexto, tem-se observado constante sofisticação tecnológica, com o surgimento crescente de novos produtos no mercado, cujos fabricantes preocupam-se em diversificar sabores e aromas utilizando essências, extratos de frutas e/ou frutas preparadas de uma ou mais espécies, que constitui uma opção melhor quando comparada à utilização de aromas artificiais. O Brasil é rico em frutas de sabores característicos, destacando-se a Região Nordeste como grande produtora de frutas tropicais. Estas frutas são especialmente desejadas por sua impressão aromática específica e intensa, podendo ser uma alternativa de adição na fabricação do iogurte batido, após o adequado processamento tecnológico, agregando valor econômico e nutricional importante ao produto¹²⁻¹⁴.

Neste sentido, este estudo avalia a produção de iogurte utilizando-se frutas regionais e leite caprino, como uma alternativa tecnológica para pequenos produtores, atendendo aos requisitos de segurança alimentar e visando contribuir para melhoria da renda familiar. Assim, objetivou-se elaborar, a partir de leite de cabra, iogurte natural e iogurtes com geleias de frutas regionais (abacaxi, cajá, maracujá e umbu), nos quais foram avaliados os constituintes físico-químicos, características microbiológicas e o perfil sensorial.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de execução e amostragem

Foram coletadas amostras de leite caprino de um rebanho homogêneo, constituído por aproximadamente 50 animais mestiços da raça Saanen, provenientes do Setor de Caprinocultura da Universidade Federal da Paraíba UFPB, produzindo em média 1500 g/dia de leite. A ordenha foi realizada manualmente, observando-se os cuidados higiênicos. Todos os utensílios utilizados para coleta do leite foram previamente limpos e secos. Após a ordenha, o leite caprino foi submetido à pasteurização lenta (65 °C/30 minutos), embalado em sacos plásticos de polietileno e transportado sob refrigeração (± 10 °C) em caixas isotérmicas até a UFPB.

A cultura láctica termofílica utilizada no experimento foi composta por *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (fermento Rich, Christian Hansen®, Valinhos, São Paulo, Brasil). Para o presente estudo foram preparados cinco tratamentos, descritos a seguir:

a) Iogurte natural (IN) – iogurte de leite de cabra sem adição de geleia de fruta.

b) Iogurte sabor abacaxi (IA) – iogurte de leite de cabra com adição de geleia de abacaxi nas concentrações de 15 ou 20% (p/v);

c) Iogurte sabor cajá (IC) – iogurte de leite de cabra com adição de geleia de cajá nas concentrações de 15 ou 20% (p/v);

d) Iogurte sabor maracujá (IM) – iogurte de leite de cabra com adição de geleia de maracujá nas concentrações de 15 ou 20% (p/v);

e) Iogurte sabor umbu (IU) – iogurte de leite de cabra com adição de geleia de umbu nas concentrações de 15 ou 20% (p/v).

Elaboração das geleias

Para a elaboração das geleias de frutas o abacaxi, o cajá e o maracujá foram adquiridos na forma de polpa em supermercados da cidade de João Pessoa/PB e o umbu na forma “in natura” em feiras-livres da mesma cidade, por não ter sido encontrado na forma de polpa industrializada. A elaboração da polpa de umbu foi realizada após a devida higienização e sanitização das frutas, que foram trituradas e em seguida submetidas a uma filtração simples.

Na elaboração das geleias, utilizou-se 560 g de polpa de fruta (70%), 240 g de açúcar refinado (30%) e 320 mL de água (40%). Inicialmente foi preparado xarope com água e açúcar, adicionando-se em seguida a polpa da fruta mantendo a mistura em aquecimento a aproximadamente 180 °C (± 1 °C) até a obtenção de uma consistência de gel. A verificação do ponto de geleia foi feita com base no teor de sólidos solúveis (°Brix), utilizando refratômetro Abbe (marca Analytik Jena), que segundo a legislação específica, deve ser de no mínimo 62% p/p¹⁵.

Elaboração dos iogurtes caprinos com adição de geleia de fruta

Para a elaboração de 1 litro de iogurte, a mistura leite de cabra pasteurizado (90%) e açúcar cristal (10%), contida em bécquer de 1 litro, foi tratada termicamente a 90 °C (± 1 °C) por 10 minutos. Após resfriamento até

45 °C (± 1 °C), essa mistura recebeu a adição da cultura láctica termofílica, de acordo com a recomendação do fabricante (400 mg/L – conteúdo de um sachê). A mistura foi fermentada entre 43-45 °C por 6 horas em banho-maria termostaticado, o qual foi colocado no interior de uma caixa isotérmica, visando à adequação do processamento às condições artesanais utilizadas pelo pequeno produtor e manutenção da temperatura de fermentação. Durante a incubação o iogurte foi submetido à medições do valor do pH e da acidez expressa em ácido láctico, monitorados a cada 15 minutos (triplicata), em porções destinadas somente para estas análises, para a avaliação do tempo de fermentação, até as amostras atingirem aproximadamente um valor de pH de 4,6 e percentual de ácido láctico de 0,70%. Do mesmo modo, o ponto final da fermentação foi realizado com base também na verificação da firmeza do coágulo nestas amostras. Posteriormente, o iogurte foi então resfriado a 4 °C (± 1 °C). Em seguida, homogeneizou-se o produto para a quebra do coágulo e procedeu-se a adição das geleias de umbu, abacaxi, maracujá e cajá, nas concentrações de 15% ou 20% (p/v). Os produtos foram acondicionados em garrafas plásticas de polietileno de alta densidade e estocados a 10 °C (± 1 °C), até a realização das análises.

Avaliação físico-química dos iogurtes elaborados

Os teores de lipídeos e resíduo mineral fixo das amostras de iogurte foram avaliados pelo método de Gerber (método 497/IV) e incineração em forno (método 495/IV)¹⁶, respectivamente, ao passo que o método micro-Kjedahl, com o fator 6,38 foi utilizado para a determinação proteica (métodos AOAC, 991.20 e 991.23)¹⁷. A quantidade de açúcares totais foi dosada por Fehling, e os resultados expressos em glicídios totais em glicose (método 040/IV)¹⁶. O teor de extrato seco total foi avaliado até obtenção de peso constante, em estufa à 105°C por 3 horas pelo método AOAC 925.23¹⁷. A acidez foi determinada mediante titulação e o resultado expresso em percentual (%) de ácido láctico (método AOAC 947.05)¹⁷. Todas as determinações foram feitas em triplicata.

Avaliação microbiológica

As amostras de geleias e iogurtes foram encaminhadas para análise microbiológica no dia seguinte à sua fabricação, enquanto o leite foi avaliado após seu recebimento.

Amostras de leite caprino pasteurizado e dos iogurtes elaborados foram submetidas, em triplicata, às análises de contagem de bactérias aeróbias mesófilas, pela técnica de semeadura em profundidade e determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes, além da determinação de presença de *Salmonella*, seguindo-se a metodologia recomendada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA¹⁸.

As geleias elaboradas foram submetidas, em triplicata, às análises de determinação de bolores e leveduras, além da determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes, e da determinação de presença de *Salmonella*, seguindo-se metodologia recomendada pelo MAPA¹⁸.

Avaliação sensorial dos iogurtes elaborados

Após submissão do projeto de pesquisa ao Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde/UFPB e conforme aprovação do mesmo (Protocolo nº 104/06/07), as amostras de iogurte foram submetidas, primeiramente, ao teste discriminativo comparação pareada-preferência (método 158/IV¹⁶) com 50 provadores não treinados da comunidade universitária. Para tanto, com o intuito de detectar qual das concentrações de geleias para cada fruta adicionada nos iogurtes foi a preferida pelos avaliadores, levou-se em consideração o maior número de escolhas entre as duas concentrações de cada fruta. Assim, em uma mesma sessão, amostras de iogurte contendo 15 e 20% de geleia de abacaxi, de cajá, de maracujá e de umbu, foram avaliadas pelos provadores, de modo que o mesmo foi instruído a indicar a concentração de geleia de cada fruta preferida.

Após a definição da concentração preferida da geleia de fruta para cada sabor, pelo teste sensorial comparação pareada-preferência, realizou-se em outra sessão um segundo teste, o de aceitação por escala hedônica, onde os iogurtes com as concentrações de cada geleia selecionada e o iogurte natural foram avaliados.

O teste de aceitação por escala hedônica (método 165/IV¹⁶) foi conduzido com 50 julgadores não treinados, onde foram avaliadas as amostras de iogurte adicionadas de geleias de frutas selecionadas, bem como o iogurte natural, utilizando uma escala hedônica estruturada de nove pontos (1 = desgostei muitíssimo a 9 = gostei muitíssimo), para os atributos aroma, cor, aparência, sabor, consistência e avaliação global.

Os iogurtes caprinos foram considerados aceitos quando obtiveram média $\geq 5,0$ (equivalente ao termo hedônico 5 = “não gostei/nem desgostei”)¹⁹. Foi solicitado aos provadores que explicassem a razão de aceitação ou rejeição do produto, a fim de determinar os principais atributos que tiveram influência na sua decisão. Nesta mesma sessão foi avaliada a intenção de compra do produto, utilizando-se escala estruturada verbal de cinco pontos, com escores variando de 5 (compraria) até 1 (jamais compraria).

Todos os testes sensoriais foram realizados em cabines individuais sob luz branca, sendo servidas amostras de 50 mL (10 ± 1 °C) devidamente codificadas em copos plásticos, acompanhadas de ficha de avaliação sensorial, um copo com água mineral e bolacha água e sal. Os provadores foram orientados a fazer uso de água e de bolacha entre uma amostra e outra, como forma de limpar a boca, buscando minimizar a influência de uma amostra sobre a outra.

Análises estatísticas

Os resultados das análises microbiológicas e físico-químicas do leite de cabra foram submetidos aos cálculos de média e desvio-padrão. Para a avaliação dos resultados referentes às análises físico-químicas e microbiológicas dos iogurtes e para o teste de aceitação por escala hedônica de nove pontos, aplicou-se a Análise de Variância (ANOVA) e o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, para comparação das médias. Com relação à análise sensorial, o teste de comparação pareada-preferência foi avaliado segundo Faria e Yotsuyanagi²⁰. Utilizou-se o programa estatístico *SigmaStat* versão 3.1²¹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Composição físico-química dos iogurtes elaborados

A composição físico-química das amostras encontra-se na Tabela 1. Segundo os padrões físico-químicos estabelecidos pela legislação vigente para leites fermentados²², os iogurtes devem apresentar valores de acidez em ácido láctico entre 0,6 e 1,5g/100g. Assim, os valores encontrados para acidez em ácido láctico de todos os iogurtes avaliados atendem a legislação vigente (valores entre 0,75 e 1,13g/100g). No que diz respeito ao teor protéico, apenas o iogurte natural e o iogurte sabor abacaxi apresentaram o mínimo exigido pela legislação brasileira²², que estabelece para iogurtes o mínimo de 2,9g/100mL. Com exceção do iogurte natural, todos os iogurtes apresentaram

Tabela 1. Valores médios das análises físico-químicas realizadas com os iogurtes caprinos adicionados de geleias de frutas

Variável (%)	Tratamentos				
	Natural	Abacaxi	Cajá	Maracujá	Umbu
Acidez	0,75 ^c ±0,01	0,81 ^{bc} ±0,01	0,92 ^b ±0,01	1,13 ^a ±0,11	0,90 ^b ±0,04
Proteína	3,33 ^a ±0,01	2,95 ^b ±0,05	2,88 ^b ±0,06	2,79 ^{bc} ±0,16	2,61 ^c ±0,12
Gordura	5,90 ^a ±0,28	2,25 ^b ±0,21	2,28 ^b ±0,15	2,25 ^b ±0,19	1,40 ^c ±0,18
AT**	3,24 ^c ±0,02	5,50 ^b ±0,24	7,98 ^a ±0,82	8,40 ^a ±0,18	5,64 ^b ±0,13
EST*	19,55 ^a ±0,04	20,58 ^a ±1,37	19,07 ^a ±0,31	19,89 ^a ±1,14	15,30 ^b ±0,28
RMF***	0,72 ^a ±0,00	0,64 ^b ±0,04	0,71 ^a ±0,02	0,64 ^b ±0,02	0,63 ^b ±0,01

Extrato Seco Total*; *Açúcares Totais*; ****Resíduo Mineral Fixo*.

Valores em uma mesma linha, para cada média, seguidos de diferentes letras minúsculas diferem estatisticamente ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey

teor de gordura inferior ao mínimo estabelecido pela legislação, entre 3,0 a 5,9 g/100g de produto.

Em relação aos outros tratamentos com adição de frutas, segundo a mesma legislação, os leites fermentados com agregados, açucarados e/ou saborizados poderão ter conteúdo de matéria gorda e proteínas inferiores, não devendo reduzir-se a uma proporção maior do que a porcentagem de substâncias alimentícias não lácteas, açúcares acompanhados ou não de glicídios (exceto polissacarídeos e polialcoóis) e/ou amidos ou amidos modificados e/ou maltodextrina e/ou aromatizantes/saborizantes adicionados²². Esta característica pode estar relacionada ao fato de que a adição de outros ingredientes, como por exemplo, a geleia de fruta, pode contribuir para uma maior diluição do iogurte, com conseqüente redução da concentração de proteínas e lipídeos. Vale salientar que esta legislação abrange os produtos derivados do leite bovino e, que possíveis variações podem ser encontradas, visto que o leite em questão é de origem caprina.

Com relação à acidez, como era de se esperar, é influenciada pelo tipo de fruta presente, ou seja, geleias de frutas mais ácidas geraram iogurtes mais ácidos, essa característica foi observada no iogurte adicionado de geleia de maracujá. Em referência ao teor proteico, Verruma et al.²³, observaram valores médios de 3,8% para iogurte natural obtido a partir de leite bovino, resultado próximo ao encontrado no estudo (3,33%) com leite caprino. Porém, Figueiredo e Porto²⁴ constataram valor médio de 4,26%, sendo este valor superior ao encontrado para o mesmo tipo de iogurte. Rodas et al.²⁵, em seu experimento com iogurtes de vários sabores obtiveram índices de proteínas variando entre 2,81% e 3,40%, estando estes valores próximos aos encontrados no presente estudo.

No que diz respeito ao teor de gordura, o iogurte natural caprino apresentou valores médios superiores aos constatados por Verruma et al.²³, ao avaliarem iogurte natural obtido de leite bovino. Este resultado está relacionado com a composição química do leite caprino que pode apresentar maiores teores de gordura em relação ao leite bovino, em função de diferentes fatores²⁶. Ao avaliarem as características físico-químicas de iogurtes com frutas, Rodas et al.²⁵ encontraram valores de lipídeo variando entre 1,60 e 2,73%. Resultados semelhantes foram encontrados nesta pesquisa, cujos valores variaram de 1,40 a 2,28%.

Quanto aos teores de sólidos totais, o iogurte adicionado de geleia de umbu apresentou o menor valor entre as amostras estudadas (15,30%). Figueiredo e Porto²⁴ analisando iogurte produzido com leite bovino encontraram valores menores (14,78%) aos quantificados no iogurte natural avaliado neste estudo (19,55%), o que pode estar relacionado aos teores de gorduras elevados no leite caprino. Verruma et al.²³ analisando iogurtes produzidos a partir do leite bubalino e bovino obtiveram valores de 18,90% e 13,50%, respectivamente. Os valores obtidos para o iogurte bubalino situaram-se próximo ao encontrado nesta pesquisa, enquanto que, o iogurte bovino estudado pelos autores apresentou valores inferiores aos constatados neste estudo. Essa variação dos valores de sólidos totais pode ser influenciada pela raça do animal, espécie, nutrição, sanidade e ambiente em que vivem, dessa forma, cada animal possui na composição química de seu leite uma média diferente desse parâmetro, o que altera também os produtos derivados desse leite.

Quanto ao teor de cinzas, foram registrados valores médios que variaram de 0,63 a 0,72%. Verruma et al.²³, estudando iogurtes produzidos com leite de búfala e de vaca encontraram valores um pouco acima, 0,76 e 0,73%, respectivamente. Rodas et al.²⁵ analisando

iogurtes com frutas quantificaram valores próximos ao do presente estudo (entre 0,60 e 0,77%), e os mesmos autores observaram que os teores variaram em função do sabor do iogurte e do tipo de fruta utilizada.

Com relação ao teor de açúcares totais, o iogurte natural, quando comparado aos demais iogurtes, apresentou menor quantidade (3,24%), visto a não adição de geleia de fruta, que por apresentar elevado teor de sacarose, pode ter contribuído para o aumento dos teores deste parâmetro nos demais tratamentos avaliados. O iogurte sabor cajá e maracujá proporcionaram maiores percentuais de açúcares, seguidos dos iogurtes contendo geleia de abacaxi e umbu.

Características microbiológicas

As avaliações microbiológicas realizadas no leite de cabra pasteurizado, utilizado na elaboração dos iogurtes, não apontaram presença de nenhum dos micro-organismos analisados, encontrando-se em ótima qualidade para a produção do iogurte.

Não foram detectados coliformes totais e termotolerantes, bolores e leveduras nas geleias de frutas sabor abacaxi, cajá e maracujá. Contudo, apenas a geleia de umbu apresentou valor de 1×10^4 NMP/g de bolores e leveduras. Não foi identificada a presença de coliformes totais, coliformes termotolerantes e bactérias aeróbias mesófilas em amostras de iogurte natural e iogurtes com adição de geleia de abacaxi. O iogurte com 15% de geleia de umbu apresentou contagens de bactérias aeróbias mesófilas de 3×10^2 UFC/g e de 1×10^5 UFC/g para o iogurte adicionado de 20% de geleia. Todas as amostras apresentaram ausência de *Salmonella*, incluindo as amostras de geleias de frutas e leite, indicando que os mesmos estavam aptos ao consumo, podendo ser submetidos aos testes sensoriais.

Tabela 2. Avaliação dos provadores nos testes de comparação pareada-preferência global realizados com iogurtes caprinos com diferentes concentrações de geleias de frutas

Tratamento	N	Valor tabelado* (Bilateral $p=1/2$)	Concentração		Significância (5%)
			15%	20%	
Abacaxi	50	33	35	15	*
Cajá	45	30	16	29	ns
Maracujá	28	20	19	09	ns
Umbu	46	31	23	22	ns

(*) *significativo (ns) = não significativo. Diferença crítica de $\alpha = 0,05$*

De acordo com Cavalcante e Costa²⁷, um fator importante que poderia explicar esses resultados microbiológicos seria o tratamento térmico ao qual o leite foi submetido, visto que este processo minimiza a contaminação no leite. O tratamento térmico do leite também promove agregação proporcionando géis mais firmes e diminuindo a acidez necessária para associação da matriz protéica no iogurte, o que influencia na textura de iogurte²⁸.

Atributos sensoriais

Na Tabela 2 são apresentados os resultados obtidos no teste de comparação pareada-preferência global dos iogurtes caprinos com diferentes concentrações de geleias de frutas. Como critério de seleção da concentração de geleia a ser adicionada na formulação do iogurte final, optou-se pelo maior número de escolhas entre as duas concentrações de cada fruta. Sendo assim, as escolhas foram de 15% de geleia para os iogurtes de abacaxi, maracujá e umbu e de 20% de geleia para o iogurte sabor cajá.

Na Tabela 3 estão apresentados os escores médios obtidos para amostras dos iogurtes caprinos com e sem geleias de frutas, no que diz respeito aos atributos aroma, cor, aparência, sabor, consistência,

Tabela 3. Escores médios dos testes de aceitação sensorial e intenção de compra, realizados com iogurtes caprinos com e sem geleia de frutas

Variável	Tratamentos				
	Natural	Abacaxi	Cajá	Maracujá	Umbu
Aroma	8,00 ^a ±0,93	7,34 ^{ab} ±1,21	7,22 ^b ±1,40	7,92 ^{ab} ±1,21	5,88 ^c ±1,66
Cor	8,08 ^a ±0,98	7,36 ^b ±1,50	7,92 ^{ab} ±1,18	8,16 ^a ±0,98	6,16 ^c ±1,50
Aparência	7,94 ^a ±0,84	7,58 ^a ±1,31	7,54 ^a ±1,34	7,94 ^a ±1,20	5,86 ^b ±1,56
Sabor	8,10 ^a ±0,99	7,48 ^a ±1,49	7,92 ^a ±1,23	8,06 ^a ±0,89	5,68 ^b ±1,78
Consistência	8,08 ^a ±1,03	7,42 ^a ±1,34	7,88 ^a ±1,29	7,70 ^a ±1,07	5,44 ^b ±1,45
Aparência global	8,04 ^a ±0,90	7,62 ^a ±1,24	7,86 ^a ±1,09	8,08 ^a ±0,83	5,70 ^b ±1,50
Intenção de compra	4,48 ^a ±0,61	4,30 ^a ±0,81	4,46 ^a ±0,79	4,58 ^a ±0,61	3,18 ^b ±0,92

Valores em uma mesma linha, para cada média, seguidos de diferentes letras minúsculas diferem estatisticamente ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

avaliação global e intenção de compra. Verificou-se que quanto ao aroma, o iogurte natural foi mais aceito quando comparado aos iogurtes adicionados de geleia de cajá e umbu. O mesmo foi observado para o atributo cor, no qual o iogurte natural recebeu maiores notas em comparação aos iogurtes adicionados de geleia de abacaxi e umbu.

Para os atributos aparência, sabor, consistência e avaliação global, apenas o iogurte sabor umbu obteve menores notas. Todavia, o termo hedônico esteve entre “não gostei/nem gostei” e “gostei ligeiramente”, não havendo diferença significativa a nível de 5% de probabilidade entre as demais amostras.

Ainda na Tabela 3, são apresentados os resultados médios obtidos na avaliação da intenção de compra dos iogurtes adicionados de geleias de frutas. Verificou-se que, o iogurte adicionado de geleia de umbu obteve menor nota ($p < 0,05$) quando comparado aos demais iogurtes avaliados. Mesmo assim, o termo hedônico esteve entre “talvez comprasse/ talvez não comprasse” e “possivelmente compraria”, não havendo diferença significativa a nível de 5% de probabilidade entre as demais amostras.

CONCLUSÃO

Os iogurtes de leite caprino elaborados com geleia de frutas tropicais apresentam características físico-químicas peculiares, no entanto, são necessários ajustes na sua formulação para que possam ser enquadrados na legislação em vigor, com relação ao teor proteico e lipídico. Os produtos desenvolvidos foram pontuados com escores altos, apontando boa aceitação sensorial e intenção de compra, como também, apresentaram boa qualidade microbiológica indicando idoneidade ao consumo. O iogurte sabor umbu, mesmo apresentando diferença significativa em todos os atributos avaliados, obteve boa aceitação pelos consumidores. A elaboração de iogurtes natural e com frutas regionais representa uma alternativa viável para o incremento do setor lácteo caprino, podendo contribuir para o fortalecimento deste segmento na agroindústria regional.

AGRADECIMENTOS

Às estagiárias do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia de Alimentos Whyara Karoline Almeida da Costa e Luana Amorim Silva pelo auxílio nas análises microbiológicas.

REFERÊNCIAS

1. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Censo agropecuário: banco de dados, 2006. [base de dados na internet]. [acesso em 24 de maio de 2011]. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/estadosat/].
2. Cordeiro PC, Cordeiro AGPC. A Produção de leite de Cabra no Brasil e seu mercado. Espírito Santo do Pinhal; 2009. [acesso em 15 de abril de 2011]. Disponível em: [http://www.capritec.com.br/pdf/LeitedeCabranoBrasil.pdf].
3. Queiroga RCRE, Costa RG, Biscontinni TMB. A caprinocultura leiteira no contexto de segurança alimentar e nutricional. *Conceitos*. 2003;1(1):89-94.
4. Correia R, Borges K. Posicionamento do consumidor frente ao consumo de leite de cabra e seus derivados na cidade de Natal-RN. *Rev Inst Lat Cândido Tostes*. 2009;366(64):36-43.
5. Martins EC, Wander AE, Chapaval L, Bomfim MAD. O mercado e as potencialidades do leite de cabra na cidade de Sobral: A visão do consumidor. 2010. [acesso em 30 de abril de 2011]. Disponível em: [http://www.freewebs.com/awander/95.pdf].
6. Silva PDL, Bezerra MF, Pedrini MRS, Magalhães MMA, Correia RTP. Leite de cabra: aspectos produtivos e nutricionais. *Rev Inst Lat Cândido Tostes*. 2007;62(354):32-5.
7. Correia RTP, Magalhães MMA, Pedrini MRS, Cruz AVF, Clementino I. Sorvetes elaborados com leite caprino e bovino: composição química e propriedades de derretimento. *Rev Ciênc Agron*. 2008;39(2):251-6.
8. Pandya AJ, Ghodke KM. Goat and sheep milk products other than cheeses and yoghurt. *Small Rumin Res*. 2007; 68:193-206.
9. Dubeuf JP, Morand-Fehr P, Rubino R. Situation, changes and future of goat industry around the world. *Small Rumin Res*. 2004;51(2):165-73.
10. Borges KC, Medeiros ACL, Correia, R. T. P. Iogurte de leite de búfala sabor cajá (*spondias lutea* L.): caracterização físico-química e aceitação sensorial entre indivíduos de 11 a 16 anos. *Alim Nutr*. 2009;20(2):295-300.
11. Raud C. Os alimentos funcionais: a nova fronteira da indústria alimentar análise das estratégias da Danone e da Nestlé no mercado brasileiro de iogurtes. *Rev Soc Pol*. 2008;16(31):85-100.
12. Della Modesta RCD, Gonçalves EB, Rosenthal A, Silva ALS, Ferreira JCS. Desenvolvimento do perfil sensorial e avaliação sensorial/instrumental de suco de maracujá. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2005;2(25):345-52.
13. Maia GA, Sousa PHM, Lima AS. Processamento de sucos de frutas tropicais. 1ª ed. Fortaleza: Edições UFC, 2007. 320 p.
14. Rocha EM, Aguiar SF, Araújo VS, Duarte WKC, Magalhães MMA. Elaboração e caracterização de sobremesa láctea à base de frutas tropicais. *Rev Hig Aliment*. 2005;19(129):12-4.
15. Brasil. Resolução Normativa da Câmara Técnica de Alimentos nº 15 de nov. 1978. Estabelece normas que têm por objetivo fixar a identidade e características mínimas de qualidade a que devem obedecer as geleias de frutas. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, 01 mar. 1979. Seção I, pt. 1, p. 2.929-31.
16. 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.p. 1020.

17. Association of Official Analytical Chemists - AOAC. Official Methods of Analysis. 14^o ed. Washington 2000.
18. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n^o 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Diário Oficial [da] União. Brasília, DF, 18 set. 2003. Seção 1. p.14.
19. Bárcenas ME, Rosell CM. Different approaches for improving the quality and extending the shelf life of the partially baked bread: low temperature and HPMC addition. *J Food Eng*. 2006;72(1):92-9.
20. Faria EV, Yotsuyanagi K. Técnicas de Análise Sensorial. Campinas: ITAL/LAFISE; 2002. p. 116.
21. Sigmapstat, versão 3.1 [programa de computador]. Versão 3.1. Point Richmond (Califórnia): Comercial; 2009.
22. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n^o 46, de 23 de outubro de 2007. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. Diário Oficial [da] União, Brasília, DF, 24 out. 2007. Seção 1.p.5.
23. Verruma MR, Oliveira AJ, Salgado JM. Avaliação química e nutricional do queijo mozzarella e iogurte de leite de búfala. *Sci Agric*. 1993;3(50):438-43.
24. Figueiredo MG, Porto E. Avaliação do impacto da qualidade da matéria-prima no processamento industrial do iogurte natural. *Rev Ind Latic*. 2002;7(42):76-80.
25. Rodas MAB, Rodrigues RMMS, Sakuma H, Tavares LZ, Sbarbi CR, Lopes WCC. Caracterização físico-química, histológica e viabilidade de bactérias lácticas em iogurtes com frutas. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2001;3(21):304-9.
26. Lucas A, Rock E, Agabriel C, Chilliard Y, Coulon, JB. Relationships between animal species (cow versus goat) and some nutritional constituents in raw milk farmhouse cheeses. *Small Rumin Res*. 2008;74:243-8.
27. Cavalcante ABD, Costa JMC. Padronização da tecnologia de fabricação do queijo de manteiga. *Rev Ciên Agron*. 2005;36(2):215-20.
28. Antunes AEC, Cazetto TF, Bolini HM. A. Iogurtes desnatados probióticos adicionados de concentrado protéico do soro de leite: perfil de textura, sinérese e análise sensorial. *Alim Nutr*. 2004;15(2):107-14.

Avaliação de contaminantes inorgânicos (As, Cd, Cr, Hg e Pb) em espécies de peixes

Inorganic contaminants (As, Cd, Cr, Hg and Pb) in fish species

RIALA6/1404

Marcelo Antonio MORGANO^{1*}, Ana Paula Ferreira de OLIVEIRA¹, Luana Cristina RABONATO¹, Raquel Fernanda MILANI¹, Juliana Parreira VASCONCELLOS², Cassia Neves MARTINS², André Lee CITTI², Evelise Oliveira TELLES², Simone de Carvalho BALIAN²

*Endereço para correspondência: ¹Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos, Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL, CP 139, CEP 13070-178, Campinas, SP, Brasil. e-mail: morgano@ital.sp.gov.br.

²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo/USP

Recebido: 22.02.2011 – Aceito para publicação: 22.11.2011

RESUMO

O teor dos contaminantes arsênio total, cádmio, cromo, chumbo e mercúrio total, foi avaliado em 240 amostras das espécies de peixes pescada (*Macrodon ancylodon*), tainha (*Mugil liza*), corvina (*Micropogonias furnieri*) e sardinha (*Sardinella brasiliensis*), adquiridas no comércio atacadista da Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP), no inverno de 2009 e no verão de 2010. As determinações dos contaminantes inorgânicos foram realizadas por espectrometria de emissão óptica em plasma com acoplamento indutivo (ICP OES). Os intervalos de concentração obtidos, em mg.kg⁻¹ (peso úmido), foram de As total (<0,1-8,63); Cd (<0,01-0,287); Cr (<0,02-0,44); Pb (<0,02-2,92) e Hg total (<0,002-0,285). As espécies mais contaminadas foram a sardinha e a corvina, sendo encontrados As e Cr em níveis acima dos limites máximos permitidos pela legislação brasileira (1 e 0,1 mg kg⁻¹), em 67% e 7% das amostras analisadas, respectivamente. Este estudo demonstra a ocorrência de contaminação por arsênio, cromo e chumbo nas espécies de pescada, tainha, corvina e sardinha. O maior índice de arsênio foi detectado na espécie sardinha. Na corvina, os contaminantes As, Cr e Pb foram encontrados em teores mais elevados no período de inverno do que na época de verão.

Palavras-chave. mercúrio, arsênio, chumbo, cádmio, pescados, estimativa de ingestão.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the contaminants occurrence as total arsenic, cadmium, chromium, lead and total inorganic mercury content in tissues samples of king weakfish (*Macrodon ancylodon*), mullet (*Mugil liza*), white mouth croaker (*Micropogonias furnieri*) and sardine (*Sardinella brasiliensis*), purchased during winter of 2009 and summer of 2010. The inorganic contaminants determination were performed by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES). The ranges of elements concentration obtained, in mg. kg⁻¹ (wet weight), were: total As (<0.1-8.63); Cd (<0.01-0.287); Cr (<0.02-0.44); Pb (<0.02-2.92), and total Hg (<0.002-0.285). The As and Cr contents were above the maximum amounts established by the Brazilian legislation (1 and 0.1 mg kg⁻¹) in 67% and 7% of analyzed samples, respectively. The sardine and white mouth croaker species were the mostly contaminated samples. This study showed that the king weakfish, mullet, white mouth croaker and sardine fish species were contaminated by total arsenic, chromium and lead. The highest arsenic contents were found in sardine species. In corvine species, the contaminants As, Cr and Pb were higher in the wintertime than summer season.

Keywords. mercury, arsenic, lead, cadmium, fish species, estimated weekly intake.

INTRODUÇÃO

A principal fonte de exposição ao homem para os contaminantes inorgânicos (metais pesados) ocorre pelo consumo de alimentos, principalmente por pescado, contendo elementos não essenciais tóxicos como o arsênio, o chumbo, o mercúrio, o cádmio e o crômio. Estes podem ser originários de fontes de poluição das águas de superfície decorrente de descargas de efluentes pelas indústrias, deposições atmosféricas de poluentes e acidentes ocasionados por derramamento de compostos químicos tóxicos, entre outros¹.

Segundo Kevan², os contaminantes arsênio, cádmio, mercúrio e chumbo são elementos largamente distribuídos no ambiente. A ocorrência destes no pescado pode ter influência de vários fatores, como a localização geográfica, espécie e tamanho do pescado, padrões alimentares, solubilidade dos produtos químicos e persistência no ambiente³.

No Brasil, alguns autores já constataram a presença de contaminantes inorgânicos na pescada, tainha, corvina e sardinha. Tarley et al.⁴ encontraram em amostras de sardinha enlata teores de Cr (0,46 a 1,18 mg.kg⁻¹) acima do permitido pela legislação brasileira (0,1 mg.kg⁻¹).

Pereira Filho et al.⁵ avaliaram a presença de contaminantes inorgânicos em 11 espécies de pescado comercializados na Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais do Estado de São Paulo (CEAGESP/SP) e verificaram que em algumas das espécies analisadas os teores de Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb e Zn estavam próximos aos limites máximos permitidos pela legislação brasileira.

Morgano et al.⁶ avaliaram o teor de Hg total em amostras de diversas espécies de pescado da cadeia produtiva da Baixada Santista (SP) encontrando níveis entre 0,166 e 0,878 mg.kg⁻¹. Quase a totalidade das amostras apresentou concentração de mercúrio total abaixo do permitido pela legislação brasileira que é de 0,5 mg.kg⁻¹ para peixes não predadores e 1,0 mg.kg⁻¹ para peixes predadores.

Veado et al.⁷ analisaram amostras de tilápia coletadas no Lago da Pampulha (MG) e observaram que o rim foi o órgão que mais concentrou os contaminantes inorgânicos como Al, Ba, Fe, Mn, Pb, Sr, Ti e Zn.

Espécies de peixes procedentes de diferentes níveis tróficos coletados no Rio Paraíba do Sul (RJ) foram estudadas por Terra et al.⁸. Os autores encontraram níveis elevados de Cr e Pb excedendo o valor máximo permitido pela legislação brasileira nas espécies carnívoras (*O. heptesus*), concluindo que estas são mais

propensas a acumular os contaminantes inorgânicos do que as espécies de outros níveis tróficos.

Curcho⁹ avaliou a presença de contaminantes inorgânicos em músculos de pescados mais consumidos nas regiões costeiras de Cananéia e Cubatão - SP. Os resultados mostram que na região de Cananéia, a média de As na espécie corvina ficou em 1,85 mg.kg⁻¹ e a média na pescada em 1,10 mg.kg⁻¹. Em Cubatão, obteve média de 1,37 mg.kg⁻¹ para a corvina e 0,65 mg.kg⁻¹ para a pescada. A espécie sardinha apresentou média de As de 1,70 mg.kg⁻¹, valor esse acima do máximo permitido pela legislação nacional.

Estudos semelhantes foram realizados em outros países. Marcovecchio et al.¹⁰ estudaram os contaminantes Cd, Hg e Zn em espécies de corvina e tainha do estuário de La Plata e encontraram níveis de Cd no fígado variando entre 0,95 a 5,34 mg.kg⁻¹ (peso seco) para a tainha. Os teores de zinco e mercúrio foram mais elevados no fígado do que no músculo para as duas espécies estudadas.

Burger e Gochfeld¹¹ estudaram As, Cd, Cr, Hg, Mn, Pb e Se em 11 espécies de pescados procedentes de supermercados e feiras livres em New Jersey, EUA e obtiveram níveis de As, Hg, Pb e Se, para algumas das amostras, em concentração que pode causar efeitos sub-letais em mamíferos e, algumas amostras excederam os limites permitidos pela legislação americana.

Kojadinovic et al.¹² estudaram a bioacumulação de elementos minerais (Cu, Fe, Mn, Se e Zn) e contaminantes inorgânicos (Cd, Hg e Pb) em músculo, fígado e rim de pescado de interesse comercial, do oeste do Oceano Índico e encontraram em algumas das amostras, níveis de concentração para Cd, Hg, Pb e Zn acima do limite permitido para consumo humano.

Fernandes et al.¹³ avaliaram a presença de Cr, Cu, Pb e Zn em amostras de tainha (*Mugil liza*) de um lago de Portugal e observaram que Cu e Zn aparecem em maior concentração no fígado (262 mg.kg⁻¹ para Cu e 89 mg.kg⁻¹ para Zn) do que no músculo (<3 mg.kg⁻¹ para Cu e 26 mg.kg⁻¹ para Zn).

Diante do exposto e devido à ascendência do mercado pesqueiro no Brasil nos últimos anos, a investigação sobre a qualidade do produto a ser consumido é muito importante para garantir a saúde dos consumidores de pescado. Assim, este estudo teve como objetivos: determinar os contaminantes inorgânicos Hg e As total, Cd, Pb e Cr nas espécies de peixe pescada, tainha, corvina e sardinha, peixes de maior representatividade no cenário regional, tanto em volume capturado quanto

consumido, utilizando a técnica de espectrometria de emissão com fonte de plasma acoplado indutivamente (ICP OES); realizar uma avaliação da estimativa de risco pelo consumo de pescado e verificar a provável interferência da época do ano na ocorrência de metais no pescado.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

As amostras de pescado foram adquiridas na CEAGESP/SP e, em seguida, encaminhadas para o Laboratório de Físico-química do setor de Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, onde foi feita a filetagem, retirada do máximo possível de espinhos e homogeneização. Em seguida, 200 gramas de musculatura foram colocados em sacos plástico, identificados e armazenados em freezer (-16 °C) até o momento das análises.

Foram coletadas 120 amostras no período “inverno” (junho a agosto) de 2009, e 120 amostras no período “verão” (dezembro a março) de 2010, totalizando 60 amostras para cada espécie, respectivamente: pescada foguete - *Macrodon ancylodon* (Bloch & Schneider, 1801), tainha - *Mugil liza* (Valenciennes, 1836), corvina - *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823) e sardinha verdadeira - *Sardinella brasiliensis* (Steindacher, 1789). A seleção dessas espécies levou em consideração o volume de vendas (t/ano), de acordo com dados da CEAGESP/SP.

A pescada foguete é um cieniêdo demersal marinho com ampla distribuição geográfica, ocorrendo das águas tropicais da Venezuela até as águas subtropicais da Argentina podendo ser encontradas larvas e jovens em águas estuarinas¹⁴. Os locais de maior abundância são região norte do continente sul americano e região sul do Brasil¹⁵. A sardinha verdadeira se alimenta de organismos planctônicos e vive em águas costeiras, em grandes cardumes. Já a corvina, peixe de hábitos costeiros, encontrado em fundos de lama e areia, mais comumente em profundidades inferiores a 60 metros, ocorre também em áreas estuarinas, principalmente os exemplares jovens que utilizam esse ambiente para alimentação e crescimento. Ocorre das Antilhas e América Central (Costa Rica) até a Argentina¹⁶. A tainha é um peixe que tem sua ocorrência da Venezuela à Argentina, sendo a *Mugil liza*, a espécie encontrada na região do Caribe e na costa Atlântica da América do Sul. Peixe costeiro que forma grandes cardumes em ambientes estuarinos,

desova no mar e os jovens, quando adquirem capacidade de nadar ativamente, locomovem-se para águas costeiras, penetrando em estuários, onde se estabelecem algum tempo. Alimenta-se de matéria vegetal retirada do lodo ou areia do substrato onde vivem¹⁷.

Metodologia Analítica

Toda a vidraria utilizada neste trabalho, após lavagem, permaneceu previamente em imersão em solução de HNO₃ 20 % por, no mínimo, 2 horas, seguida de enxague com água desmineralizada.

Determinação de As, Pb, Cd, Cr por digestão ácida aberta em bloco^{18,19}

Foi pesado 1,0 g da amostra *in natura* em tubo de vidro e em seguida, adicionados 15 mL de ácido nítrico concentrado, permanecendo em repouso durante a noite. No dia seguinte, adicionaram-se 5 mL de peróxido de hidrogênio 30% (m/v) e os tubos foram colocados no bloco digestor, sendo aquecidos à temperatura máxima de 100 °C por 6 horas. Após a digestão, o conteúdo dos tubos foi transferido quantitativamente para balão volumétrico de 25 mL com solução HCl 5% (v/v).

Determinação de mercúrio por digestão com mistura sulfonítrica^{20,19}

Foi pesado 1,0 g da amostra *in natura* em tubo de vidro, adicionados 10 mL da mistura sulfonítrica 1:1 (v/v) com 0,1 % (m/v) de pentóxido de vanádio e aquecido em banho-maria com agitação à temperatura máxima de 90 °C por 3 horas. Após resfriamento foram adicionados 5 mL de solução aquosa de permanganato de potássio 7% (m/v) e a solução foi aquecida novamente em banho-maria à 90 °C por mais 3 horas. Terminada a digestão foram adicionados 900 µL de solução aquosa de cloridrato de hidroxilamina 20% (m/v) transferindo-se quantitativamente para balão volumétrico de 25 mL com água deionizada.

Instrumentação

As determinações dos contaminantes inorgânicos foram realizadas em um equipamento ICP OES da marca Varian (Mulgrave Victoria, Austrália), modelo Vista – MPX CCD Simultaneous ICP OES, com visão axial, equipado com uma fonte de radio frequência (RF) de 40 MHz, um detector multielementar simultâneo de estado sólido do tipo CCD (Charge Coupled Device), uma bomba peristáltica, câmara de nebulização e um

nebulizador *sea spray*. O sistema é controlado pelo *software* ICP Expert e utiliza argônio líquido com pureza de 99,996% (Air Liquid, SP, Brasil). As condições experimentais otimizadas de operação do equipamento foram: potência de RF (1000W); vazão do gás de nebulização ($0,9 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$); vazão de argônio principal ($15 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$); vazão de argônio auxiliar ($1,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$); tempo de integração e de leitura (10 s); número de replicatas (3); comprimentos de onda, As (193,696 nm), Cd (214,439 nm), Cr (276,653 nm), Pb (220,353 nm), Hg (194,164 nm). Para a determinação de mercúrio foi usado um gerador de hidretos da marca Varian (Mulgrave Victoria, Austrália), modelo VGA 77 acoplado ao ICP OES, com a seguinte configuração: vazão da amostra ($9 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$); vazão de HCl 10 mol L^{-1} ($1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$); Vazão de SnCl₂ 25 % ($1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$); pressão gás de arraste (Ar) (350 kPa) e fluxo de gás de arraste (Ar) ($100 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$).

Curvas Analíticas

As curvas analíticas para As, Cd, Cr e Pb, foram preparadas em solução HCl 5% v/v. A curva analítica para Hg foi preparada em solução sulfonítrica 5% (v/v). A faixa de concentração para a preparação das curvas analíticas para As, Cd, Cr e Pb foi de 0,0025 a 0,5 mg.L⁻¹ e para Hg foi de 0,0005 a 0,05 mg.L⁻¹.

Validação do método e análise estatística

A metodologia de digestão das amostras de pescado foi validada de acordo com INMETRO²¹, sendo avaliados os parâmetros: linearidade; sensibilidade; seletividade; limite de detecção (LOD); exatidão; e precisão.

A precisão do método foi avaliada pelo coeficiente de variação de 7 repetições analíticas. A precisão intermediária foi realizada num espaço de 2 semanas com o mesmo analista.

Para avaliação da exatidão do método foram utilizados os materiais de referência certificados Oyster Tissue (NIST 1566^a) e Lobster Hepatopancreas (TORT-2), partindo-se de 0,25 g dos MRCs e seguindo-se o mesmo procedimento descrito anteriormente para a preparação das amostras. Também foram realizados ensaios de recuperação para a avaliação da exatidão da metodologia analítica. Foi realizado um teste de recuperação em três níveis de concentração para cada contaminante inorgânico de acordo com a recomendação do MAPA, Instrução Normativa nº 24/2009, utilizando-se o LMR (Limite Máximo de Resíduo). A partir do LMR dos contaminantes estudados na legislação brasileira para

pescados ($1,0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ para As e Cd; $2,0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ para Pb e $0,5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ para Hg), as amostras foram fortificadas em três níveis de concentrações, levando-se em consideração o fator de diluição de 25 para as amostras analisadas e os níveis definidos foram: baixa ($0,5 \cdot \text{LMR}$), média ($1 \cdot \text{LMR}$) e alta ($1,5 \cdot \text{LMR}$). Para o elemento Cr foi usado o mesmo nível de fortificação de As e Cd, pois se fosse usado o seu valor do LMR ($0,1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) não seria atingido o limite de detecção para este elemento.

A estatística descritiva (média, desvio-padrão, mediana, intervalo) e análise de variância (ANOVA) foram conduzidas usando o *software* Excel (versão 2007). Para verificar se as médias obtidas para os contaminantes inorgânicos das diferentes espécies de pescado foram estatisticamente diferentes ao nível de $p < 0,05$, foi aplicado o teste de comparações múltiplas de Tukey.

Estimativa de ingestão dos contaminantes inorgânicos

A estimativa de ingestão semanal do contaminante inorgânico Hg foi calculada e expressa como porcentagem da ingestão semanal tolerável provisória (PTWI) e para o Cd foi calculada e expressa como porcentagem de ingestão mensal tolerável provisória (PTMI), sendo os cálculos realizados considerando o consumo médio diário de 50 g e 11 g de pescado. Para peso corpóreo foi adotado o valor de 70 kg para adultos. Para os contaminantes As e Pb foram calculadas a estimativa de ingestão diária considerando o consumo de 11 g de pescado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Validação da metodologia analítica

Os resultados obtidos para os parâmetros de validação da metodologia estão apresentados na Tabela 1. Os limites de detecção e de quantificação foram obtidos a partir de 10 medidas das soluções de 10 brancos analíticos fortificadas com soluções padrão dos contaminantes inorgânicos em concentrações correspondentes ao menor ponto da curva analítica. O LOD foi calculado como $3 \times s$; onde: s = desvio padrão das 10 repetições do branco fortificado. Para expressar o LOD, o valor encontrado foi multiplicado pela diluição da amostra (25x).

A precisão do método foi avaliada pelo coeficiente de variação de 7 repetições analíticas, utilizando-se o mesmo procedimento de medição, análise, equipamento e repetições em curto espaço de tempo. A precisão intermediária foi determinada por ensaios realizados em diferentes ocasiões (intervalo de 2 semanas) e foi expressa

Tabela 1. Comprimento de onda (λ), coeficiente de correlação (r), sensibilidade, valor certificado de As, Cd, Cr e Pb para o material de referência TORT-2 (Lobster Hepatopancreas) e para Hg Oyster Tissue (NIST 1566^a), valor obtido experimentalmente, limite de detecção (LOD) e precisão

Elemento	λ (nm)	r	Sensibilidade (L.mg ⁻¹)	Valor Certificado (mg/kg)	Valor Obtido (mg/kg)	LOD (mg.L ⁻¹)	Precisão CV (%)
As	193,696	0,9998	80	21,6 + 1,8	21,10 + 0,00	0,1	0,2
Cd	214,439	0,9999	6819	26,7 + 0,6	23,7 + 0,8	0,01	13
Cr	276,653	0,9992	4139	0,77 + 0,15	0,59 + 0,03	0,02	4
Hg	194,164	0,9998	15639	0,35 + 0,13	0,36 + 0,02	0,002	11
Pb	220,353	0,9998	599	0,037 + 0,001	0,035 + 0,002	0,02	4

LOD = limite de detecção = $3 \times s \times 25$; CV = coeficiente de variação

pelo coeficiente de variação. A precisão do método demonstrou-se satisfatória com os resultados obtidos. Para todos os elementos o valor do coeficiente de variação ficou abaixo de 13% (Tabela 1) estando de acordo com a Instrução Normativa nº 24/2009 do MAPA²².

A avaliação da exatidão do método foi realizada por teste de recuperação e comparação com material de referência certificado (MRC). Os resultados obtidos para o ensaio de recuperação, em 3 níveis de fortificação dos contaminantes inorgânicos (0,5; 1,0 e 1,5 mg.kg⁻¹ para As, Cd, Cr e Pb e 0,002; 0,025 e 0,050 mg.kg⁻¹ para Hg) foram satisfatórios variando de 98 a 106 % para As; 94 a 98 % para Cd; 97 a 108 % para Cr; 91 a 100 % para Pb e 82 a 98 % para Hg. O uso de material de referência certificado mostrou resultados concordantes para todos os elementos, exceto para o cromo que apresentou uma variação de - 23 % nos valores encontrados experimentalmente (Tabela 1).

Contaminantes inorgânicos nas amostras de pescado

Os resultados obtidos para os contaminantes inorgânicos As, Cd, Cr, Pb e Hg nas duas épocas de coletas estão apresentados nas Tabelas 2 e 3. Para a pescada fogueira (*Macrodon ancylodon*) verificou-se que a ocorrência de Cd, Pb e Hg, não atingiu o limite máximo permitido pela legislação brasileira²³ (1,0 mg.kg⁻¹, para Cd; 2,0 mg.kg⁻¹, para Pb e 0,5 mg.kg⁻¹ para Hg – espécies não predadoras e 1,0 mg.kg⁻¹ para espécies predadoras); para As verificou-se que para amostras tanto de inverno quanto de verão, os valores excederam o limite máximo permitido, sendo 6,7% e 50%, respectivamente.

Os efeitos tóxicos do As dependem da forma química que este se encontra no alimento, sendo mais tóxicos os compostos inorgânicos (As⁺³) do que os orgânicos (arsenobetaina). A exposição crônica para esse elemento pode causar dermatites, queratoses de pigmentação da pele, com hiperqueratinização de áreas

expostas, verrugas, e a indução do câncer de pulmão²⁴.

Para o elemento Cr verificou-se que no período de inverno (junho a agosto de 2009), 13,3% do total das amostras analisadas apresentaram teores acima do limite máximo estabelecido pela legislação vigente (0,1 mg.kg⁻¹). O Cr está presente na natureza em diversas formas, as mais comuns são a forma trivalente (mais estável) presente em plantas e ligadas à complexos orgânicos com função de potencializar a indução da insulina, e a forma hexavalente, mais tóxica e com potencial carcinogênico²⁵.

Curcho⁹ estudou a presença de As em amostras de pescada fogueira (*Macrodon ancylodon*), coletadas na região de Cananéia e encontrou teores deste contaminante acima do permitido pela legislação nacional (1,0 mg.kg⁻¹) em 44% das amostras. Para o Cr, 19 % das amostras excederam o limite máximo permitido (0,1 mg.kg⁻¹). Apesar da concordância desses resultados com o presente estudo, os autores não informaram qual época do ano foram coletadas as amostras.

Yusà et al.²⁶ estudaram várias espécies de peixes provenientes de mercados de Valencia, Espanha, e em 10 amostras de pescada (*Merluccius merluccius*), encontrando valores médios e intervalos de concentração, em mg.kg⁻¹, de 0,004 (0,003-0,008) para Cd, de 0,15 (0,12-1,5) para Hg e 0,04 (0,02-0,18) para Pb.

Os resultados do presente estudo foram similares ao trabalho da Espanha, sendo que para o contaminante Hg, foram encontrados teores inferiores nas amostras brasileiras. Para a tainha (*Mugil liza*) os resultados obtidos para Cd, Cr, Pb e Hg, nas duas épocas de coleta, não apresentaram teores acima dos níveis máximos permitidos pela legislação. Já para o contaminante As, foram encontrados valores que excederam os limites máximos permitidos, sendo 23,3 % para as amostras coletadas no período de junho a agosto e 36,6%, para as amostras coletadas entre janeiro a março.

Tabela 2. Estatística descritiva dos resultados dos contaminantes inorgânicos presentes nas amostras de pescado coletadas no período de inverno (junho a agosto) de 2009, na CEAGESP/SP

Espécie	N**		Contaminantes Inorgânicos (mg.kg ⁻¹ , peso úmido)				
			Arsênio	Cádmio	Cromo	Chumbo	Mercúrio
Pescada <i>Macrodon ancylodon</i>	30	Média±DP	0,58±0,40 ^a	0,007±0,006 ^a	0,06±0,03 ^a	0,14±0,10 ^a	0,023±0,099 ^a
		Mediana	0,59	0,003	0,06	0,13	0,023
		Intervalo	<0,1-1,70	<0,01-0,019	0,03-0,12	<0,02-0,44	0,014-0,042
		Amostras acima da legislação* (%)	6,7	-	13,3	-	-
Tainha <i>Mugil liza</i>	30	Média±DP	0,76±0,42 ^a	0,009±0,004 ^a	0,04±0,01 ^a	0,12±0,07 ^a	0,012±0,007 ^a
		Mediana	0,71	0,009	0,03	0,12	0,010
		Intervalo	<0,1-1,67	<0,01-0,019	0,02-0,07	<0,02-0,30	<0,002-0,037
		Amostras acima da legislação* (%)	23,3	-	-	-	-
Corvina <i>Micropogonias furnieri</i>	30	Média±DP	3,98±2,22 ^b	0,097±0,099 ^b	0,15±0,15 ^b	1,12±1,12 ^b	0,042±0,051 ^b
		Mediana	3,85	0,044	0,06	0,36	0,028
		Intervalo	0,63-8,63	<0,01-0,287	<0,02-0,44	0,07-2,92	0,004-0,285
		Amostras acima da legislação* (%)	93,3	-	40	40	-
Sardinha <i>Sardinella brasiliensis</i>	30	Média+DP	2,70±0,58 ^c	0,019±0,006 ^a	<0,02	0,11±0,11 ^a	0,019±0,011 ^a
		Mediana	2,68	0,019	<0,02	0,08	0,017
		Intervalo	1,44-3,74	0,008-0,031	<0,02	<0,02-0,30	0,008-0,056
		Amostras acima da legislação* (%)	100	-	-	-	-
ANVISA			1,0	1,0	0,1	2,0	0,5 e 1

ANVISA, Portaria nº 685/1998. * N= número de amostras.

Letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ($p < 0,05$)

Tabela 3. Estatística descritiva dos resultados dos contaminantes inorgânicos presentes nas amostras de pescado coletadas no período de verão (dezembro/2009 a março de 2010), na CEAGESP/SP

Espécie	N**		Contaminantes Inorgânicos (mg.kg ⁻¹ , peso úmido)				
			Arsênio	Cádmio	Cromo	Chumbo	Mercúrio
Pescada <i>Macrodon ancylodon</i>	30	Média±DP	0,92±0,43 ^a	0,008±0,007 ^a	0,04±0,02 ^a	0,19±0,12 ^a	0,043±0,025 ^a
		Mediana	0,99	0,003	0,03	0,19	0,045
		Intervalo	<0,1-1,70	<0,01-0,031	<0,02-0,09	<0,02-0,05	0,002-0,099
		Amostras acima da legislação* (%)	50	-	-	-	-
Tainha <i>Mugil liza</i>	30	Média+DP	0,77±0,61 ^a	0,010±0,007 ^a	0,04±0,03 ^a	0,13±0,08 ^{a,b}	0,002±0,002 ^b
		Mediana	0,62	0,009	0,03	0,12	0,001
		Intervalo	<0,1-2,92	<0,01-0,029	<0,02-0,10	<0,02-0,28	<0,002-0,008
		Amostras acima da legislação* (%)	36,6	-	-	-	-
Corvina <i>Micropogonias furnieri</i>	30	Média±DP	2,34±1,59 ^b	0,012±0,009 ^a	0,04±0,03 ^a	0,15±0,10 ^{a,b}	0,052±0,042 ^a
		Mediana	2,37	0,009	0,03	0,13	0,031
		Intervalo	0,23-5,84	<0,01-0,033	<0,02-0,13	<0,02-0,43	0,014-0,139
		Amostras acima da legislação* (%)	70	-	3,33	-	-
Sardinha <i>Sardinella brasiliensis</i>	30	Média±DP	2,30±0,51 ^b	0,013±0,009 ^a	0,03±0,02 ^a	0,12±0,09 ^b	0,016±0,008 ^b
		Mediana	2,30	0,013	0,03	0,13	0,015
		Intervalo	1,31-3,64	<0,01-0,029	<0,02-0,12	<0,02-0,29	<0,002-0,031
		Amostras acima da legislação* (%)	100	-	-	-	-
ANVISA			1,0	1,0	0,1	2,0	0,5 e 1

ANVISA, Portaria nº 685/1998. * N= número de amostras.

Letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ($p < 0,05$)

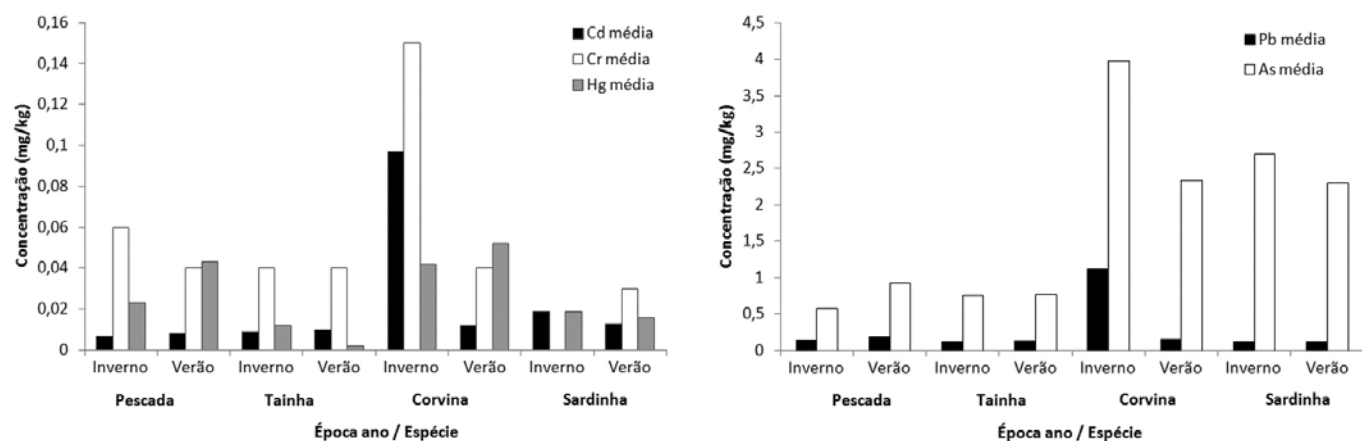


Figura 1. Teores dos contaminantes inorgânicos As, Cd, Cr, Hg e Pb, nas espécies pescada, tainha, corvina e sardinha obtidas na CEAGESP/SP, no inverno de 2009 e verão de 2010

Para a corvina (*Micropogonias furnieri*) o contaminante As foi encontrado acima do limite máximo permitido ($1,0 \text{ mg.kg}^{-1}$) em 93,3% das amostras no inverno, com valor máximo de até $8,63 \text{ mg.kg}^{-1}$ e para as amostras coletadas no verão, em 70% das amostras. Os níveis elevados de As podem estar relacionados às características de habitat da espécie corvina que vive em regiões costeiras e estuarinas, possivelmente contaminadas com despejos químicos antrópicos.

Os resultados obtidos para os contaminantes Cd e Hg total para todas as espécies estudadas não apresentaram valores superiores aos máximos estabelecidos pela legislação nacional. Contudo, para a corvina, verificou-se que para Cr e Pb houve diferença de resultados entre as épocas verão e inverno, sendo encontrado o elemento Cr acima do permitido em 40% das amostras, enquanto que no verão em apenas 3% das amostras. O mesmo ocorreu para o elemento Pb que excedeu o limite permitido em 40% das amostras no inverno e não foi detectado nas amostras coletadas no verão.

O chumbo apresenta toxicidade sobre vários órgãos, sendo o sistema nervoso particularmente o mais sensível. Em crianças e bebês expostos a altas concentrações, desenvolvem encefalopatias, com sintomas iniciais de letargia, vômito, irritabilidade, perda de apetite e tontura, progredindo para a ataxia e perda de consciência, levando ao coma e à morte²⁶.

Curcho⁹ ao investigar espécies de corvina proveniente de Cananéia, verificou que para As, de 11 amostras, 7 (54%) ultrapassaram o limite máximo permitido. Já para as amostras coletadas em Cubatão, o elemento As excedeu o limite em 83% do total de 12 amostras analisadas. Para os elementos Cr e Pb, 40% das

amostras excederam o valor máximo permitido. O valor máximo encontrado para o Cr foi de $0,441 \text{ mg.kg}^{-1}$, sendo o limite máximo da legislação $0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$. O autor, ainda analisando a espécie corvina, encontrou teores de Pb com valores máximos de $2,920 \text{ mg.kg}^{-1}$, sendo o limite máximo permitido pela legislação brasileira $2,0 \text{ mg.kg}^{-1}$. Os contaminantes Cd e Hg para a espécie não apresentaram níveis acima do permitido.

No presente estudo, as amostras analisadas da espécie sardinha verdadeira (*Sardinella brasiliensis*) não apresentaram teores dos contaminantes acima do permitido pela legislação brasileira para os contaminantes Cd, Cr, Pb e Hg. Entretanto, para o elemento As, 100% das amostras coletadas tanto no inverno quanto no verão apresentaram níveis acima do limite permitido pela legislação. O valor da mediana e intervalo de concentração encontrado para o elemento As nas amostras não teve grande variação comparando os períodos de coleta, sendo que o valor encontrado para as amostras coletadas no inverno foi de $2,68 \text{ mg.kg}^{-1}$ ($1,44 - 3,74 \text{ mg.kg}^{-1}$) e para as amostras coletadas no verão de $2,30 \text{ mg.kg}^{-1}$ ($1,31 - 3,64 \text{ mg.kg}^{-1}$). Num estudo realizado com amostras de sardinha de Cubatão³ - SP, 100% das amostras (16 amostras) apresentaram teores de arsênio acima do limite permitido pela legislação brasileira (1 mg.kg^{-1}).

Na Figura 1 são apresentados os valores médios dos contaminantes inorgânicos presentes nas 240 amostras de pescado, coletadas nas épocas de inverno de 2009 e verão de 2010. Para as espécies que vivem em águas de superfície como pescada e sardinha foram observados teores mais elevados de As e Hg nas amostras coletadas no verão de 2010 e para as amostras da espécie sardinha do contaminante Cr. Para as amostras de tainha

Tabela 4. Concentrações médias de contaminantes inorgânicos Cd e Hg (n = 60); estimativa de ingestão semanal para Hg; estimativa de ingestão mensal para Cd; porcentagem atingida do PTWI para Hg e do PTMI para Cd em dois níveis de consumo

	Hg ^a (mg.kg ⁻¹)	Mercúrio				Cd ^a (mg.kg ⁻¹)	Cádmio			
		Consumo de 340 g pescado/semana		Consumo de 80 g pescado/semana			Consumo de 1500 g pescado/mês		Consumo de 330 g pescado/mês	
		Estimativa de Ingestão ^b semanal	% PTWI ^c	Estimativa de Ingestão semanal	% PTWI ^c		Estimativa de Ingestão ^b mensal	% PTMI ^d	Estimativa de Ingestão mensal	% PTMI ^d
Pescada	0,033	1,12	28	0,26	6	0,01	6,43	26	1,41	6
Corvina	0,05	1,70	42	0,40	1,4	0,01	6,43	26	1,41	6
Tainha	0,01	0,34	8	0,08	2	0,01	6,43	26	1,41	6
Sardinha	0,02	0,68	17	0,16	4	0,02	12,86	52	2,82	12

^a concentração média para 60 amostras.

^b ug kg⁻¹ peso corpóreo⁻¹; peso corpóreo adultos (maiores de 17 anos) = 70 kg.

^c PTWI= provisional tolerable weekly intake para Hg = 4 µg kg⁻¹ peso corpóreo semana⁻¹.

^d PTMI= provisional tolerable monthly intake para Cd = 25 µg kg⁻¹ peso corpóreo mês⁻¹.

Cálculos baseados nas porções diárias recomendadas pela US EPA²⁸ (50g/dia) e dados de consumo de pescado do IBGE²⁹ (11g/dia) para região sudeste

os teores médios dos contaminantes foram constantes nas duas épocas de coleta. Já para a corvina, os maiores teores foram identificados no inverno, para As, Cd, Cr e Pb.

Estimativa da ingestão dos contaminantes inorgânicos

Para os elementos Cd e Hg foi realizado o cálculo de contribuição do consumo das espécies de pescado na estimativa de ingestão mensal e semanal desses contaminantes com base nos valores de PTMI (*provisional tolerable monthly intake*) e PTWI (*provisional tolerable weekly intake*), respectivamente, estabelecidos pelo JECFA (*Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*)²⁷. Em 2010, o JECFA²⁷ retirou os valores de PTWI para os elementos As e Pb, portanto, não foram realizados os cálculos de contribuição do consumo do pescado na estimativa desses elementos, apenas foi calculada a estimativa de ingestão diária. Foram usados dois valores para estimar a contribuição do consumo dos contaminantes presentes no pescado: 340 g de peixe/semana, baseado na recomendação da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA) que estabelece como adequado o consumo de 340 g/semana para humanos²⁸ e o consumo de 80 g de peixe, baseado na Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) do IBGE²⁹ que traz dados de consumo alimentar médio de peixes frescos para a região Sudeste (11,4 g/dia). Os valores da estimativa de ingestão semanal, para o Hg, e mensal, para o Cd (Tabela 4) foram calculados para cada espécie usando os resultados médios obtidos de cada contaminante inorgânico encontrado nas 60 amostras de uma mesma espécie.

O PTWI e o PTMI são expressos em base semanal e mensal, e enfatizam os riscos de exposição de longo

período para contaminantes que possam ser acumulados no corpo humano. Analisando a Tabela 4 verifica-se que o consumo das espécies corvina e pescada foram as que mais contribuíram para atingir o valor de PTWI para o contaminante Hg, considerando a estimativa de consumo de pescado recomendada pela US EPA²⁸. Para o contaminante Cd, a espécie sardinha foi a que apresentou o maior valor para a estimativa de ingestão mensal (52% da PTMI) considerando o consumo de pescado recomendado pela US EPA²⁸ e, também, quando consideramos o consumo de pescado baseado nos dados de consumo da região Sudeste da tabela POF do IBGE²⁹ (26% da PTMI).

As espécies que mais contribuíram na estimativa de ingestão diária do contaminante As, considerando os dados de consumo de pescado pela população da região sudeste²⁹ de 11 g/dia, foram a corvina (34,8 µg/dia), seguida da sardinha (27,5 µg/dia), tainha (8,5 µg/dia) e pescada (8,2 µg/dia). Para o contaminante chumbo, as espécies que mais contribuíram para a estimativa da ingestão deste contaminante foram corvina e tainha (6,9 µg/dia), seguida da pescada (1,8 µg/dia) e sardinha (1,2 µg/dia).

CONCLUSÃO

Os dados obtidos nesse estudo permitem concluir que as espécies de peixe pescada (*Macrondon Ancyloodon*), tainha (*Mugil liza*), corvina (*Micropogonias furnieri*), e sardinha (*Sardinella brasiliensis*), comercializadas na cidade de São Paulo, apresentam contaminação por metais pesados. O arsênio foi o elemento que apareceu em maior número de amostras e acima do limite máximo permitido pela legislação nacional em 100% das amostras

da espécie sardinha e em menor quantidade nas espécies corvina, tainha e pescada. Os contaminantes arsênio, crômio e chumbo foram encontrados em níveis mais elevados no período de inverno do que no período de verão para a corvina, indicando provável acúmulo desses contaminantes no período de inverno.

Os resultados obtidos para os contaminantes inorgânicos neste estudo apontam para a necessidade de monitoramento constante da contaminação do pescado nacional, exigindo também uma investigação para identificação das origens da contaminação, a partir de suas respectivas áreas de captura e, também, para o estudo das espécies químicas de arsênio e mercúrio que predominam no pescado estudado.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq/MAPA-SDA (Edital 64/2008 processos nº. 578.096/2008 e 578.535/2008) e ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- Ikem A, Egiebor NO. Assesment of trace elements in canned fishes (mackerel, tuna, salmon, sardines and herrings) marketed in Georgia and Alabama (United States of America). *J Food Comp Anal*. 2005;18:771-87.
- Kevan PG. Pollinators as bioindicators of the state of the environment: species, activity and diversity. *Agr Ecosyst Environ*. 1999;74: 373-93.
- Huss HH. Garantia da qualidade dos produtos da pesca: FAO - Documento Técnico Sobre as Pescas n. 334. Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura, Roma, p.176.
- Tarley CRT, Coltro WKT, Matsushita M, Souza NE. Characteristic levels of some heavy metals form Brazilian canned sardines (*Sardinella brasiliensis*). *J Food Comp Anal*. 2001;14: 611-7.
- Pereira Filho WR, Ribeiro EF, Lizarte Neto FS. Elementos metálicos em pescados comercializados na cidade de São Paulo. *ConScientiae Saúde*. 2003;2:61-5.
- Morgano MA, Perez ACA, Milani RF, Mantovani DMB, Neiva CRP, Furlan EF et al. Mercúrio total em pescado da cadeia produtiva da Baixada Santista, Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2007;66(2):165-72.
- Veado MARV, Heeren AO, Severo MI, Grenier-Loustalot ME, Arantes IA, Cabaleiro HL et al. INAA and ICP-MSHS: Metal pollutants in fish tissues Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Pampulha Lake, Belo Horizonte city, Minas Gerais State, Brazil. *J Radioanal Nuc Chem*. 2007;272(3): 511-4.
- Terra BF, Araújo FG, Calza CF, Lopes RT, Teixeira TP. Heavy metal in tissue of three fish species from diferents trophics levels in a Tropical Brazilian River. *Water Air Soil Pollut*. 2008;187: 275-84.
- Curcho MRS. Avaliação de Micro e Macroelementos, Elementos Tóxicos (Cd, Hg e Pb) e Ácidos Graxos, em Peixes Disponíveis Comercialmente para consumo em Cananéia e Cubatão, Estado de São Paulo [dissertação de mestrado]. São Paulo (SP): Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, autarquia associada à Universidade de São Paulo; 2009.
- Marcovecchio JE. The use of *Micropogonias furnieri* and *Mugil liza* as bioindicators of heavy metals pollution in La Plata river estuary, Argentina. *Sci Total Environ*. 2004;323:219-26.
- Burger J, Gochfeld M. Heavy metals in commercial fish in New Jersey. *Environ Res*. 2005;99:403-12.
- Kojadinovic J, Potier M, Le Corre M, Cosson RP, Bustamante P. Bioaccumulation of trace elements in pelagic fish from the Western Indian Ocean. *Environ Pollut*. 2007;146:548-66.
- Fernandes C, Fontainhas-Fernandes A, Cabral D, Salgado MA. Heavy metals in water, sediment and tissues of *Liza saliens* from Esmoriz-Paramos lagoon, Portugal. *Environ Monit Assess*. 2008;136: 267-75.
- Lowel-McConnell RH. Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais. Tradução Anna Emília A. de M. Vazzoler; Angelo A. Agostinho & Patrícia T.M. Cunningham. São Paulo: EDUSP; 2006. 534p.
- Yamaguti N. Diferenciação geográfica de *Macrodon ancylodon* (Bloch & Schneider, 1789) na costa Brasileira, entre as latitudes 18°36'S e 32°10'S, etapa I, Boletim do Instituto Oceanográfico. 1979;16(1):101-6.
- Menezes NA, Figueiredo JL. Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil: Teleostei (3). São Paulo: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo. 1980. p.96.
- Burger J, Gochfeld M. Heavy metals in commercial fish in New Jersey. *Environ Res*. 2005;99:403-12.
- Bordajandi LR, Gómez G, Abad E, Rivera J, Fernández-Bastón MM, Blasco J, et al MJ. Survey of Persistent Organochlorine Contaminants (PCBs, PCDD/Fs, and PAHs), Heavy Metals (Cu, Cd, Zn, Pb, and Hg), and Arsenic in Food Samples From Huelva (Spain): Levels and Health Implications. *J Agric Food Chem*. 2004;52: 992-1001.
- Morgano MA, Rabonato LC, Milani RF, Miyagusku L, Balian SC. Assesment of trace elements in fishes of Japanese foods marketed in São Paulo (Brazil). *Food Control*. 2011;22:778-85.
- Morgano MA, Gomes PC, Mantovani DMB, Perrone AAM, Santos TF. Níveis de mercúrio total em peixes de água doce de pisciculturas paulistas. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2005;25(2):250-3.
- Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial – INMETRO. Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos. DOQ-CGCRE-008. Revisão 03 - fev./2010. p.1-20.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 24, de 14 de julho de 2009. Define os requisitos e critérios específicos para funcionamento dos laboratórios de análises de resíduos e contaminantes em alimentos integrantes da Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários. Diário Oficial [da] União. Brasília, DF, 22 jul 2009. Seção I, nº 138. p.7.
- Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Portaria nº 685, de 27 de agosto de 1998. Aprova o Regulamento Técnico e princípios gerais para o estabelecimento de níveis máximos de contaminantes químicos em alimentos. Diário Oficial [da] União. Brasília, DF, 24 set. 1998. Seção 1.

24. Occupational Safety and Health Administration. Toxic Metals, Occupational Safety and Health Administration. Washington, DC: US Depart of Labor; 2004. [acesso 2010 Mar 18]. Disponível em: [<http://www.osha.gov>].
25. Institute of Medicine of the National Academies. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc. Washington, DC: The National Academy Press, 2001. p. 773.
26. Yusa V, Suelves T, Ruiz-Atienza L, Cervera ML, Benedito V, Pastor A. Monitoring programme on cadmium, lead, and mercury in fish and seafood from Valencia, Spain: levels and estimated weekly intake. *Food Addit Contam: Part B*. 2008;1(1): 22-31.
27. World Health Organization - WHO. Joint FAO/WHO Food Standards Programme CODEX Committee on Contaminants in Foods. Fifth Session. [acesso 2011 Out 27]. Disponível em: [http://www.cclac.org/documentos/CCCF/2011/3%20Documentos/Documentos%20Ingles/cf05_INE.pdf].
28. United States Environmental Protection Agency - US EPA. What you need to know about mercury in fish and shellfish. EPA-823-F-04-009, 2pp; 2004. [acesso 2010 Mar 18]. Disponível em: [<http://www.epa.gov/waterscience/fish/MethylmercuryBrochure.pdf>].
29. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009: análise do consumo alimentar pessoal no Brasil. IBGE, Coordenação de Trabalho e rendimento. Rio de Janeiro: IBGE; 2011. p.150.

Efeito dos diferentes métodos de cocção sobre os teores de nutrientes em brócolis (*Brassica oleracea* L. var. *italica*)

Effect of different cooking methods on the nutrient contents in broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *Italica*)

RIALA6/1405

Natália Elizabeth Galdino ALVES¹, Laura Ribeiro de PAULA¹, Aureliano Claret da CUNHA², Cláudia Antônia Alcântara AMARAL², Maria Tereza de FREITAS^{2*}

*Endereço para correspondência: ²Laboratórios de Técnica Dietética e Bromatologia, Departamento de Alimentos, Escola de Nutrição, Universidade Federal de Ouro Preto/UFOP – Campus Morro do Cruzeiro, s/n, Bairro Morro do Cruzeiro, Ouro Preto, MG, CEP 35400-000. E-mail: freitaste@yahoo.com.br

¹Universidade Federal de Ouro Preto/MG.

Recebido: 13.06.2011 - Aceito para publicação: 21.10.2011

RESUMO

Os brócolis contêm quantidades relevantes de vitaminas e minerais e, nestes vegetais *in natura* os teores de potássio e vitamina C são >30% da IDR (ingestão diária recomendada). As formas de transferência de calor, intensidade da temperatura, duração do processo e meio de cocção utilizados são fatores que acarretam alterações nas características químicas, físicas e nutricionais do alimento. Neste estudo os teores de umidade, vitamina C, potássio, cálcio e fósforo foram avaliados em brócolis submetidos a diferentes técnicas de cocção (panela a vapor, forno combinado, forno de micro-ondas, ebulição e fogo brando). Nos brócolis *in natura* os teores de potássio e vitamina C foram, respectivamente, de 229,23 ± 7,88 e 50,79 ± 6,55 mg/100 g. Comparando-se esses teores com aqueles obtidos pelas técnicas de panela a vapor e forno combinado não houve diferenças significativas, ao contrário dos resultados observados para as demais metodologias. Houve perdas significativas de teores de fósforo e cálcio em todas as técnicas de cocção, em comparação aos brócolis *in natura*. A cocção na panela a vapor e no forno combinado foram as técnicas que preservaram mais adequadamente os teores de vitamina C e potássio. A retenção de nutrientes é o fator preponderante na indicação de procedimentos de cocção.

Palavras-chave. ácido ascórbico, processamento de alimentos, valor nutritivo e minerais.

ABSTRACT

The broccoli contains significant amounts of vitamins and minerals. The kind of heat transference, temperature intensity, processing time and cooking methods are the conditions which can induce physical and chemical changes, modifying the nutritional value of the food. This study analyzed the moisture, vitamin C, potassium, calcium and phosphorus contents in broccoli prepared by different cooking techniques (steam cooker, combined oven, microwave oven, boiling and low heat cooking). The potassium and vitamin C content in fresh broccoli were 229.23 ± 7.88 and 50.79 ± 6.55 mg/100 g, respectively. Comparing these values with those obtained by steam cooker and combined oven techniques, no significant differences were noticed; unlike the contents amounts observed in broccoli cooked with other procedures. Fresh broccoli contains potassium and vitamin C contents higher than 30% of RDI. All of the cooking procedures have resulted in losses of phosphorus and calcium contents in comparison with the amounts found in fresh broccoli. The steam cooker and the combined oven proved to be the most appropriate procedures for preserving the vitamin C and potassium contents. Nutrient retention parameter is a crucial factor to select the vegetable cooking technique.

Keywords. ascorbic acid, food handling, nutritive value and minerals.

INTRODUÇÃO

O brócolis (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) é uma hortaliça pertencente à família *Cruciferae*, que apresenta-se como boa fonte de beta-caroteno, vitamina C, selênio, fibra, luteína, zeaxantina, vitamina K, ácido fólico e minerais como cálcio, potássio, fósforo e enxofre, que contribuem para os efeitos promotores da saúde^{1,2}.

A manutenção das quantidades de vitaminas e minerais nas hortaliças é um desafio, uma vez que, logo após a colheita, reações químicas e físicas passam a ocorrer e podem influenciar sua qualidade, do mesmo modo, o processamento a que são submetidos antes do consumo, também pode alterar suas características. Os métodos de cocção são apontados como sendo um dos principais determinantes das perdas de nutrientes³.

A cocção, processo que utiliza o efeito do calor, promove trocas químicas, físico-químicas e estruturais nos componentes dos alimentos. De acordo com o tempo de cocção e a temperatura empregada, ocorrerá a destruição de micro-organismos e enzimas, modificações das propriedades sensoriais e nutricionais do produto cozido. A cocção desagrega as estruturas vegetais, melhorando a palatabilidade e a digestibilidade^{4,5}.

As alterações químicas e físicas provocadas por diferentes métodos de cocção podem modificar o valor nutricional do alimento e são influenciadas por fatores como a forma de transferência de calor, a intensidade da temperatura, a duração do processo e o meio de cocção utilizados^{6,7}.

A produção de refeições envolve um conjunto de procedimentos que garantam sua qualidade e segurança. A alimentação balanceada tem como meta, promover, manter ou mesmo recuperar a saúde. Dentre toda infraestrutura necessária à produção de refeições incluem-se os diferentes equipamentos para o processo de cocção: fogões, fornos, fritadeiras e panelões⁸. Dos novos equipamentos que vêm sendo utilizados nessas unidades, destaca-se o uso do forno combinado que engloba todos os métodos de cocção: assar, fritar, grelhar, gratinar, aquecer sem ressecar, cozinhar em banho-maria e a vapor. Sua utilização reduz o tempo de preparo, diminui o desperdício, melhora a apresentação dos pratos e não requer a utilização de gordura. Por meio da circulação combinada de ar quente e vapor, esse tipo de forno utiliza o calor seco, calor úmido e a combinação dessas duas formas de cocção. Assim, o alimento preparado no forno combinado recebe um aquecimento homogêneo, evitando

ressecamento e garantindo cocção uniforme baseado na premissa de que este método de cocção é o que melhor preserva as características sensoriais e nutricionais⁹.

Os dados de literatura a respeito das alterações ocorridas com os alimentos durante o cozimento e sobre a influência dos diferentes métodos e equipamentos utilizados na cocção sobre os teores de nutrientes são bastante escassos, portanto, estudos específicos podem contribuir para o conhecimento do valor nutricional dos alimentos consumidos e da melhor forma de prepará-los. Assim, o objetivo do presente estudo foi verificar a influência de diferentes métodos de cocção na preservação de nutrientes presentes nos brócolis.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

As amostras de brócolis *in natura* foram obtidas em um hipermercado localizado na cidade de Ouro Preto/MG, transportados em temperatura ambiente e submetidos à cocção no mesmo dia da aquisição. Os testes foram realizados com duas repetições e as análises foram feitas em triplicata. Para garantir homogeneidade das amostras, os brócolis foram separados em flores com peso aproximado de 200 g para cada método de cocção analisado.

Métodos de cocção

As amostras foram submetidas individualmente aos vários métodos de cocção, a saber: cocção em panela a vapor; em vapor combinado (Forno Combinado Modelo EC3 *Gourmet* da marca Prática *Technicook*, com *gastronorms* de 1/1 x 65 mm perfurado); em forno de micro-ondas (marca *Brastemp*); em ebulição (panela comum); em fogo brando (panela comum). Para os métodos de cocção em ebulição e fogo brando foram realizados dois procedimentos, cocção a partir de água fria e cocção a partir da água em ebulição.

Para representar os diferentes métodos de cocção utilizados adotaram-se as seguintes siglas: MO = micro-ondas; FC = forno combinado; PV = panela a vapor; AFA = cocção a partir da água fria, fogo alto; AFB = cocção a partir da água fria, fogo brando; EFA = cocção a partir da ebulição, fogo alto; EFB = cocção a partir da ebulição, fogo brando.

Determinação dos nutrientes

Vitamina C

A análise de vitamina C foi realizada pelo método de titulação do 2,6 - diclorofenol indofenol

de acordo com as normas da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC)¹⁰.

Umidade e cinzas

A determinação da umidade foi realizada por secagem direta em estufa a 105 °C até peso constante (aproximadamente 4h) e, determinação de cinzas pelo método de resíduo por incineração em Mufla a 550 °C, ambos de acordo com as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz¹¹.

Cálcio

Para a quantificação de cálcio foi utilizado o método de permanganometria, ou seja, titulação a quente da solução previamente preparada com solução de permanganato de potássio até coloração rósea permanente, segundo as Normas do Instituto Adolfo Lutz¹¹.

Fósforo

A determinação de fósforo foi realizada por espectrofotometria na região do visível e baseia-se na complexação do fósforo com vanado-molibdato de amônio, segundo as Normas do Instituto Adolfo Lutz¹¹.

Potássio

A determinação de potássio foi realizada pelo método de fotometria de chama, em que a amostra do alimento previamente digerida contendo cátions metálicos é inserida em uma chama e analisada pela quantidade de radiação emitida pelas espécies atômicas ou iônicas excitadas, segundo as Normas do Instituto Adolfo Lutz¹¹.

Análise Estatística

Após verificação da normalidade dos resultados pelo teste de *Skewness*, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida do teste de *Tukey* ao nível de 5% de significância, quando o “F” da ANOVA foi significativo. Foi utilizado também, para análise dos resultados, o *Software* SPSS 15.0.

Legislação

Os teores de vitamina C e minerais foram comparados com a Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que estabelece a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais¹².

Os valores de vitamina C e minerais também foram comparados com os valores determinados pela

Portaria nº 27, de 13 de janeiro de 1998, da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, que aprova o Regulamento Técnico referente à Informação Nutricional Complementar (declarações relacionadas ao conteúdo de nutrientes)¹³.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 estão representados o tempo médio, temperatura média, e os volumes de água utilizados nos tratamentos. O maior tempo de cocção ocorreu para o tratamento AFB, com um tempo médio de 42,5 minutos. O menor tempo de cocção foi para o método MO, tempo de 5 minutos. Para o método FC, foi programada a função banho-maria a uma temperatura de 80 °C, por 9 a 14 minutos. Para os demais métodos as temperaturas médias no final do processo de cocção foram semelhantes. Foi utilizado um litro de água para a cocção nos métodos AFA, AFB, EFA e EFB, suficiente para coccionar os 200 g de brócolis. Para o MO foram adicionadas três colheres de água de acordo com a recomendação do fabricante do equipamento (Brastemp), que equivale a 0,03 L. Para o método FC não foi possível contabilizar a quantidade de água, uma vez que o vapor é gerado pelo próprio aparelho sem necessitar de adição de água. A quantidade de água para PV (2,5 L) foi estabelecida de acordo com as dimensões do utensílio utilizado de forma a permitir cocção adequada.

Tabela 1. Tempo médio de cocção e volume de água gasto nos tratamentos

Tratamentos	Tempo médio (min)	Temperatura média (°C)	Volume de água (L)
MO	5,6	potência máxima	0,03
FC	12,5	77	-
PV	20	94	2,5
AFA	27,3	89	1
AFB	42,5	86	1
EFA	10,6	92	1
EFB	24	90	1

MO= forno de micro-ondas; FC= forno combinado; PV= panela a vapor; AFA= cocção a partir da água fria, fogo alto; AFB= cocção a partir da água fria, fogo brando; EFA= cocção a partir da ebulição, fogo alto; EFB= cocção a partir da ebulição, fogo brando

Na Tabela 2 encontram-se os resultados das análises de umidade e nutrientes que foram expressos em porcentagem de base úmida. A umidade média variou de 88,32% (*in natura*) a 94,37% (EFB). Koh et al.¹⁴ encontraram valores de 83,87 a 90,27% de umidade nos brócolis *in natura* e Lima-Pallone et al.¹⁵ verificaram um teor de

Tabela 2. Teores médios dos nutrientes avaliados nos diferentes métodos de cocção

Método	Umidade (%)	Vitamina C (mg/100g)	Potássio (mg/100g)	Cálcio (mg)	Fósforo (mg)
<i>In natura</i>	88,32±0,68 ^a	50,79±6,55 ^c	229,23±7,88 ^c	107,77±10,75 ^d	89,36±1,55 ^f
M	88,61±0,95 ^a	40,52±5,82 ^b	81,98±9,11 ^b	49,68±6,30 ^{a,b}	70,78±3,69 ^e
FC	88,40±1,21 ^a	41,9±6,91 ^{b,c}	184,57±28,81 ^c	59,06±7,51 ^{a,b,c}	61,75±1,59 ^d
PV	89,17±0,71 ^a	41,99±0,74 ^{b,c}	165,75±45,18 ^c	76,17±15,55 ^c	64,18±8,12 ^{d,e}
AFA	94,25±0,19 ^b	40,21±4,47 ^b	51,75±11,84 ^a	45,05±21,65 ^a	24,95±1,17 ^a
AFB	93,82±0,86 ^b	29,66±4,95 ^a	54,18±22,72 ^a	58,87±11,56 ^{a,b,c}	44,60±9,25 ^c
EFA	94,09±0,18 ^b	33,07±6,37 ^{a,b}	53,24±20,81 ^a	63,23±4,08 ^{a,b,c}	30,23±2,54 ^{a,b}
EFB	94,37±0,20 ^b	28,75±4,46 ^a	59,46±3,70 ^{a,b}	66,79±3,83 ^{b,c}	35±2,32 ^b

Os valores estão representados pela média ± desvio padrão. Amostras na mesma coluna seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

M= forno de micro-ondas; FC= forno combinado; PV= panela a vapor; AFA= cocção a partir da água fria fogo alto; AFB= cocção a partir da água fria, fogo brando; EFA= cocção a partir da ebulição, fogo alto; EFB= cocção a partir da ebulição, fogo brando

umidade média de 87% para o vegetal *in natura*, e para os brócolis cozidos, o teor médio foi de 91%, provavelmente devido à incorporação de água após o cozimento.

Pela análise estatística (Tabela 2) verificou-se que o teor de umidade dos métodos FC, MO e PV não diferiram entre si e foram estatisticamente iguais aos brócolis *in natura*. A cocção pelos métodos FC e PV foi realizada por meio de vapor e, portanto, não houve contato direto com a água, o que resultou em menores valores de umidade. Para a cocção em MO utilizou-se uma menor quantidade de água, o que também resultou em um valor reduzido de umidade, quando comparados aos métodos de cocção EFB, EFA, AFB e AFA.

Observou-se que os métodos de cocção EFB, EFA, AFB e AFA (Tabela 2) apresentaram os maiores valores de umidade e, não diferiram estatisticamente entre si. Os valores apresentados podem ser explicados pelo contato direto com a água e também à maior quantidade de água utilizada no processo de cocção.

De acordo com a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO, 2006)¹⁶, em 100 g de brócolis crus e cozidos tem-se 91,2 mg e 92,6 mg de umidade, respectivamente, valores próximos aos encontrados no presente estudo.

De todos os minerais analisados, o maior valor encontrado na hortaliça crua foi o de potássio. No presente estudo (Tabela 2), os valores médios de potássio variaram de 51,75 mg/100 g (AFA) a 229,23 mg/100 g (*in natura*).

A avaliação dos teores de minerais em algumas hortaliças como alface, agrião, rúcula, couve, couve-chinesa, escarola, repolho e frutas demonstrou que o nível de potássio foi o mais alto dentre todos os elementos¹⁷, corroborando os resultados obtidos.

Observou-se maior preservação do potássio para os métodos FC (184,57 mg/100 g) e PV (165,75 mg/100 g), que não diferiram entre si e foram estatisticamente iguais aos dos brócolis *in natura*. Cabe ressaltar que a cocção a vapor (PV) é um tipo de cocção mais lenta, porém, apesar do tempo gasto (20 minutos), a ausência de contato direto com a água pode ter evitado as perdas por lixiviação.

Os métodos de cocção EFB, AFB, AFA, EFA resultaram em menor preservação e não diferiram estatisticamente entre si. Resultado não esperado ocorreu para o método MO (81,98 mg/100g), que apresentou perda considerável de potássio, não diferindo estatisticamente do método EFB (59,46 mg/100g). Entretanto, para o método de cocção MO esperava-se comportamento semelhante aos métodos FC e PV, devido a pouca quantidade de água utilizada no referido método. Tannembaum et al.¹⁸ e Miller¹⁹ afirmam que a principal operação que contribui para as perdas de substâncias minerais durante o cozimento não são causadas pela destruição térmica, mas por lixiviação, que arrasta parte dos minerais solúveis para a água de cocção.

Santos et al.²⁰ analisaram o efeito do tempo de cocção sobre os teores de minerais em folhas de brócolis e verificaram uma perda aproximada de 66,97% de potássio, após 10 minutos de cocção em água, devido ao processo de lixiviação. Dessa forma, considerando-se os dados da Tabela 1, os resultados encontrados no presente estudo foram condizentes, já que os tratamentos em contato com a água e com maior tempo de cocção (AFB, AFA, EFA e EFB) resultaram em maiores perdas de potássio.

Os valores médios de cálcio variaram de 45,05 mg/100 g (AFA) a 107,77 mg/100 g (*in natura*). O valor de cálcio nos brócolis *in natura* diferiu

estatisticamente de todos os métodos de cocção utilizados no presente trabalho. O resultado encontrado foi superior ao da TACO (2006)¹⁶, que apresenta o valor de 86 mg/100 g nos brócolis crus. O método PV apresentou melhor preservação de cálcio (76,17mg/100 g) e diferiu estatisticamente apenas dos métodos AFA e MO, que apresentaram as maiores perdas. Mais uma vez, a cocção em micro-ondas mostrou resultado não esperado, pois devido a pouca quantidade de água utilizada (0,03L) esperava-se menor perda de cálcio.

As médias de valores de fósforo variaram de 24,95 mg/100 g (AFA) a 89,36 mg/100 g (*in natura*). Os resultados da Tabela 2 evidenciam que os brócolis *in natura* diferiram estatisticamente de todos os métodos utilizados. Os métodos que apresentaram melhor preservação desse mineral foram MO, FC e PV, com teores de 70,78 mg, 61,75 mg e 64,18 mg em 100 g, respectivamente, e não diferem estatisticamente entre si.

Para a vitamina C o menor valor médio encontrado foi referente ao método EFB (28,75 mg/100 g) e o maior valor médio foi encontrado nos brócolis *in natura* (50,79 mg/100 g). Os métodos FC e PV obtiveram valores estatisticamente iguais ao *in natura* e resultaram em melhor preservação de vitamina C. Os métodos EFB, AFB e EFA não diferiram entre si e apresentaram as maiores perdas. Os métodos MO e AFA diferiram em valores do *in natura*, porém não diferiram entre si, apresentando perdas menores que os demais métodos de cocção em contato direto com a água.

A vitamina C é uma das vitaminas mais sensíveis à perda em alimentos. A vitamina C é muito suscetível à oxidação química e enzimática^{21,22}. Essa oxidação ocorre especialmente na presença de oxigênio, íons metálicos, pH alcalino e temperaturas elevadas^{23,24}. A lixiviação também é grande contribuinte para a perda da vitamina C e pode ocorrer durante as etapas de higienização e cocção dos alimentos, devido ao contato direto com a água^{25,26}.

Dessa forma, justifica-se o fato de ter havido maior preservação para os métodos FC e PV, uma vez que o calor específico do vapor da água é menor que o da água que gera esse calor, podendo assim minimizar as perdas por difusão ou lixiviação. Quanto à temperatura, de acordo com a Tabela 1, o método FC utiliza menor temperatura para a cocção, o que também minimiza perdas por oxidação. Os menores valores encontrados foram 28,75 mg/100 g, 29,66 mg/100 g e 33,07 mg/100 g, para os métodos AFB, EFB e EFA, respectivamente. Esses

métodos utilizam água, no contato direto, para cocção e tempo médio maior de preparo em alta temperatura, o que contribui para perdas por difusão e oxidação.

Na Tabela 3 estão representados os valores de IDR para cada nutriente avaliado, a classificação do alimento como fonte ou alto teor, de acordo com o percentual atingido para a IDR, e também sua composição centesimal. De acordo com a Portaria nº 27, de 13 de janeiro de 1998, SVS/MS¹³, um alimento sólido será considerado com alto teor (rico) ou como fonte de vitaminas e minerais se cobrir, respectivamente, 30% ou 15 % do valor da IDR de referência.

Tabela 3. Valores recomendados de IDR, percentual de classificação como fonte ou alto teor e composição química dos brócolis crus e cozidos

Nutriente	IDR*	Classificação**		Composição química, por 100g***	
		Fonte 15% da IDR	Alto teor 30% da IDR	Cru	Cozido
Potássio	260 mg	39 mg	78 mg	322 mg	119 mg
Cálcio	1000 mg	150 mg	300 mg	86 mg	51 mg
Fósforo	700 mg	105 mg	210 mg	78 mg	33 mg
Vitamina C	45 mg	6,75 mg	13,5 mg	42 mg	24,61

*Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005.

**Portaria nº 27, de 13 de janeiro de 1998.

***Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO).

¹Usado como referência: FRANCO, G. Tabela de composição química dos alimentos. 1999; por não constar na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO)

Os teores de potássio nos métodos de cocção estudados variaram de 51,75 mg a 184,57 mg, sendo que o maior valor absoluto foi encontrado no método FC, que proporcionou uma preparação com alto teor de potássio e o menor valor foi encontrado no método AFA, que ainda assim, resultou em uma preparação que pode ser considerada fonte de potássio.

De acordo com a TACO (2006)¹⁶, em 100 g de brócolis crus e cozidos tem-se 322 mg e 119 mg de potássio, respectivamente. Esses valores são divergentes dos encontrados no presente estudo, pois o valor *in natura* foi de 229,23 mg e dos diferentes métodos de cocção variaram de 51,75 mg a 184,75 mg/100 g de alimento. A composição dos alimentos pode variar devido ao seu caráter biológico, assim, os diferentes teores de nutrientes encontrados podem ser explicados, principalmente, pela variedade, safra, solo, clima, produção, formulação, etc. Desse modo, variações encontradas não podem ser consideradas erros²⁷.

No presente estudo os teores de cálcio (107,77 mg) e de fósforo (89,36 mg) nos brócolis *in natura* não atingiram o percentual de 15% da IDR, 1000 mg e 700 mg, respectivamente, para que este fosse considerado um alimento fonte dos referidos minerais.

O teor de vitamina C encontrado nos brócolis crus foi de 50,79 mg, conseqüentemente é um alimento que possui um alto teor deste nutriente, ou seja atinge os 30% da IDR, que corresponde a 13,5 mg. Pelos diferentes métodos de cocção detectou-se teores de 28,75 mg a 41,9 mg/100g, portanto, todos os métodos preservaram, de certa forma, a vitamina C. Destacaram-se os métodos PV e FC, que praticamente não implicaram em perdas significativas desta vitamina.

De acordo com a TACO (2006)¹⁶, em 100 g de brócolis crus tem-se 42 mg de vitamina C, valor próximo ao preconizado pela IDR e inferior ao encontrado no presente estudo.

CONCLUSÃO

Houve aumento do teor de umidade nos métodos AFA, AFB, EFA e EFB, fato que pode ser explicado pela incorporação de água nos referidos métodos.

Os brócolis *in natura* apresentaram teor de potássio e vitamina C de, respectivamente, $229,23 \pm 7,88$ e $50,79 \pm 6,55$ mg/100 g, não apresentando diferença significativa quando comparados com os teores dos métodos panela a vapor e forno combinado, o que não ocorreu nos demais métodos.

Os teores de fósforo e cálcio apresentaram perdas significativas em todos os métodos de cocção quando comparados com os teores dos brócolis *in natura*.

Por ter apresentado teor de potássio e vitamina C maior que 30% da IDR, os brócolis *in natura* são considerados alimento de alto teor desses nutrientes.

Os resultados apresentados são de extrema importância nutricional, pois baseado nas perdas minerais ocorridas pode-se indicar o melhor método de cocção das hortaliças pesquisadas e orientar sobre as ingestões adequadas para o suprimento das necessidades minerais de cada indivíduo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Programa de Iniciação Científica da Universidade Federal de Ouro Preto (PIP/UFOP) pelo apoio financeiro recebido.

REFERÊNCIAS

1. Carvalho PGB, Machado CMM; Moretti CL, Fonseca MEN. Hortaliças como alimentos funcionais. *Hortic Bras*. 2006;24(4):397-404.
2. Agte VV, Tarwadik V, Mengale S, Chipionkar SA. Potential of traditionally cooked green leafy vegetables as natural sources for supplementation of eight micronutrients in vegetarian diets. *J Food Compost Anal*. 2000;13(16):885-91.
3. Ahvenainen R. New approaches in improving the shelf life of minimally processed fruits and vegetables. *Trends Food Sci Technol*. 1996;7(6):179-87.
4. Tscheuschner HD. Fundamentos de tecnologia de los alimentos. Zaragoza: Acribia; 2001.
5. Araújo WMC, Montebello NP, Botelho RBA, Borgo LA. *Alquimia dos alimentos*. 2ª ed. Brasília (DF): Editora SENA; 2008.
6. Garcia-Arias MT, Pontes EA, Garcia, LMC, Fernandez MCG, Sanchez MFJ. Cooking-freezing-reheating (CFR) of sardine (*Sardina pilchardus*) fillets: effect of different cooking and reheating procedures on the proximate and fatty acid compositions. *Food Chem*. 2003;83(3):349-56.
7. Potter NN, Hotchkiss JH. *Ciência de los Alimentos*. 5ª ed. Zaragoza: Acribia; 1995.
8. Kawasaki VM, Denise C, Cyrillo FMS. Custo-efetividade da produção de refeições coletivas sob o aspecto higiênico-sanitário em sistemas cook-chill e tradicional. *Rev Nutr*. 2007;20(2):129-38.
9. Proença RPC. *Inovação tecnológica na produção de alimentação coletiva*. Florianópolis: Insular; 1997.
10. Cunniff, P. *Official methods of analysis of AOAC International*. 16th ed. Arlington: AOAC International; 1995.
11. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo-Brasil), *Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. 4ª ed. Brasília (DF): ANVISA; 2005.
12. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005. Aprova o Regulamento Técnico sobre a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de Proteína, Vitaminas e Minerais. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, de 23 de setembro de 2005. [acesso 2011 Fev 17]. Disponível em: [http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=18828&word].
13. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 27, de 13 de janeiro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico referente à Informação Nutricional Complementar. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 16 de jan. 1998. Seção 1, nº 11-E. p.1-3.
14. Koh E, Wimalasiri KMS, Chassy AW, Mitchell AE. Content of ascorbic acid, quercetin, kaempferol and total phenolics in commercial broccoli. *J Food Compost Anal*. 2009;22(7-8): 637-43
15. Lima-Pallone JA, Catharino RR, Godoy HT. Folatos em brócolis convencional e orgânico e perdas no processo de cocção em água. *Quim. Nova*. 2008;31(3):530-5.
16. Unicamp. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO, 2006). [acesso 2011 Fev 17]. Disponível [http://www.unicamp.br/nepa/taco].

17. Kawashima LM. Teores totais e frações solúveis de alguns elementos minerais nutricionalmente importantes em hortaliças folhosas e efeito do cozimento sobre solubilidade e perdas [dissertação de mestrado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 1997.
18. Tannenbaum SR, Young VR, Archer MC. Vitaminas y minerales. In: Fennema OR. Química de los alimentos. Zaragoza: Acribia; 1993. p. 537-613.
19. Miller, DD. Minerals. In: Fennema OR. Food Chem. New York: Marcel Dekker; 1996. p. 618-49.
20. Santos MAT, Abreu CMP, Carvalho VD. Efeito de diferentes tempos de cozimento nos teores de minerais em folhas de brócolis, couve-flor e couve (*Brassica oleracea* L.). Ciênc. Agrotec. 2003;27(3):597-604.
21. Maia GEG, Pasqui SC, Lima AS, Campos FM. Determinação dos teores de vitamina c em hortaliças minimamente processadas. Aliment Nutr. 2008;19(3):329-35.
22. Campos FM, Martino HSD, Sabarense CM, Pinheiro-Santa'Ana HM. Estabilidade de compostos antioxidantes em hortaliças processadas: uma revisão. Aliment Nutr. 2008;19(4):481-90.
23. Rios MDG, Penteado MVC. Vitamina C. In: Penteado MVC, organizador. Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos. São Paulo: Manole; 2003. p. 201-25.
24. Kalt W. Effects of production and processing factors on major fruit and vegetable antioxidants. J Food Sci. 2005;70(1):11-9.
25. Özkan M, Kirca A, Cemeroglu B. Effects of hydrogen peroxide on the stability of ascorbic acid during storage in various fruit juices. Food Chem. 2004;88(4):591-7.
26. Moraes FA, Cota AM, Campos FM, Pinheiro-Sant'Ana HM. Avaliação e controle de perdas de vitamina C em hortaliças preparadas em restaurante institucional e comercial. Ciênc Saúde Coletiva. 2010;15(1):51-62.
27. Menezes EW, Giuntini EB, Lajolo FM. A questão da variabilidade e qualidade de dados de composição de alimentos. Nutrire Rev Soc Bras Aliment Nutr. 2003;26: 63-76.

Aproveitamento da farinha de casca de mandioca na elaboração de pão de forma

Utilization of cassava peel flour for preparing loaf bread

RIALA6/1406

Divina Aparecida Anunciação VILHALVA, Manoel Soares SOARES JÚNIOR, Camila Melo Araújo de MOURA, Márcio CALIARI, Thaís Anders Carvalho SOUZA, Flávio Alves da SILVA*

*Endereço para correspondência: Departamento de Engenharia de Alimentos, Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás. Campus Samambaia - Rodovia Goiânia - Nova Veneza, Km 0 - Caixa Postal 131, CEP 74690-900, Goiânia, GO, Brasil. Tel: (62) 35211613. E-mail: flaviocamp@gmail.com.

Recebido: 02.09.2011 – Aceito para publicação: 15.12.2011

RESUMO

Nas indústrias de mandioca são produzidos grandes volumes de resíduos sólidos (cascas e bagaço). A viabilidade de aproveitamento da farinha de casca de mandioca (FCM) para o consumo humano foi pesquisada, como substituto parcial da farinha de trigo (FT) na elaboração de pães de forma. Delineamento inteiramente aleatório foi utilizado, efetuando-se cinco tratamentos e quatro repetições originais. O tratamento com 7,5% de substituição de FT por FCM resultou em maior volume específico (4,78 cm³/g) entre os procedimentos com FCM. A luminosidade (L*) variou de 64,92 a 11,54 e a cromaticidade (a*) entre 0,78 e 7,58, com escurecimento do miolo com o aumento do nível de substituição de FT por FCM. Todos os tratamentos apresentaram teores mais elevados de fibras e mais baixos de carboidratos do que o pão controle. A aceitação dos pães de forma com diferentes taxas de substituição de FT por FCM foi satisfatória e todos os atributos avaliados receberam escores médios acima de 6,72. Os pães com até 15% de substituição de FT por FCM não diferiram do tratamento controle quanto ao aroma, textura e sabor, que fortalecem a constituição de uma alternativa viável de inclusão de um produto contendo alto teor de fibras no mercado.

Palavras-chave. *Manihot esculenta* Crantz, resíduo, desenvolvimento de produto, pão de forma.

ABSTRACT

In cassava starch industry large amounts of solid residue (peel and meal) are produced. In this context, this study was conducted to assess the feasibility in using cassava peel flour (CPF) for human consumption, as a partial substitute for wheat flour (WF) for preparing loaves. Completely randomized design was used, with five treatments and four original replicates. The treatment using 7.5% substitution of WF for CPF resulted on highest specific volume of loaf (4.78 cm³/g) among the treatments with CPF. Brightness feature ranged from 64.92 to 11.54, and chromaticity from 0.78 and 7.58, indicated by the bread interior part darkening proportionally to the increase of the substitution degree of WF for CPF. All tested treatments showed higher fiber and lower carbohydrate contents than the control loaf bread. The acceptance of the loaves containing different rate of WF substitution for CPF was satisfactory, achieving an average score above 6.72 in all the attributes evaluated. The loaves prepared with up to 15% substitution of WF for CPF did not show any difference from the control treatment in relation to aroma, texture and flavor, which indicate that it can be a viable alternative to introduce a high-fiber product in the market.

Keywords. *Manihot esculenta* Crantz, waste, product development, loaf bread.

INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma das culturas mais difundidas no Brasil, sendo cultivada em todas as regiões do país. A importância econômica da cultura da mandioca deriva do interesse em suas raízes ricas em amido, utilizadas na alimentação humana e animal, de seu uso na fabricação de produtos alimentícios (féculas e farinhas de vários tipos) e de outros ramos industriais (têxtil, mineração, químico etc). Além de servir de matéria-prima para inúmeros produtos, contribui para geração de emprego e de renda^{1,2}. Devido ao seu alto valor energético, desempenha um importante papel no regime nutricional, especialmente entre as classes mais populares³.

Estima-se que no Brasil aproximadamente 83% das raízes de mandioca são destinadas à produção de farinha e de fécula⁴. As indústrias processadoras de mandioca geram grandes quantidades de resíduos. Dentre esses, destacam-se os sólidos, como as cascas (periderme e entrecasca) e a massa fibrosa ou bagaço (córtex e parênquima de armazenamento de amido). Os restos culturais, resíduos ou subprodutos industriais gerados da extração da fécula ou da farinha, podem se tornar contaminantes ambientais se não houver tratamento adequado⁵.

Várias alternativas vêm sendo propostas para a utilização da casca e do bagaço de mandioca, visando diminuir a poluição ambiental causada pelos mesmos, quando lançados no solo ou nos cursos d'água. Segundo Cereda⁶, esses resíduos, além de possuírem alto teor de amido, são fontes de fibras alimentares de boa qualidade. Desse modo, tem havido grande interesse em aplicações para produção de ração animal^{7,8}. Quando utilizados na elaboração de alimentos animais, as cascas e o bagaço de mandioca podem apresentar vantagem em relação às matérias-primas tradicionais, pois, sendo produtos de descarte agroindustrial, possuem baixo custo. Além dessa finalidade, esses também têm sido utilizados na produção de álcool, fertilizantes e outros derivados⁹⁻¹².

Entretanto, existem algumas limitações para a utilização das cascas e do bagaço de mandioca. O principal problema é o elevado teor de umidade, que tornam estes produtos rapidamente fermentescíveis por micro-organismos oriundos do solo. Assim, para diminuir este risco, é necessário processá-los imediatamente após sua obtenção. Uma alternativa para processamento desses resíduos é a secagem artificial, utilizando os mesmos equipamentos envolvidos na secagem da fécula, que pode reduzir o teor de umidade inicial de aproximadamente

90% para 14%, o que os tornaria estáveis durante o armazenamento à temperatura ambiente.

A crescente preocupação com os impactos ambientais e o elevado índice de desperdício, decorrente da atividade de indústrias de alimentos têm levado as agroindústrias à busca por alternativas viáveis de aproveitamento de seus resíduos para geração de novos produtos, sendo assim, essa pesquisa teve como objetivo verificar a viabilidade do aproveitamento da farinha de casca de mandioca (FCM) para o consumo humano na elaboração de pães de forma, como substituto parcial da farinha de trigo (FT), em relação aos aspectos tecnológicos, nutricionais e microbiológicos.

MATERIAL E MÉTODOS

As cascas de mandioca (CM) da cultivar IAPAR-12 foram doadas pela FEBELA - Fecularia de Bela Vista Ltda., situada no município de Bela Vista de Goiás-GO.

A farinha de casca de mandioca (FCM) foi processada por meio das seguintes operações: coleta, transporte, secagem e moagem das cascas de mandioca e embalagem. Na fecularia, as cascas foram coletadas diretamente na saída do equipamento de transporte de cascas. A secagem foi realizada com temperatura do ar de 60 °C por 48h, ou até as cascas atingirem teor de umidade ao redor de 14% (base úmida). Utilizou-se secador convectivo de bandejas (dimensões do secador: 1,90 m de altura por 0,80 m de largura; capacidade de 5 bandejas metálicas de 55 x 57 cm cada). O produto seco foi moído em moinho de facas, com peneira de 0,5 mm. Em seguida a FCM obtida foi embalada em sacos de polietileno de baixa densidade (PEBD) e armazenada em freezer horizontal, na temperatura de -10 °C, até a realização das análises físicas e químicas da farinha e elaboração dos pães de forma.

A análise microbiológica foi realizada em três etapas (a cada 30 dias). Foram coletadas três amostras de cascas de mandioca, em três diferentes locais da linha de produção (no transportador de cascas, na saída da área de lavagem e no descascamento). As amostras de CM foram embaladas em sacos de PEBD estéreis e colocadas em caixa isotérmica com gelo mineral para o transporte, que durou aproximadamente 40 minutos, entre a indústria e o Laboratório de Análises Microbiológicas de Alimentos, onde foram realizadas contagens de bolores e leveduras, coliformes totais e termotolerantes, *Bacillus cereus*, além de análise para detecção de *Salmonella*, de acordo com os métodos recomendados pela

Tabela 1. Ingredientes utilizados na formulação de pães de forma elaborados com diferentes níveis de substituição de farinha de trigo (FT) por farinha de casca de mandioca (FCM)

Ingredientes (g)	Nível de substituição de FT por FCM (%)				
	0**	7,5	15	22,5	30
Farinha de trigo especial (Nita)	1000	925	850	775	700
FCM	0	75	150	225	300
Margarina com sal (Delícia)	40	40	40	40	40
Melhorador (Hax-pão)	20	20	20	20	20
Leite em pó integral (Ninho)	20	20	20	20	20
Sal	20	20	20	20	20
Fermento biológico seco (Fermais)	20	20	20	20	20
Açúcar cristal (Cristal)	50	50	50	50	50
Ovos	60	60	60	60	60
Água*	500	550	600	650	700

*A água foi adicionada em quantidade suficiente para a massa obter o ponto de véu

** 100% de farinha de trigo

American Public Health Association¹³. Também foram realizadas as mesmas análises microbiológicas na FCM. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Para estudo das características físicas e químicas dos pães de forma, foi utilizado delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos: 0% (controle); 7,5%; 15%; 22,5%; e 30% de substituição de farinha de trigo (FT) por FCM; e quatro repetições originais. Os ingredientes utilizados nas cinco formulações de pães de forma são apresentados na Tabela 1.

A mistura e o amassamento dos pães foram feitas em masseira rápida (Venâncio, ARV 15", Brasil). Primeiramente, foram misturados durante 5 minutos os ingredientes secos (FT, FCM, fermento, açúcar, melhorador, sal e leite em pó), em seguida foram acrescentados os demais ingredientes (margarina, ovos e água). Para a água, utilizou-se metade do seu volume na forma líquida a temperatura ambiente e a outra metade na forma de gelo, para impedir o aquecimento e a fermentação prematura da massa durante o processamento. Após a inclusão de todos os ingredientes, a massa foi misturada por 10 minutos, até que ficasse homogênea e atingisse o "ponto de véu". Retirada da masseira, a massa foi pesada, dividida em porções de 720 g e submetidas ao processo de cilindragem e modelagem manual. Em seguida, as massas modeladas foram deixadas em repouso por 60 minutos nas formas de folha de flandres (30cm x 10cm x 10cm), dentro da câmara de fermentação com temperatura de 30 °C. Após o crescimento, os pães foram submetidos ao processo de

forneamento a 180 °C, durante 15 minutos em forno da marca Venâncio, modelo Ciclone Digital, Brasil.

Três amostras de cada repetição de cada tratamento foram avaliadas quanto aos parâmetros instrumentais, da cor do miolo. Utilizou-se colorímetro (HunterLab, ColorQuest II, USA) conectado a um computador provido do *software* Universal, A 60-10005-654, versão 1.7. Os parâmetros instrumentais de cor do miolo medidos foram L*, que representa a luminosidade numa escala de 0 (preto) a 100 (branco), os de croma a* do verde (-60) ao vermelho (+60) e os de croma b* do azul (-60) ao amarelo (+60). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

O volume específico dos pães de forma foi determinado pelo método de deslocamento de sementes de painço (massa ocupada) e medido o seu volume em proveta graduada. O volume específico (mL.g⁻¹) foi calculado conforme descrito por Soares Júnior et al.¹⁴. A análise foi realizada em 20 replicatas.

O pH e o teor de umidade das cascas *in natura*, e os teores de umidade, cinzas, proteínas, lipídios e fibra alimentar total, solúvel e insolúvel da FCM e dos pães de forma experimentais foram determinados em triplicata, de acordo com as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz¹⁵. Os carboidratos foram estimados por diferença. O valor energético total foi estimado seguindo os valores de conversão de Atwater¹⁶.

O teste de aceitação dos pães de forma experimentais foi realizado no Laboratório de Análise Sensorial, equipado com cabines individuais, com cinquenta provadores.

Foi utilizado delineamento de blocos casualizados para a análise sensorial, sendo cada provador considerado um bloco. Os pães de forma utilizados na análise sensorial tinham dois dias de fabricação em média. As amostras foram servidas em pratos brancos de forma monádica sequencial, sendo codificadas com números de três dígitos aleatorizados. Para avaliar a aceitação do produto, foi utilizada uma ficha de avaliação com escala hedônica estruturada de 9 pontos (1 = desgostei extremamente; 5 = nem gostei/nem desgostei; 9 = gostei extremamente), onde cada provador avaliou as amostras de acordo com atributos de aparência, aroma, textura e sabor, anotando quanto gostou ou desgostou dos pães¹⁷.

Os dados físicos e químicos obtidos foram avaliados por meio de análise de modelos e gráficos de regressão, enquanto que os dados sensoriais foram comparados pelo teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o *software Statistica*, versão 2007.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras de cascas de mandioca *in natura* apresentaram 73,9% de umidade e pH igual a 4,28, valores próximos aos encontrados por Cereda⁶ para umidade (72,32%) e Leonel e Cereda¹² para pH (4,56). No entanto, segundo Cereda⁹, podem ocorrer variações nas características físicas e químicas devido a vários fatores, tais como nível tecnológico da indústria, qualidade da mão de obra, metodologia de análise, assim como à genética da mandioca.

Tanto nas amostras de cascas de mandioca (CM) *in natura* quanto nas amostras de farinha de cascas de mandioca (FCM) avaliadas não foram detectadas *Salmonella* sp., *Bacillus cereus*, *Clostridium* sp. e coliformes termotolerantes. Estes resultados são representativos para a utilização deste resíduo na alimentação humana, uma vez que esses micro-organismos conferem grande risco à saúde humana, na forma de infecções, intoxicações e toxinfecções alimentares. Foram encontrados coliformes totais ($8,6 \times 10^4$ UFC.g⁻¹) e fungos ($3,7 \times 10^4$ UFC.g⁻¹) nas amostras de cascas de mandioca *in natura*. Entretanto, estes micro-organismos não foram detectados nas amostras de FCM. A presença de coliformes totais é considerada indicadora de condições de higiene insatisfatórias na produção e/ou manipulação do alimento¹⁸. Bolores e leveduras podem ser explicados, em parte, pelo fato de que no sistema de produção, uma das principais fontes de contaminação é o solo¹⁹. Entretanto, a secagem também foi eficiente para a eliminação destes micro-organismos.

O teor de umidade da FCM (Tabela 2) encontrou-se dentro do valor máximo estipulado para

farinhas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa)²⁰, que é de até 14%. Em farinhas com valores acima de 15% há a possibilidade de desenvolvimento de micro-organismos, principalmente fungos²¹. Ainda com relação às características físico-químicas da farinha de casca de mandioca, merecem destaques os elevados valores de fibras, deste total, 96,4% de fibra alimentar insolúvel e 3,6% de fibra alimentar solúvel.

Isso demonstra que os resíduos da mandioca representam excelente fonte de fibras alimentares, podendo ser utilizados como ingredientes de produtos alimentícios, a fim de enriquecê-los com fibras. Vários resíduos agroindustriais são desprezados pelas indústrias, principalmente aqueles provenientes de frutas, leguminosas, hortaliças e tubérculos, no entanto esses poderiam ter diferentes utilidades, como fonte alternativa de nutrientes e fibras alimentares, bem como para elaboração de novos produtos²²⁻²⁵.

Os valores observados dos parâmetros instrumentais de cor da FCM (Tabela 2) foram próximos aos valores encontrados para farinha de trigo integral por Fernandes et al.²¹, cujos os valores para L* e a* foram 68,69 e 3,97, respectivamente. De acordo com esses valores, a farinha de casca de mandioca pode ser considerada mais escura que a farinha de trigo refinada, que pode ser considerada branca quando L* é maior que 93, a* é próximo de zero e b* menor que 926, e mais próxima da cor de farinha de trigo integral.

De acordo com a análise estatística, com exceção do modelo de regressão para lipídios, os demais modelos estudados foram significativos (P<0,05). Os efeitos lineares e quadráticos foram significativos para todos (P<0,05), com exceção dos modelos para cinzas e valor energético total, que somente apresentaram efeito linear significativo (P<0,05). Em relação ao volume específico, verificou-se que quanto maior a substituição de FT por FCM, menor o volume específico do pão de forma até 22,5% de substituição, com 30% de substituição houve um ligeiro aumento do volume específico (Figura 1).

Os pães de forma elaborados com diferentes níveis de substituição de farinha de trigo por farinha de casca de mandioca podem ser visualizados na Figura 2. Segundo Oliveira et al.²⁷, no caso de pães, a adição de fibras na formulação pode promover redução do volume, devido ao aumento da absorção de água e menor tolerância à fermentação. As fibras, por sua conformação estrutural alongada, podem ser negativas em relação ao aprisionamento pela massa dos gases obtidos

Tabela 2. Composição química e parâmetros de cor da farinha de cascas de mandioca (FCM) e da farinha de trigo (FT)

Componente	FCM	FT ⁵
Umidade ¹	9,6±0,52	-
Cinzas ¹	3,48±0,18	-
Proteínas ¹	4,04±0,07	9,8
Lipídeos ¹	0,54±0,08	1,4
FAI ^{1,2}	48,66±0,47	-
FAS ^{1,3}	1,83±0,05	-
FAT ^{1,4}	50,49±0,47	3,2
Carboidratos ¹	31,85±0,70	72
L*	64,54±0,29	-
a*	4,51±0,08	-
b*	12,43±0,37	-

¹g.(100 g)⁻¹; ²Fibra alimentar insolúvel; ³Fibra alimentar solúvel; ⁴Fibra alimentar total; ⁵Informação nutricional de acordo com o fabricante

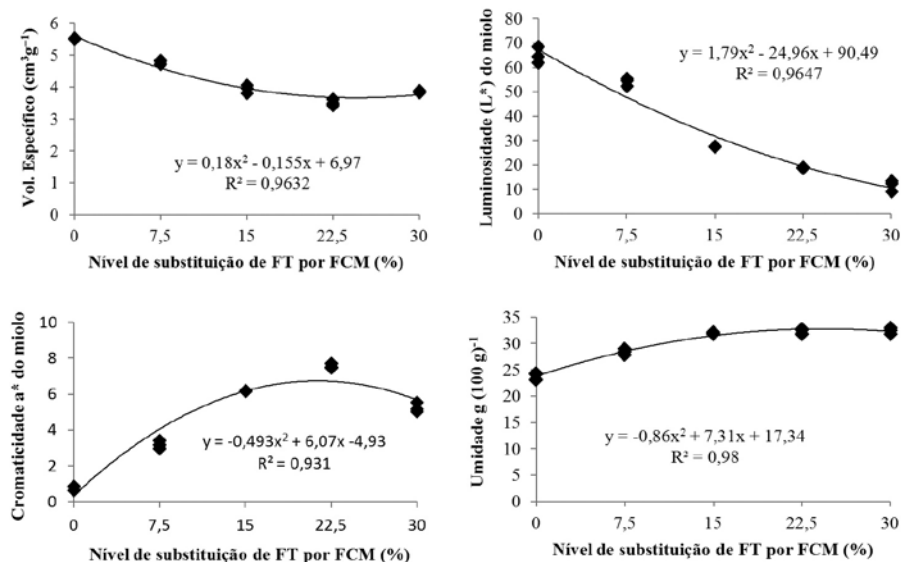


Figura 1. Volume específico (VE), parâmetros de cor do miolo (L^* e a^*) e umidade dos pães de forma com diferentes níveis de substituição de farinha de trigo (FT) por farinha de casca de mandioca (FCM)

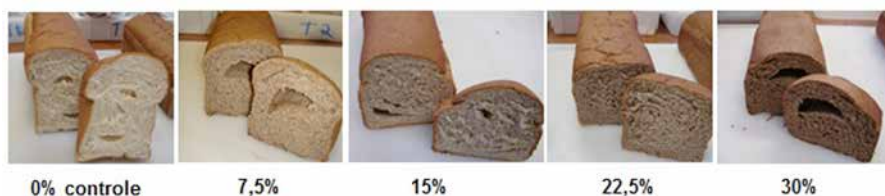


Figura 2. Vista frontal dos pães de forma (corte transversal) com diferentes níveis de substituição de farinha de trigo por farinha de cascas de mandioca

durante a fermentação, responsáveis pelo aumento do volume do pão. Assim, as fibras podem atuar como elementos perfuradores das bolhas de CO_2 , que tendem a se coalescer, formando grandes bolhas de gás na massa (defeito), que podem ser visualizadas na Figura 2. Este problema talvez possa ser resolvido com a utilização de emulsificantes, que atuam na estabilização da interface entre os gases e a massa.

Os valores obtidos para os parâmetros de cor L^* do miolo dos pães com substituição de FT por FCM foram decrescentes, indicando que à medida que aumentou a concentração de FCM houve escurecimento da cor do miolo dos pães (Figura 1).

Em relação à coordenada de cromaticidade a^* , ocorreu diminuição em relação ao tratamento controle para o tratamento com 22,5% de substituição de FT por FCM (Figura 1), indicando que o pão com FCM possui mais pigmentos vermelhos, além de maior teor de cinzas e fibra alimentar, típico em produtos integrais.

Os teores de lipídeos apresentados nos diferentes tratamentos com nível de substituição de FT por FCM (%) foram respectivamente: 0%=7,37,3±0,33 g.(100 g)⁻¹; 7,5%=8,9±0,46 g.(100 g)⁻¹; 15%=5,4±0,36 g.(100 g)⁻¹; 22,5%=9,1±0,29 g.(100 g)⁻¹; 30%=6,2±0,074 g.(100 g)⁻¹.

A umidade, as cinzas, a fibra alimentar insolúvel e total aumentaram, enquanto a proteína diminuiu gradualmente com a substituição da FT por FCM (Figuras 1 e 3). Ocorreram variações nos teores de fibra alimentar solúvel, carboidratos e no volume específico (VET), sendo que o tratamento com 15% de substituição apresentou o menor teor de lipídios, o tratamento com 22,5% apresentou o menor teor de carboidratos e o tratamento com 30% apresentou os menores teores de fibra alimentar solúvel e de VET.

De acordo com a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos da USP²⁸, o pão de forma integral clássico possui 39,50 g.(100 g)⁻¹ de umidade, 11,16 g.(100 g)⁻¹ de proteína, 1,45 g.(100 g)⁻¹ de lipídios, 45,62 g.(100 g)⁻¹ de

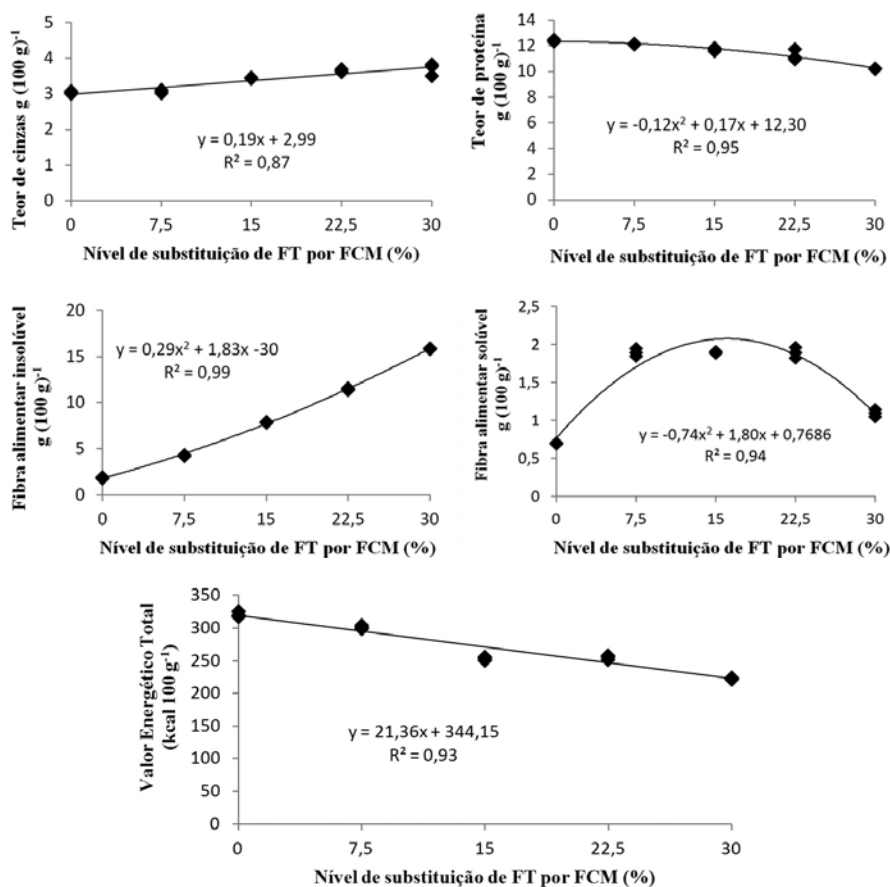


Figura 3. Composição centesimal dos pães de forma com diferentes níveis de substituição de farinha de trigo (FT) por farinha de casca de mandioca (FCM)

carboidratos, 2,27 g.(100 g)⁻¹ de cinzas e 4,46 g.(100 g)⁻¹ de fibra alimentar. Neste estudo, todos os tratamentos com adição de FCM obtiveram médias menores de umidade e carboidratos, e valores maiores de fibras, cinzas e proteínas, com exceção do último tratamento, que apresentou teor de 10,22 g.(100 g)⁻¹ (Figuras 1 e 3).

Ainda com relação à composição centesimal encontrada para os pães de forma desenvolvidos neste estudo, vale destacar os valores elevados de fibras nos pães com FCM. Segundo a Anvisa, por meio da Portaria nº 27 de 13/01/1998, para considerar o alimento fonte de fibras alimentares, o mesmo deve conter no mínimo 3% dessas fibras e o alimento com alto teor de fibras, no mínimo 6%²⁰. Baseando-se nestes valores e nos teores de fibra alimentar total das quatro formulações de pães com FCM apresentados no presente estudo, pode-se dizer que este produto é um alimento com alto teor de fibras.

Já foram relatados vários estudos que relacionam o papel da fibra alimentar com a prevenção de várias doenças

como diverticulite, câncer de cólon, obesidade, problemas cardiovasculares e diabetes²⁹⁻³². Isso tem levado as indústrias de alimentos buscarem cada vez mais produtos que atendam as novas exigências nutricionais dos consumidores. O pão é um dos alimentos mais consumidos no país³³ e representa uma das fundamentais fontes calóricas da dieta dos brasileiros³⁴, por isso, vem se tornando um dos principais alvos de estudos de enriquecimento funcional^{27,35-37}.

Não foi quantificado o teor de ácido cianídrico dos pães e farinhas. Entretanto, o teor de ácido cianídrico não representa problema, uma vez que o processo de secagem ao qual a farinha foi submetida pode eliminar, por volatilização, este componente tóxico. Segundo Gomez e Valdivieso³⁸ a secagem das folhas de mandioca a 60 °C foi suficiente para eliminar 68 a 76% do ácido cianídrico, enquanto que Helbig et al.³⁹ relataram que a secagem a 100 °C por 15 min eliminou totalmente o composto tóxico das folhas de mandioca, o que permitiu o uso da farinha das folhas em multimisturas para uso na alimentação

humana. Neste estudo, além da secagem a 60 °C por 48 h, a farinha de casca de mandioca foi utilizada na elaboração de pães, que sofreram forneamento a 180 °C por 15 min, o que provavelmente eliminou algum resíduo de ácido cianídrico que tenha sobrado da secagem. Para utilização da farinha crua em multimisturas, recomenda-se uma secagem em maiores temperaturas e a verificação do teor de ácido cianídrico.

O pão é apreciado tanto na forma de lanche ou como acompanhamento nas refeições³³. Assim, torna-se necessário o conhecimento das características sensoriais de um produto novo, visto que o melhoramento da qualidade de um produto representa uma oportunidade de agregar valor de mercado ao mesmo⁴⁰. Na análise sensorial dos pães, 57% dos consumidores entrevistados tinham entre 21-30 anos, 24% entre 18-30 anos, 10% entre 31-40 anos e 9% acima de 41 anos, sendo 65% do sexo feminino e 35% do sexo masculino. O percentual de consumidores entrevistados com consumo mensal de pães de forma entre 1-5 vezes foi de 33%, entre 6-10 vezes foi de 22%, e entre 11-15; 16-25 e 26-30 vezes foram de 15%.

Os escores médios para os atributos aparência, aroma, textura e sabor estão apresentados na Tabela 3, sendo considerado como escore mínimo para aceitação dos pães de forma com diferentes níveis de substituição de farinha de trigo por farinha de casca de mandioca o valor de 6. Todos os pães apresentaram aceitação satisfatória.

Todos os atributos avaliados receberam escores médios acima de 6,72, com predomínio de escores entre 7 e 8 (Tabela 3). Os pães com até 15% de substituição de farinha de trigo por farinha de casca de mandioca não diferiram significativamente ($p>0,05$) do tratamento controle em relação ao aroma, textura e sabor. Os escores médios obtidos para os pães deste trabalho foram maiores que os valores encontrados por Battochio et al.³³ para pão integral, onde obtiveram os seguintes escores médios para aparência, aroma, textura e sabor: 6,75; 6,73; 6,25 e 6,27, respectivamente.

Tabela 3. Escores médios para aparência, aroma, textura e sabor de pães de forma elaborados com diferentes níveis de substituição de farinha de trigo (FT) por farinha de casca de mandioca (FCM)

Atributo	Nível de substituição de FT por FCM (%)				
	0 (controle)*	7,5	15	22,5	30
Aparência	8,14 ^A	8,06 ^{AB}	7,44 ^{BC}	7,36 ^C	7,08 ^C
Aroma	8,12 ^A	7,88 ^{AB}	7,62 ^{ABC}	7,30 ^{BC}	7,06 ^C
Textura	7,96 ^A	8,00 ^A	7,62 ^{AB}	7,66 ^{AB}	7,06 ^B
Sabor	8,12 ^A	7,86 ^{AB}	7,52 ^{ABC}	7,16 ^{BC}	6,72 ^C

*100% de farinha de trigo

A maioria dos provadores compraria o produto consumido, sendo a maior rejeição (19%) para a última amostra com 30% de substituição de farinha de trigo por farinha de casca de mandioca.

CONCLUSÃO

As amostras de cascas de mandioca *in natura* e as amostras de farinha de cascas de mandioca (FCM) avaliadas não apresentaram *Salmonella* sp., *Bacillus cereus*, *Clostridium* sp e coliformes termotolerantes, indicando a possibilidade da utilização deste resíduo na alimentação humana. Foram encontrados coliformes totais, bolores e leveduras nas amostras de cascas de mandioca *in natura*, mas estes micro-organismos não foram detectados nas amostras de farinha de casca de mandioca, indicando a eficiência do processo de secagem sobre estes agentes.

A concentração de farinha de casca de mandioca influenciou o crescimento da massa dos pães, bem como a coloração dos mesmos. Ou seja, à medida que se aumentou a concentração de FCM em substituição a FT, os pães apresentaram menor volume e miolo mais escuro. Os pães com farinha de casca de mandioca obtiveram teores elevados de fibra alimentar insolúvel e foram aceitos sensorialmente. Pães com até 15% de substituição de farinha de trigo por farinha de casca de mandioca podem ser uma alternativa viável de inclusão de um produto fonte de fibras no mercado consumidor.

REFERÊNCIAS

- Dósea RR, Marcellini OS, Santos, AA, Ramos ALD, Lima AS. Qualidade microbiológica na obtenção de farinha e fécula de mandioca em unidades tradicionais e modelo. *Ciênc Rural*. 2010;40(2):441-6.
- Marques JA, Prado IN, Zeoula LM, Alcalde CR, Nascimento WG. Avaliação da mandioca e seus resíduos industriais em substituição ao milho no desempenho de novilhas confinadas. *Rev Bras Zootec*. 2000;29(5):1528-36.
- Carvalho PCL, Fukuda WMG, Cruz PJ, Costa JA. Avaliação agrônômica e tecnológica de cultivares de mandioca para consumo "in natura". *Rev Bras Mand*. 1995;14 (1-2):7-15.
- Embrapa Mandioca e Fruticultura – Embrapa Cnpmf. Perguntas e respostas: mandioca. [acesso 2011 Ago 25]. Disponível em: [http://www.cnpmf.embrapa.br/index.php?p=perguntas_e_respostas-mandioca.php#processamento].
- Souza LS, Fialho JF. Cultivo da Mandioca para a Região do Cerrado. Embrapa Mandioca e Fruticultura, sistemas de produção. 2003. [acesso 2010 Nov 11]. Disponível em: [http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/].

6. Cereda MP. Caracterização, usos e tratamentos de resíduos da industrialização da mandioca. Botucatu: Centro de Raízes Tropicais; 1996.
7. Dias AM, Silva FF, Veloso CM, Ítavo LCV, Pires AJV, Damasceno JC et al. Digestibilidade dos nutrientes do bagaço de mandioca em dietas de novilhas leiteiras. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2008;60(4):996-1003.
8. Ferreira JJ, Neto JM, Miranda ES. Efeito do milho, sorgo e raspa de mandioca na ração sobre o desempenho de novilhos confinados. *Rev Bras Zootec*. 1989;18:306-13.
9. Cereda MP. Caracterização dos resíduos da industrialização da mandioca. *In: Resíduos da industrialização da mandioca no Brasil*. São Paulo: Paulicéia; 1994. p. 11-50.
10. Raupp DS, Moreira SS, Banzatto A, Sgarbieri VC. Composição e propriedades fisiológico-nutritivas de uma farinha rica em fibra insolúvel obtida do resíduo fibroso de fecularia de mandioca. *Cienc Tecnol Aliment*. 1999;19(2):205-10.
11. Leonel M, Cereda MP, Roau X. Aproveitamento do resíduo da produção de etanol a partir de farelo de mandioca, como fonte de fibras dietéticas. *Cienc Tecnol Aliment*. 1999;19(2):241-5.
12. Leonel M, Cereda MP. Avaliação da concentração de pectinase no processo de hidrólise sacarificação do farelo de mandioca para obtenção de etanol. *Cienc Tecnol Aliment*. 2000;20(2):220-7.
13. American Public Health Association. Compendium of methods for microbiological examination of foods. 4^o ed. Washington: Downes FP, Ito K; 2001.
14. Soares Júnior MS, Moreira WO, Caliaro M, Vera R. Otimização da formulação de pães de forma preparados com diferentes proporções de farinha de trigo, fécula de mandioca e okara. *Bol CEPPA*. 2006;24(1):221-48.
15. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo-Brasil). Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 4^a ed. Brasília (DF): ANVISA; 2005.
16. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Aprova regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional. [acesso 2008 Jun 26]. Disponível em: [<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=9059>2008>].
17. Stone H, Sidel J. Sensory evaluation practices. New York: Academic Press; 1993.
18. Kostinek M, Specht I, Edward VA, Pinto C, Egounlety M, Sossa C et al. Characterization and biochemical properties of predominant lactic acid bacteria from fermenting cassava for selection as starter cultures. *Int J Food Microb*. 2007;114(3): 342-52.
19. Lund DG, Zaicovski CB, Prieto LM, Conceição RCS, Aleixo JAG, Rombaldi CV. Qualidade microbiana e aspecto visual da mandioca minimamente processada. *Acta Sci Biol Sci*. 2007;29(2):213-6.
20. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 27 de 13 de janeiro de 1998. Regulamento Técnico Referente à Informação Nutricional Complementar. [acesso 2010 Dez 01]. Disponível em: [<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/legis>].
21. Fernandes AF, Pereira J, Germani R, Oiano-Neto J. Efeito da substituição parcial da farinha de trigo por farinha de casca de batata (*Solanum Tuberosum* Lineu). *Cienc Tecnol Aliment*. 2008;28(Supl.):56-65.
22. Silvestre-Marinho M, Jokl L. Composição química de resíduos fibrosos de algumas plantas brasileiras. *Rev Farm Bioquim*. 1983;5(1):45-54.
23. Leonel M, Cereda MP, Roau X. Cassava bagasse as dietary product. *Trop Sci*. 1998;38:224-8.
24. Cantúaria CM, Ribeiro SCA, Ribeiro CFA, Park KJ, Araújo EAF. Perfil sensorial de pães de forma enriquecidos com Okara. *Rev Bras Prod Agroind*. 2008;10(2):111-20.
25. Coelho LM, Wosiacki G. Avaliação sensorial de produtos panificados com adição de farinha de bagaço de maçã. *Cienc Tecnol Aliment*. 2010;30(3):582-8.
26. Gewehr MF. Desenvolvimento de pão de forma com adição de quinoa [dissertação de mestrado]. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2010.
27. Oliveira TM, Pirozi MR, Borges JTS. Elaboração de pão de sal utilizando farinha mista de trigo e linhaça. *Alim Nutr*. 2007;18(2):141-50.
28. Tabela Brasileira de composição de alimentos. Projeto Integrado de Composição de Alimentos - TBCA-USP. 2008. [acesso 2011 Mai 29]. Disponível em: [<http://www.fcf.usp.br/tabela/>].
29. Mattos LL, Martins IS. Consumo de fibras alimentares em população adulta. *Rev Saúde Pública*. 2000;34(1):50-5.
30. Botelho L, Conceição A, Carvalho VD. Caracterização de fibras alimentares de casca e cilindro central do abacaxi 'Smooth cayenne'. *Cienc Agrotec*. 2002;26(2):362-7.
31. Anjo DFC. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. *J Nasc Br*. 2004;3(2):145-54.
32. Moraes FP, Colla LM. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e Benefícios à saúde. *Rev Eletr Farm*. 2006;3(2):99-112.
33. Battochio JR, Cardoso JMP, Kikuchi M, Macchione M, Modolo JS, Paixão AL et al. Perfil sensorial de pão de forma integral. *Cienc Tecnol Aliment*. 2006;26(2):428-33.
34. Oliveira TM, Pirozi MR, Borges JTS. Elaboração de pão de sal utilizando farinha mista de trigo e linhaça. *Alim Nutr*. 2007;18(2):141-50.
35. Vasconcelos AC, Pontes DF, Garruti DS, Silva APV. Processamento e aceitabilidade de pães de forma a partir de ingredientes funcionais: farinha de soja e fibra alimentar. *Alim Nutr*. 2006;17(1):43-9.
36. Gutkoski LC, Klein B, Kaster B, Gonçalves FT, Lamaison FC, Spier F et al. Armazenamento da farinha de trigo enriquecida com ferro e ácido fólico e seu efeito na produção de pão de forma. *Alim Nutr*. 2007;18(1):93-100.
37. Rocha LS, Cardoso-Santiago RA. Implicações nutricionais e sensoriais da polpa e casca de baru (*Dipterix alata* Vog.) na elaboração de pães. *Cienc Tecnol Aliment*. 2009;29(4):820-5.
38. Gómez G, Valdivieso M. Cassava foliage: chemical composition, cyanide content and effect of drying on cyanide elimination. *J Sci Food Agric*. 1985;36(6):433-9.
39. Helbig E, Buchweitz MRD, Gigante DP. Análise dos teores de ácidos cianídrico e fítico em suplemento alimentar: multimistura. *Rev Nutr*. 2008;21(3):323-8.
40. Wrigley CW. Developing better strategies to improve grain quality for wheat. *Aust J Agric Res*. 1994;45:1-17.

Avaliação química, física e sensorial de conserva de anchoita (*Engraulis anchoita*) em molho com tomate

Chemical, physical and sensorial characteristics of canned *anchovy* (*Engraulis anchoita*) preserved in tomato sauce

RIALA6/1407

Janise Pedroso COLEMBERGUE*, Nádia CARBONERA, Milton Luiz Pinho ESPIRITO SANTO

*Endereço para correspondência: ¹Laboratório de Controle de Qualidade de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande/FURG. Rua Eng. Alfredo Huch, 475 - Pavilhão 3 - Caixa Postal 474 - CEP: 96.201-900, Rio Grande - RS - Brasil. Telefone: (53) 3233-8750 - Fax: (53) 3233-8745. E-mail: jcolembergue@hotmail.com
Recebido: 25/04/2011 - Aceito para publicação: 26/12/2011

RESUMO

Os objetivos do presente estudo foram avaliar o enlatamento da anchoita, a característica química do produto e determinar a qualidade e a aceitabilidade da conserva em molho com tomate. O pescado selecionado, a anchoita, foi capturado na costa sul do Rio Grande do Sul, o molho de cobertura foi o concentrado de tomate e as latas utilizadas, de folhas de flandres. As amostras foram analisadas quanto à composição proximal, prova de Kreiss, valor energético, teste de esterilidade comercial, rendimento do conteúdo da conserva e teste de aceitação por escala hedônica. Os teores de umidade, proteínas, lipídeos e cinzas foram respectivamente de 74,2%, 19,3%, 3,8% e 2,3%, sendo que um dos três lotes analisados apresentou resultado positivo na prova de Kreiss. A conserva de anchoita apresentou valor energético de 112,7 kcal/100 g. No teste de esterilidade comercial, todos os lotes estavam em conformidade com a legislação. Na avaliação de rendimento e da característica sensorial, a conserva apresentou mais de 50% de conteúdo sólido em relação ao total e o índice de aceitabilidade foi de 89,9%. As amostras de conserva avaliadas neste estudo estavam de acordo com a legislação vigente e, em relação ao seu consumo, o produto foi bem aceito pelos 51 julgadores.

Palavras-chave. alimentos em conserva, composição de alimentos, controle de qualidade, aceitabilidade.

ABSTRACT

This study was conducted to evaluate the canning process of *anchovy* (*Engraulis anchoita*), the chemical and quality features and the acceptability of canned anchovy preserved in tomato sauce. The analyzed product was the *anchovy* caught in the south coast of the Rio Grande do Sul, preserved in concentrated tomato sauce and canned in tinplate cans. The analyses were performed by determining the proximal composition, Kreiss test, energetic value, commercial sterility test, yield of canned contents, and the acceptance testing by hedonic scale. The moisture, protein, fat, and ash contents were 74.2%, 19.3%, 3.8%, 2.3%, respectively, and one of the three analyzed lots showed positive Kreiss test. The energetic value of the anchoita was 112.7 kcal/100 g. In the commercial sterility test, all of the product lots were in compliance with the legislation. In the evaluation of yields and sensory quality, the canned fish showed more than 50% of solid contents in relation to the total amount and the acceptability rate was of 89.9%, respectively. The samples evaluated in this study have showed that the canned fish are in accordance with the legislation in force, and its consumption was well accepted by 51 tasters.

Keywords. preserved food, food composition, quality control, acceptability.

INTRODUÇÃO

O pescado é visto como um dos alimentos mais completos, por possuir alto valor nutritivo e digestibilidade facilitada, sendo o seu consumo indicado para toda população, sem restrições de faixa etária. Além disso, é considerado um alimento acessível às populações de baixa renda, pois podem ser cultivados em águas marinhas ou interioranas com facilidade¹.

A produção de pescado no Brasil aumentou 25% nos últimos oito anos até o ano de 2009. Este aumento passou de 990.899 para 1.240.813 de toneladas por ano em 2009. Somente entre 2008 e 2009, houve um crescimento de 15,7%, conforme dados estatísticos divulgados pelo Ministério da Pesca e Aquicultura, sendo que a produção da pesca extrativa, tanto marítima quanto continental passou de 783.176 toneladas para 825.164 toneladas por ano no mesmo período, um aumento em torno de 5,4%. Das regiões brasileiras, o Sul apresenta a segunda maior produção de pescado, com 316 mil toneladas ao ano, ficando atrás apenas do Nordeste, que apresenta produção anual estimada em 411 mil toneladas ao ano².

A conserva é um gênero alimentício que sofre tratamento térmico, capaz de reduzir a microbiota e de inativar enzimas do alimento, deve estar acondicionado em recipiente estanque à água, ao ar e aos micro-organismos, de modo a assegurar a estabilidade do alimento em condições normais de armazenamento durante o período de validade estabelecido³.

Conserva de peixe, de acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Conserva de Peixes, trata-se de um alimento elaborado a partir de matéria-prima fresca ou congelada, descabeçada, eviscerada (excluindo gônadas e rins) e sem nadadeira caudal, acrescido de meio de cobertura. Deve ser acondicionado em um recipiente hermeticamente fechado e que tenha sido submetido a um tratamento térmico que garanta sua esterilidade comercial⁴.

De acordo com Ogawa e Maia⁵, o principal objetivo da produção de pescado enlatado consiste na elaboração de um produto de boa qualidade e que possa ser armazenado durante um período de tempo razoável. O conteúdo das latas deve estar ausente de enzimas e bactérias ativas e o fechamento hermético da lata deve evitar a entrada de ar, água e substâncias contaminantes. Estas são algumas das condições básicas para que o produto final possa ser conservado satisfatoriamente.

A anchoita (*Engraulis anchoita*) é uma espécie que possui uma ampla distribuição geográfica no Atlântico Sul-Occidental, abrangendo desde o Cabo Frio (Brasil) até o extremo sul do Golfo de São Jorge, na Argentina. Encontra-se dentre os peixes pelágicos que habitam o sul do Brasil, ocupando uma posição de destaque no ecossistema pelágico do Oceano Atlântico Occidental devido a sua grande abundância. O desenvolvimento de produtos com alto valor agregado seria uma alternativa para o aproveitamento desta espécie amplamente disponível e ainda inexplorada no Brasil^{6,7}.

Esta espécie recentemente vem sendo capturada na costa sul brasileira para utilização como alimento no país, porém nunca havia sido processada e utilizada como alimento no Brasil e, em um futuro próximo, terá como destino a merenda escolar. É amplamente encontrado na costa brasileira, porém pouco explorado pelas indústrias da região ou utilizada apenas no processamento de farinha de pescado. O foco inicial da produção desta espécie é a elaboração de uma conserva em molho com tomate, que tem como destino a sua inclusão na alimentação escolar de crianças pertencentes às escolas do Rio Grande do Sul. Portanto, objetivaram-se, no presente estudo, a otimização do processamento da conserva, a determinação da sua composição química, valor calórico, a estanqueidade da recravação das latas, o rendimento do conteúdo do pescado enlatado, a avaliação sensorial por meio do teste de aceitação da conserva de anchoita em molho com tomate.

MATERIAL E MÉTODOS

Elaboração da conserva de anchoita em molho com tomate

As anchoitas, após capturadas, foram transportadas em caminhões isotérmicos em caixas plásticas contendo 20 kg/cx, resfriadas a 0 °C com gelo em escamas intercalado na proporção de 30%. O pescado foi recebido e descarregado em uma indústria de processamento de pescado de Rio Grande-RS e, após o recebimento, foi lavado com água hiperclorada a 5mg/L. A seguir, realizou-se uma classificação das anchoitas por tamanho e qualidade, foram pesadas em balança de plataforma, acondicionadas em monoblocos com 20 kg com gelo em escamas e conduzidas à operação de evisceração. Realizou-se, nesta operação, o descabeçamento e a retirada das vísceras com jatos de água hiperclorada e, depois, foi transportado para a área de enlatamento. Nesta área, o pescado foi

submetido à salmouragem em solução salina a 24 °Bé durante 15 min em tanque inoxidável, sendo drenado, pesado na quantidade pré-estabelecida de 720 g/lata e acondicionado manualmente em latas redondas.

Em seguida, as latas foram submetidas ao pré-cozimento a 80 °C durante 15 min e adicionadas de molho com tomate na mesma temperatura. Após a adição do molho, as latas foram recravadas em recravadeira semiautomática e lavadas, utilizando-se água e detergente neutro a 95 °C. Logo a seguir, realizou-se a esterilização da conserva em autoclaves estacionárias industriais a 117 °C por 2 h e 10 min e, transcorrido este tempo, fez-se o choque térmico nas próprias autoclaves sob contrapressão até o produto atingir 25 °C. As latas foram retiradas das autoclaves e submetidas à secagem a temperatura ambiente a 22 °C e, depois de secas, foram acondicionadas em caixas de papelão ondulado e armazenadas em local seco e arejado. Para a execução das análises, a coleta das amostras foi efetuada logo após o processamento da anchoita e encaminhadas ao Laboratório de Controle de Qualidade de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande. Para as análises foram utilizadas 3 latas de cada lote.

Caracterização química

O teor de umidade da anchoita foi determinado em estufa a 105 °C até obtenção de peso constante, segundo o manual do Laboratório Nacional de Referência Animal – LANARA⁸.

As proteínas foram quantificadas por meio do método micro-Kjeldahl, descrito pela *Association of Official Analytical Chemists* – AOAC, que consiste na determinação da quantidade de nitrogênio total presente na amostra. Os níveis de proteínas totais foram expressos utilizando-se fator de conversão específico de 6,25⁹.

A determinação dos lipídeos totais foi realizada em extrator de Soxhlet, de acordo com a metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz, baseado na solubilidade dos lipídeos, utilizando o éter de petróleo como solvente orgânico¹⁰.

As cinzas foram avaliadas conforme método oficial descrito pelo LANARA, assim, a amostra foi carbonizada em bico de Bunsen e, em seguida, incinerada em forno mufla a 500-550 °C⁸.

Para realizar a prova de Kreiss, utilizou-se o método descrito em LANARA, que é baseado na reação do aldeído epihidrílico (formado na rancificação das

gorduras) com a floroglucina em presença de ácido clorídrico resultando num composto de condensação de coloração vermelha. Nesta análise, foram avaliados três lotes distintos em duplicata⁸.

Valor Energético (VE)

Utilizaram-se os fatores de conversão de Atwater, que correspondem a 4 kcal/g para proteína e carboidrato e 9 kcal/g para gordura, para calcular o valor energético da anchoita em conserva, de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária¹¹.

Teste de esterilidade comercial

Para alimentos de baixa acidez (pH>4,6), a análise do processo de esterilização comercial foi realizada conforme Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003, que se baseia na incubação das amostras a 36 ± 1 °C pelo período de 10 dias e a 55 ± 1 °C por 7 dias. Neste teste observa-se a possível presença de estufamento da embalagem com formação de gás, o que evidencia a possível deterioração do produto. Foram avaliados 3 lotes distintos em triplicata¹².

Pesos bruto, líquido, drenado e percentual de peixe sobre o peso líquido

Para esta avaliação, foram selecionados (aleatoriamente) e analisados em triplicata (3 latas/lote) 3 lotes de anchoita em conserva. As latas foram limpas externamente e o peso total verificado por balança semi-analítica. Em seguida foram perfuradas com o auxílio de um abridor de latas e o líquido de cobertura escorrido, mantendo-as ligeiramente inclinadas durante cinco minutos, transferindo-se o líquido para uma proveta graduada. Os conteúdos sólido e líquido foram pesados. A partir desses dados foi calculado o percentual de sólidos em relação ao peso total¹⁰.

Análise sensorial

A análise sensorial foi realizada no laboratório de Análise Sensorial da Universidade Federal do Rio Grande – Campus Cidade em ambiente laboratorial com 51 provadores não treinados, utilizando o teste da escala hedônica de sete pontos, tendo como objetivo a avaliação da aceitabilidade do produto, de acordo com o descrito por Gularte¹³. A amostra disposta aos julgadores continha 15 g do pescado e molho de cobertura e foi servida a temperatura ambiente. A Figura 1 apresenta a ficha de avaliação sensorial aplicada aos julgadores.

NOME: _____ DATA: ____/____/____
 SEXO: () M () F Faixa etária: () ≤18 anos () 19 – 25a () 26 – 34a () ≥ 35a
 Você possui o hábito de comer pescado? () Sim () Não
 Qual a maneira mais comum? () Em conserva () Assado () Cozido () Frito () Cru
 Qual a frequência? () < 1 vez/mês () 1 a 2 vezes/mês () 3 a 4 vezes/mês () > 4 vezes/mês

INSTRUÇÕES: Prove a amostra de anchoita em conserva, mastigando e ingerindo toda a porção. Marque com um "X" a sua percepção:

- (1) Desgostei muito
- (2) Desgostei
- (3) Desgostei ligeiramente
- (4) Indiferente
- (5) Gostei ligeiramente
- (6) Gostei
- (7) Gostei muito

Comentário adicional: _____
 Obrigada!

Figura 1. Ficha de avaliação sensorial utilizada na avaliação da conserva de anchoita

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os resultados das análises de composição química e valor energético da conserva de anchoita em molho com tomate.

Tarley et al.¹⁴ avaliaram 3 amostras de marcas diferentes de sardinhas (*Sardinella brasiliensis*) em molho de tomate e encontraram de 66,19 a 68,22% umidade, 2,69 a 2,94% cinzas, 21,8 a 23,8% proteínas e 5,3 a 8,86% lipídeos. Observa-se que a anchoita enlatada apresentou menor conteúdo protéico e lipídico e, desta forma, menor valor calórico, podendo ser considerada em torno de 28,3% menos calórica em relação à sardinha. Este fato pode estar relacionado ao alto teor de umidade da anchoita, onde é possível constatar que peixes que possuem maior teor de umidade apresentam menor quantidade de componentes calóricos, como lipídeos e proteínas e, assim, resultam em menor valor energético. Além disso, o valor calórico varia muito em pescado, pois está diretamente relacionado ao teor lipídico de cada espécie.

Outro produto semelhante ao estudado é a

Tabela 1. Composição química da anchoita em conserva

Parâmetros	(%)	VE* (kcal/100g)
Umidade	74,21 ± 0,12	-
Proteínas ¹	19,28 ± 0,48	77,12
Lipídeos ¹	3,79 ± 0,29	34,11
Cinzas ¹	2,35 ± 0,04	-
Carboidratos ²	0,37	1,48
Total	100	112,71kcal

* Valor energético; ¹ Valor expresso em base úmida; ² Calculado por diferença.

conserva de bonito de barriga listrada (*Euthynnus pelamis*) em molho de tomate. Akande et al.¹⁵ estudaram a composição proximal deste produto e obtiveram 70,47% umidade, 26,79% de proteínas, 1,10% lipídeos e 2,17% cinzas, onde se verificou que o conteúdo protéico também é maior que o da anchoita, porém os demais são inferiores. Em relação ao valor energético, constatou-se que a anchoita foi apenas 4% menos calórica que o bonito de barriga listrada, apesar de este último apresentar maior conteúdo proteico. Entretanto, os lipídeos obtidos foram três vezes inferiores aos encontrados na anchoita.

Dos três lotes analisados, a amostra correspondente ao lote 3 apresentou reação positiva para prova de Kreiss, indicando a presença de rancidez oxidativa no conteúdo do enlatado. O resultado obtido pode estar relacionado com o alto teor de ácidos graxos insaturados que estão presentes na anchoita em conserva (69,4%). A insaturação, com a possível presença de oxigênio no interior do enlatado, pode facilitar a deterioração destes ácidos graxos, levando à rancidez do produto. Um dos indicativos de ranço nos alimentos, em geral, é a presença de odor característico, entretanto é importante salientar que neste produto não foi verificado alteração de odor na abertura das latas do lote com resultado positivo no teste de Kreiss, indicando que o processo de rancidez estava em estágio inicial.

Entre os processos de deterioração química no pescado, os mais importantes são aqueles que ocorrem na sua fração lipídica. A oxidação envolve apenas o oxigênio e os lipídeos insaturados, onde a primeira etapa leva à formação de hidroperóxidos que não interferem no sabor, mas podem levar ao surgimento de colorações castanhas ou amareladas no pescado. A degradação destes compostos origina aldeídos e cetonas que, por sua vez, promovem um sabor acentuado de ranço e causam deterioração química ou desenvolvimento de odores. Este processo pode ser evitado armazenando-se o produto em condições internas de anaerobiose ou utilizando antioxidantes¹⁶.

Os resultados relacionados com a esterilidade comercial estavam de acordo com a legislação vigente¹⁷, não apresentando alterações físicas visíveis, mesmo quando submetidas à incubação de 36 °C e 55 °C. Não foi observado vazamento, perfuração, defeitos de recravação e estufamento das amostras, assim como também não foram constatadas a presença de oxidação da lata e mudança na coloração do molho de cobertura.

A Tabela 2 expressa os valores aferidos para pesos bruto, líquido, drenado e os percentuais de sólidos e líquidos em relação ao peso líquido do produto final.

Tabela 2. Peso bruto, líquido, drenado e percentual de peixe e líquido em relação ao peso líquido da conserva de anchoita em molho com tomate

Lote/Lata	Peso bruto (g)	Peso líquido (g)	Peso drenado (g)	Peixe (%)
1/1	839,68	749,45	436,36	58,22
1/2	829,64	737,77	439,88	59,62
1/3	815,52	726,38	442,03	60,85
2/1	818,81	728,54	417,16	57,26
2/2	839,40	745,49	414,54	55,61
2/3	814,86	726,45	428,30	58,96
3/1	849,12	757,88	494,70	65,27
3/2	818,55	729,68	497,00	68,11
3/3	855,67	767,64	475,16	61,90
Média ± d.p.	831,2 ± 15,4	741,0 ± 15,0	449,4 ± 31,6	60,6 ± 3,96

Na caracterização da conserva, o molho de cobertura utilizado na composição do produto não atingiu o mínimo para ser denominado “molho de tomate”, sendo inferior a 30%, denominando-se, portanto, “anchoita em molho com tomate”.

O peso bruto é aquele na forma como o alimento foi adquirido, ou seja, embalado, sem remoção do conteúdo interno e, peso líquido, é aquele correspondente ao alimento total preparado para consumo, com a remoção da embalagem¹⁸. O peso drenado é o peso do alimento escorrido, no qual se aproveita somente a parte sólida.

A capacidade de acondicionamento do recipiente utilizado no enlatamento foi 830g, fornecido pelo fabricante, podendo variar conforme a adição do conteúdo de sólidos e líquidos no interior da conserva. Para conservas de sardinhas, a legislação preconiza que a carne do pescado se constitua de no mínimo 50% em relação ao peso líquido declarado no rótulo, enquanto que para as conservas de tunídeos, a legislação estabelece, no mínimo, 64% de carne em relação ao conteúdo líquido declarado. Como ainda não há legislação específica para conservas de anchoita, os resultados foram avaliados segundo a regulamentação atualizada, para conservas de pescado em geral, devendo apresentar, no mínimo, 50% de conteúdo sólido¹⁹. Verificou-se então que todas as latas analisadas atingiram o limite mínimo do conteúdo de sólidos preconizado pela legislação, indicando que foi realizado um controle de peso durante o enchimento das latas com o pescado antes da etapa de pré-cozimento.

Apesar dos lotes verificados no estudo estarem de acordo com a legislação¹⁹ houve grande variação dos valores relacionados com os pesos drenados, apresentando variação de 12,5% entre a conserva que teve o maior e o menor peso de pescado em relação ao

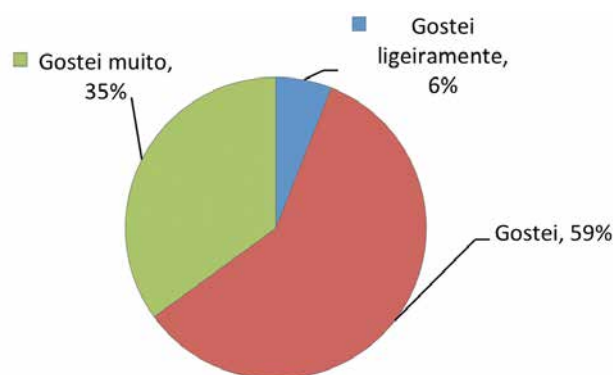


Figura 2. Percentual obtido pelo teste de aceitação por escala hedônica de sete pontos para conserva de anchoita em molho com tomate

conteúdo total. Este fato possivelmente está associado às distintas épocas de captura do pescado, influenciando na sua composição proximal.

A análise sensorial realizada por teste de aceitação com escala hedônica de sete pontos teve 51 julgadores não treinados e que voluntariamente concordaram em participar da pesquisa. O resultado está mostrado na Figura 2.

Das pessoas que participaram do estudo, 80,4% eram mulheres e 19,6% homens; 17,6% tinham idade inferior ou igual a 18 anos, 27,5% entre 19 e 25, 47,1% entre 26 e 34 e 7,8% com idade igual ou superior a 35 anos. Do total de julgadores, 78,4% possuíam o hábito de consumir pescado na alimentação. Destes, foi perguntado qual ou quais formas eram as mais consumidas: em conserva, assado, cozido, frito e/ou cru.

Dos julgadores que marcaram a opção “em conserva” como uma das formas mais frequentes de consumo, observou-se que 7,1% responderam “gostei ligeiramente”, 64,3% responderam “gostei” e 28,6% responderam “gostei muito”, sendo satisfatório o resultado obtido no teste de aceitação.

O índice de aceitabilidade (IA) do produto foi de 89,9%. Segundo Gularte¹³, este índice indica se o alimento analisado teve aceitação entre os julgadores, em termos de características sensoriais de qualidade em uma percepção global, onde o mínimo a ser aceito é 70%.

Dos 51 julgadores, 22,2% tinham o hábito de consumir pescado em conserva, 28,6% consumiam de forma assada, 9,2% na forma cozida, 38,1% como pescado frito e 1,6% consumiam na forma crua. A conserva foi a terceira maior forma de consumo entre os julgadores pesquisados, caracterizando o produto em estudo como sendo bem aceito, independente da

maneira que o pescado geralmente é consumido pelos participantes da pesquisa.

Outra questão solicitada aos julgadores na ficha do teste de aceitação foi em relação à frequência de consumo de pescado na dieta, obtendo-se as seguintes respostas: 24% consumiam menos de uma vez/mês; 38% de uma a duas vezes; 20% de 3 a 4 vezes; e 18% superior a 4 vezes/mês. Foi possível observar que a maior frequência de consumo assinalada foi a de uma a duas vezes/mês, representando 38% do total de julgadores, 40% entre os homens e 60% das mulheres. Em relação à faixa etária, constatou-se o predomínio da mesma frequência de consumo, com exceção dos julgadores acima de 35 anos, onde 75% consumiam acima de 4 vezes/mês.

CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos, foi possível concluir que a caracterização da anchoita em conserva em molho com tomate apresentou qualidade satisfatória em todos os aspectos analisados, estando de acordo com a legislação vigente, além de ser bem aceita entre os avaliadores (90% de índice de aceitação), tornando possível a sua introdução ao consumo e especificamente na merenda escolar.

REFERÊNCIAS

1. Moreira RT. Desenvolvimento de embutido emulsionado de tilápia (*Oreochromis niloticus* L.) estabilizado com hidrocolóides [tese de doutorado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2005.
2. Brasil. Ministério da Pesca e Aquicultura. Estatística da pesca e aquicultura. 2010. [acesso 2011 Fev 25]. Disponível em: [http://www.mpa.gov.br/#info-estatistica/estatistica-da-pesca-e-aquicultura].
3. Monraia C, Loja F, Ribeiro J, Garcez MG. Código de boas práticas de conservas de sardinha e do tipo sardinha. Lisboa : Associação da Indústria Alimentar pelo Frio; 2006.
4. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria [da] Secretaria de Defesa Agropecuária nº 63, de 13 de novembro de 2002. Regulamento técnico de identidade e qualidade de conserva de peixes. [acesso 2010 Set 2]. Disponível em: [http://gipescado.com.br/legis_mapa/peixes_conserva_anexoI.pdf].
5. Ogawa M, Maia EL. Manual de Pesca: Ciência e Tecnologia do Pescado. São Paulo: Varela; 1999.
6. Sánchez RP. Patrones de distribución espacio-temporal de los estadios embrionarios y larvales de la anchoita (*Engraulis anchoita* Hubbs & Marini) a micro e macroescala, su relación con la supervivencia y el reclutamiento. [tesis de doctorado]. Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires; 1995.
7. Castello JP. Pelagic Teleosts. In: Seeliger U, Odebrecht C, Castello JP, editors. Subtropical convergence environments: the coast and sea in the Southwestern Atlantic. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: Springer; 1997.
8. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal (LANARA). Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. II - Métodos Físico-Químicos. Brasília (DF): Laboratório Nacional de Referência Animal; 1981.
9. Association of Official Analytical Chemists - AOAC. Official methods of analysis. 16a edition, v. 2, Arlington: AOAC; 1995.
10. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo - Brasil). Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4ª ed. [1ª ed. digital]. São Paulo (SP): Instituto Adolfo Lutz; 2008. [acesso...]. Disponível em: [http://www.ial.sp.gov.br/index.php?option=com_remository&Itemid=7&func=select&orderby=1&Itemid=7].
11. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados. Brasília (DF): ANVISA; 2003B.
12. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Instrução Normativa nº62, de 26 de agosto de 2003. Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Brasília (DF): ANVISA, 2003A.
13. Gularte MA. Manual de Análise Sensorial de Alimentos. Pelotas (RS): Editora e Gráfica Universitária PREC - UFPel; 2009.
14. Tarley CRT, Visentainer JV, Matsushita M, Souza NE. Proximate composition, cholesterol and fatty acids profile of canned sardines (*Sardinella brasiliensis*) in soybean oil and tomato sauce. *Food Chem*. 2004;88:1-6.
15. Akande GR, Emokpae AO, Towuru ET, Ogbonna C, Ajayi A. Proximate composition, microbiological and sensory evaluation of canned skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) stored at ambient and accelerated temperatures. In: Proceedings ; FAO Fisheries Report (FAO), nº 400 (Suppl.); Expert Consultation on Fish Technology in Africa, Abidjan (Cote d'Ivoire). Rome: FAO, Fishery Industries Div.; 1989, p. 309-315.
16. Huss HH. Garantia da qualidade dos produtos da pesca: Documento Técnico sobre as Pescas. Roma: FAO; 1997 [acesso 2010 Nov 25]. Disponível em: [http://www.fao.org/docrep/003/T1768P/T1768P00.HTM].
17. 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] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 10 jan. 2001.
18. Almeida DT, Nunes IL, Andrade LL. Técnica Dietética I. Aula Prática de Mensuração de Alimentos, Universidade Federal da Bahia; 2007. [acesso 2010 Nov 26]. Disponível em: [http://www.dietetica.ufba.br/Temas/PESOS%20MEDIDAS/Aula_Pr%C3%A1tica_Mensura%C3%A7ao_alimentos.pdf].
19. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. Portaria SDA nº37, de 14 de fevereiro de 2011. Regulamento técnico de identidade e qualidade de conserva de peixes. [acesso 2011 Fev 22]. Disponível em: [http://anfip.datalegis.inf.br/view/txato.php?KEY=&WORD=&TIPO=POR&NUMERO=00000037&SEQ=000&ANO=2011&ORGAO=SDA/MAPA&TIPITEM=&DESITEM=].

Dinâmica microbiana em contrafilés bovinos embalados a vácuo: sistemas de terminação e tempo de estocagem

Microbial dynamics in the vacuum-packaged meat cuts: production system and storage period

RIALA6/1408

Camila Silveira de MELO^{1*}, Albenones José de MESQUITA², Cíntia Silva MINAFRA-REZENDE², José Carlos SERAPHIN², Marinna Barros de OLIVEIRA³, Cláudia Peixoto BUENO¹

*Endereço para correspondência: ¹Universidade Estadual de Goiás (UEG), CEP 74650-250, Setor Negrão de Lima, Q.35, Lt. 29, Goiânia - GO, Brasil. E-mail: camismel@hotmail.com.

²Centro de Pesquisa em Alimentos, Universidade Federal de Goiás (UFG)

³Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás

Recebido: 18.08.2010 - Aceito para publicação: 02.12.2011

RESUMO

A qualidade da carne embalada a vácuo é de grande importância para o comércio. Neste contexto, no presente estudo foi avaliada a dinâmica microbiana de cortes cárneos bovinos *Longissimus dorsi*, denominado comercialmente por contrafilé, embalados a vácuo e armazenados a 0 ± 1 °C no estabelecimento de abate durante cinco períodos de estocagem. Foram analisadas amostras de cortes cárneos provenientes de bovinos anelados, fêmeas, terminados em dois sistemas de produção, sendo 15 adultos criados a pasto, com média de 45 meses de vida e 15 bovinos jovens de 12 meses de idade em confinamento de alto desempenho. Procedeu-se a avaliação bacteriológica das carnes nos períodos de tempo correspondentes à zero, 30, 45, 60 e 75 dias após o abate e embalagem. A avaliação microbiológica foi efetuada pela contagem de aeróbios viáveis, bactérias ácido lácticas, *Enterobacteriaceae*, psicotróficos, anaeróbios, determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais, coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*, análise de pH e temperaturas dos cortes. O sistema de terminação influenciou parcialmente na dinâmica microbiana. As carnes embaladas a vácuo podem apresentar micro-organismos deteriorantes e patogênicos, provenientes de contaminação ambiental ou fecal. Quanto maior o período de estocagem dos cortes cárneos, a contagem de micro-organismos avaliados foi maior.

Palavras-chave. contrafilé, deterioração, embalagem a vácuo, novilhas.

ABSTRACT

Considering the importance of the quality of vacuum-packed meat for the trading of this product, this study aimed at evaluating the microbial dynamics of bovine meat cuts *Longissimus dorsi*, commercially known as striploin (*boneless sirloin*), which were vacuum-packed and stored at 0 ± 1 °C at the slaughterhouse for five periods of storage. The samples of meat cuts from females zebu cows, being 15 animals aged nearly 46 months old and feed in grazing system, and 15 aged nearly 12 months old which were fattened at a high-performance confinement. After being cooled and stored during 75 days, these chilled vacuum-packed meat samples were assessed on microbiological quality at 0, 30, 60, 45 e 75 shelf-life days. The microbiological quality was evaluated by detecting and count of the viable aerobic bacteria, *Enterobacteriaceae*, anaerobes and lactic acid bacteria, the most probable number determination (MPN) of coliforms, fecal coliforms and *Escherichia coli*; as well as the pH and temperature of meat cuts. The termination system has affected the microbial dynamics partially. The vacuum-packaged meat might contain deteriorative and pathogenic microorganisms arising from environmental or fecal contamination. The longer the meat cuts were storage, the higher was the microorganisms count.

Keywords. alterations/deterioration, heifers, strip loin/sirloin, vacuum-packaged.

INTRODUÇÃO

O Brasil, de acordo com dados recentes da ABIEC (Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne)¹, possui um dos maiores rebanhos de bovino de corte do mundo. A bovinocultura de corte nacional tem destaque no agronegócio, sendo favorecida pela extensão territorial, condições climáticas, programas voltados para a sanidade animal e, por consequência, a segurança associada ao alimento produzido. Ademais, este segmento da cadeia agroindustrial é responsável pelo faturamento de mais de R\$ 50 bilhões ao ano e oferece milhões de empregos. Todos estes atributos atestam o país como grande produtor de carne bovina e com potencial para atender as exigências específicas de diferentes mercados.

O sistema de criação, seja a pasto, intensivo ou semi-intensivo, tem se adequado a realidade comercial para suprir o mercado. No entanto, apesar dos benefícios em produtividade, esta atividade sugere risco de contaminação da carcaça e da carne, pela exposição da mesma a pele e pelos dos animais², durante as operações de abate e manipulação.

Por outro lado, as formas de criação dos animais e a relação entre a qualidade das carcaças finalizadas têm forte associação à transformação do músculo em carne envolvendo etapas bioquímicas e biofísicas, que afetarão as características organolépticas, sensoriais e de conservação, alterando a vida útil do alimento. Um dos critérios de dificuldade de comercialização com mercados importadores da carne bovina refere-se às características de conservação e à falta de padronização do produto³.

A carne é um excelente meio para a multiplicação bacteriana. Sua contaminação pode ocorrer no abate, armazenamento e distribuição; entretanto, a intensidade depende da eficiência das medidas higiênicas adotadas em todos os elos da cadeia produtiva⁴. Existem inúmeras técnicas para aumentar a vida útil da carne, sendo que a embalagem a vácuo combinada com baixas temperaturas tem se mostrado eficiente para a conservação. Nestas condições consegue-se conservar a carne por aproximadamente três meses, sendo um fator determinante para exportação⁴. O Brasil exportou em 2010 aproximadamente 950 mil toneladas de carne *in natura*, sendo a carne refrigerada embalada a vácuo o grande aquecedor do mercado internacional¹.

A carne embalada a vácuo tem a atmosfera gasosa radicalmente alterada ao redor de sua superfície. A pequena quantidade de oxigênio remanescente no interior da embalagem é consumida pela atividade metabólica da carne e de bactérias durante o armazenamento. Cria-se assim um microsistema anaeróbio dentro da embalagem que, auxiliado pelo efeito inibitório do CO₂ liberado na respiração, retarda a multiplicação de bactérias aeróbias deteriorantes, como *Pseudomonas*⁵.

O sistema criado dentro da embalagem favorece a predominância de bactérias anaeróbias facultativas deteriorantes, principalmente as bactérias lácticas, *Enterobacteriaceae* e psicrotróficas, que têm menor potencial de deterioração e de multiplicação em baixas temperaturas, resultando em vida útil mais longa do que o alimento fresco em exposição direta a grande quantidade de oxigênio⁶. Entretanto, mesmo nessas condições, há relatos de matadouros frigoríficos que reduziram de três para dois meses, até menos, o tempo de estocagem da carne refrigerada embalada a vácuo⁷.

Devem-se considerar também casos de tufamento, deterioração caracterizada pela distensão completa da embalagem, causando aspecto repugnante em cortes cárneos refrigerados embalados a vácuo, principalmente aos destinados a exportação. Essa deterioração tem sido relacionada à presença de bactérias lácticas e *Enterobacteriaceae*⁷.

Conhecer a dinâmica microbiana em cortes cárneos embalados a vácuo viabilizaria a redução de perdas comerciais devido à deterioração das mesmas. As perdas produtivas nessa área geram instabilidade comercial, além de impedir que as empresas invistam em desenvolvimento tecnológico e produtivo, assim como no aumento do número de funcionários e na qualificação deles. Não existem dados conclusivos acerca das perdas econômicas causadas pela deterioração da carne embalada a vácuo, mas é inquestionável a sua importância para a cadeia produtiva nacional e internacional.

Considerando os dois sistemas produtivos, os critérios estabelecidos para qualidade de carnes, bem como as formas de estocagem e o período de tempo envolvido, objetivou-se com o presente estudo verificar a dinâmica microbiana de cortes cárneos bovinos, contrafilés, embalados a vácuo e armazenados a ± 1 °C, por cinco períodos de tempo, oriundos de animais terminados a pasto e em confinamento de alto desempenho.

MATERIAL E MÉTODOS

No presente experimento foram utilizados 30 bovinos anelados, fêmeas, terminados em dois tipos de sistemas de produção (15 em confinamento de alto desempenho e 15 a pasto) e com idade média de 12 e 45 meses de vida, respectivamente. Todos os animais foram abatidos no mesmo dia em matadouro frigorífico, sob inspeção federal, habilitado para diversos mercados exportadores, localizado na grande região de Goiânia, Goiás.

O abate foi realizado conforme as normas vigentes, respeitando as exigências operacionais preconizadas pelas Normas de Inspeção de Carnes⁸ e pelo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA⁹.

Do total de animais abatidos, 15 meias-carcaças de cada sistema de terminação, refrigeradas a ± 1 °C por 48 horas foram selecionadas por sorteio e submetidas a desossa. A unidade de amostra foi constituída por aproximadamente 3 kg, do corte comercial contrafilé (*Longissimus dorsi*), embalada a vácuo, a 6 mBar de pressão interna, em filme plástico com permeabilidade máxima ao O₂ de 20 cm³/m²/dia, com tempo selagem de 83 °C/3s, e armazenada a ± 1 °C no abatedouro.

As unidades amostrais foram acondicionadas em embalagens secundárias (caixas de papelão) havendo a composição de uma série de cinco caixas por sistema de terminação, com três amostras por caixa. Para cada dia de análise, uma caixa de cada sistema de terminação, contendo três peças, foi aberta e analisada. Cabe salientar que as caixas relativas ao tempo zero foram colhidas logo após a passagem pela esteira de embalagem; as demais foram estocadas em temperatura de aproximadamente ± 1 °C.

No laboratório do frigorífico, as embalagens a vácuo correspondentes aos tempos zero, 30, 45, 60 e 75, contendo apenas o corte *Longissimus dorsi* (contrafilé) foram abertas em condições de assepsia no interior da câmara de fluxo laminar. De cada corte, com o auxílio de tesoura e bisturi esterilizados, retirou-se amostra analítica de 25 g que foi colocada em um saco esterilizado para *stomacher*. Em seguida, foram acondicionados em caixas de material isotérmico contendo gelo reciclável e transportados imediatamente ao Centro de Pesquisa em Alimentos da Escola de Veterinária (CPA/EV), sendo o tempo de transporte de aproximadamente 40 min. No Laboratório de Microbiologia do CPA/EV, a amostra foi homogeneizada com 225 mL de água peptonada tamponada 0,1%, para

obtenção da diluição 10⁻¹, a partir da qual diluições decimais seriadas sucessivas foram preparadas.

A avaliação bacteriológica das carnes embaladas a vácuo foi realizada por meio de contagens de micro-organismos aeróbios viáveis, *Enterobacteriaceae* e determinação do número mais provável de coliformes totais e coliformes termotolerantes, conforme o método para alimentos de origem animal, reconhecido e preconizado pelas normas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento¹⁰. Em associação foram feitas contagem de bactérias lácticas, psicotróficas e anaeróbias¹¹, assim como determinação do NMP de *Escherichia coli*¹².

A determinação do pH e da temperatura foram realizadas por meio de potenciômetro e termômetro de sonda, modelo 205 da marca Testo®, introduzidos na massa muscular, nos tempos zero, 30, 45, 60 e 75 de armazenamento. É importante ressaltar que a temperatura da câmara fria foi aferida diariamente e registrada em planilhas de controle, como forma de assegurar o limite máximo fixado de 1 °C.

Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado, composto de dois tratamentos e três repetições. A análise de variância foi aplicada e quando diferenças estatísticas foram observadas, aplicou-se o teste de Tukey ao nível de 5% de significância. Fez-se a regressão para estabelecer relação entre tempo e contagem das bactérias e análise de correlação foi utilizada para verificar a relação entre contagens bacterianas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante todo o experimento, registrou-se a temperatura da câmara fria que se manteve a -1,5 °C e a das amostras 0 °C, exceção registrada para o 60° dia, devido ao problema ocorrido no ajuste do termostato que ocasionou a redução da temperatura da câmara fria para -5 °C e o conseqüente congelamento da superfície dos cortes cárneos.

No presente experimento, ocorreu um aumento gradativo do pH até 45 dias de armazenamento. Os valores médios variaram de 5,5 a 5,9 para amostras provenientes de animais terminados a pasto e de 5,5 a 5,8 para os animais terminados em confinamento de alto desempenho. Os resultados encontrados estavam em um intervalo avaliado como aceitável, pois os frigoríficos exportam apenas carne com pH abaixo de 5,8, aferido diretamente no músculo *longissimus*, 24 horas *post-mortem*¹⁴.

Os resultados relacionados às bactérias lácticas, micro-organismos aeróbios viáveis e *Enterobacteriaceae* podem ser visualizados na Tabela 1. Nota-se que há diferença para contagens de bactérias lácticas e aeróbios viáveis, quando observados os sistemas de terminação e o tempo zero. Tal constatação permite acreditar que o sistema de terminação pode influenciar a contaminação inicial, uma vez que as amostras analisadas foram obtidas no mesmo matadouro frigorífico, sob as mesmas condições higiênicas e sanitárias, submetidas ao Serviço de Inspeção Federal.

A carne proveniente de animais terminados em confinamento de alto desempenho apresenta contaminação inicial mais elevada de bactérias lácticas em relação àquelas de pastagem, o que pode ser explicado pela alta densidade do rebanho e possibilidade de maior exposição dos animais a micro-organismos. Cabe salientar que todos os procedimentos de abate, considerando, sobretudo, o banho de aspersão, insensibilização, içamento, esfolagem e evisceração foram os mesmos para todos os animais envolvidos neste estudo. Isso significa afirmar que houve padronização das operações dificultando a contaminação das carcaças pelo contato com o ambiente ou fezes e consequente contaminação da carne.

Quanto à contagem dos micro-organismos aeróbios viáveis, nota-se maior contaminação inicial das amostras de animais terminados em confinamento de alto desempenho, para o tempo zero. Apesar disso, as contagens iniciais para os dois sistemas de terminação são baixas, próximas a 10^2 UFC/g, sugerindo que boas práticas de fabricação foram adotadas. Esses resultados são reforçados pelos estudos de Borch et al¹⁶ e Roça¹⁷ quando

afirmaram que em condições higiênicas adequadas de manipulação durante o abate, as contagens iniciais de mesófilos em carcaça estão entre 10^2 e 10^3 UFC/g.

Ainda para estas bactérias, constatou-se que o tempo influencia na multiplicação bacteriana, sendo que aos 45 dias de armazenamento a carne apresentava-se imprópria para consumo, em virtude das contagens superiores a 10^6 UFC/g. A deterioração da carne tem seu início quando as contagens de aeróbios estão na faixa de 10^5 UFC/g, geralmente caracterizada pela descoloração da superfície, sendo que entre 10^7 e 10^8 UFC/g, surgem odores caracterizados como estranhos, entre 10^8 e 10^9 UFC/g, ocorrem alterações indesejáveis de sabor e em contagens por volta de 10^9 UFC/g, há formação de limo superficial¹⁷. Salienta-se que alterações nas condições extrínsecas, como refrigeração ou embalagem em atmosfera modificada só retardam a deterioração, porém, não a eliminam.

Os resultados das contagens de *Enterobacteriaceae* no tempo zero foram menores que $1,0 \times 10^1$ UFC/g, para os dois sistemas de produção. Considerando o intervalo entre os tempos zero e 30 dias, observou-se que houve aumento significativo, situação não perpetuada nos tempos posteriores, quando provavelmente houve depleção de nutrientes e do ambiente favorável à atividade celular destes micro-organismos. Ressalta-se que as condições de higiene e manipulação identificadas no matadouro frigorífico foram satisfatórias, porém, observou-se que maiores contagens foram aferidas ao sistema de produção a pasto. Pode-se acreditar que tais animais, pela maior exposição ao solo, poeira, águas e pastagens, que possuem ampla distribuição destas

Tabela 1. Contagens de bactérias lácticas, micro-organismos mesófilos aeróbios viáveis e *Enterobacteriaceae* em UFC/g, em relação ao sistema de terminação e o tempo de armazenamento

Bactérias	Sistemas de Terminação	Tempo de armazenamento (dias)				
		0	30	45	60	75
		UFC/g				
Bactérias lácticas	1	$3,7 \times 10^{1Aa}$	$9,2 \times 10^{4Ab}$	$1,3 \times 10^{7Ac}$	$2,9 \times 10^{6Ac}$	$2,8 \times 10^{7Ac}$
	2	$2,8 \times 10^{2Ba}$	$1,5 \times 10^{4Ab}$	$2,4 \times 10^{6Bc}$	$4,1 \times 10^{6Ac}$	$1,8 \times 10^{7Ac}$
Microorganismos aeróbios viáveis	1	$<1,0 \times 10^{1Aa}$	$8,1 \times 10^{4Ab}$	$8,7 \times 10^{6Ac}$	$1,3 \times 10^{6Ac}$	$1,5 \times 10^{7Ac}$
	2	$7,0 \times 10^{2Ba}$	$2,2 \times 10^{4Ab}$	$2,1 \times 10^{6Ac}$	$2,3 \times 10^{6Ac}$	$2,2 \times 10^{7Ac}$
<i>Enterobacteriaceae</i>	1	$<1,0 \times 10^{1Aa}$	$6,7 \times 10^{1Ab}$	$8,3 \times 10^{2Ab}$	$2,8 \times 10^{2Ab}$	$6,7 \times 10^{2Ab}$
	2	$<1,0 \times 10^{1Aa}$	$6,0 \times 10^{1Ba}$	$4,0 \times 10^{1Ba}$	$4,7 \times 10^{1Ba}$	$1,8 \times 10^{3Ab}$

^A Nas colunas, médias com letras maiúsculas comuns são equivalentes para cada bactéria.

^a Nas linhas, médias com pelo menos uma letra minúscula comum são equivalentes para cada bactéria:

1 – Pasto;

2 – Confinamento de Alto Desempenho.

UFC = Unidades formadoras de colônias

bactérias, tenham contagens elevadas devido adesão à pele e consequentemente a suas carcaças.

Estudo de Blixt⁶ realizado com carne bovina embalada a vácuo e armazenada a 4 °C, por oito semanas, de quatro diferentes frigoríficos, identificou *Enterobacteriaceae* em baixas contagens, 2 a 3 log UFC/g, quando estas carnes eram provenientes de frigoríficos com boas práticas de fabricação, ao contrário daqueles que não possuíam programas de garantia de qualidade quando as contagens foram da ordem de 6 a 7 log UFC/g.

Avaliando as bactérias psicrotróficas, observou-se que o sistema de criação não conferiu influência. No entanto, as condições para desenvolvimento e multiplicação de micro-organismos aeróbios viáveis favorecem a ocorrência de psicrotróficos considerando que estes são capazes de se multiplicar lentamente a temperaturas iguais ou inferiores a 0 °C, mas que possuem temperatura ótima de crescimento entre 20 e 30 ± 1 °C, faixa em que há multiplicação de mesófilos⁴. Aos 45 dias de armazenamento, as contagens foram próximas a 7 log UFC/g.

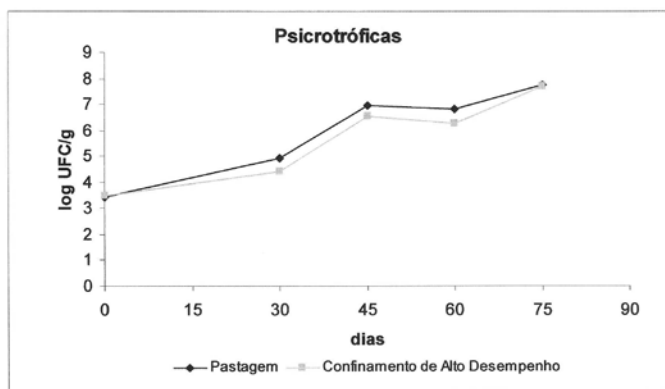


Figura 1. Médias das contagens de bactérias psicrotróficas em log UFC/g, em relação a tempo de armazenamento, em dias, dos sistemas de terminação a pasto e confinamento de alto desempenho

A contagem de bactérias anaeróbias não demonstrou diferença entre os sistemas de terminação a pasto e confinamento de alto desempenho. Ao analisar a Figura 3, observou-se que o resultado da contagem de bactérias anaeróbias no tempo zero foi menor que $1,0 \times 10^1$ UFC/g. Tal fato poderia ser explicado pela injúria celular e principalmente pelas condições de tensão de O_2 , visto que as amostras possuíam carga inicial de bactérias anaeróbias facultativas, como algumas *Enterobacteriaceae* e lácticas. Ademais, pode-se afirmar que com o aumento do tempo de estocagem, houve aumento destes micro-organismos,

pelas condições ideais para a multiplicação de alguns gêneros, classificados como deteriorantes.

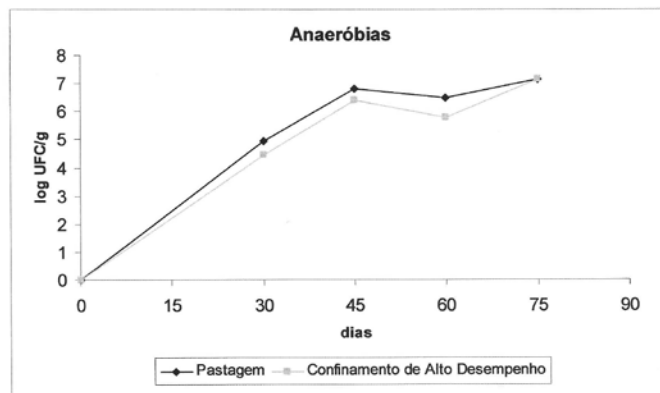


Figura 2. Médias das contagens de bactérias anaeróbias em log UFC/g, em relação aos períodos de armazenamento, em dias, dos sistemas de terminação a pasto e confinamento de alto desempenho

No presente estudo, o NMP de coliformes totais e termotolerantes e *Escherichia coli* apresentaram-se inferiores a 2,5 NMP/g, nos dois sistemas de terminação, durante os 30 dias iniciais da avaliação. Ao analisar os resultados observou-se que o sistema de terminação não exerce influência sobre a multiplicação dos dois grupos de micro-organismos indicadores e da espécie bacteriana.

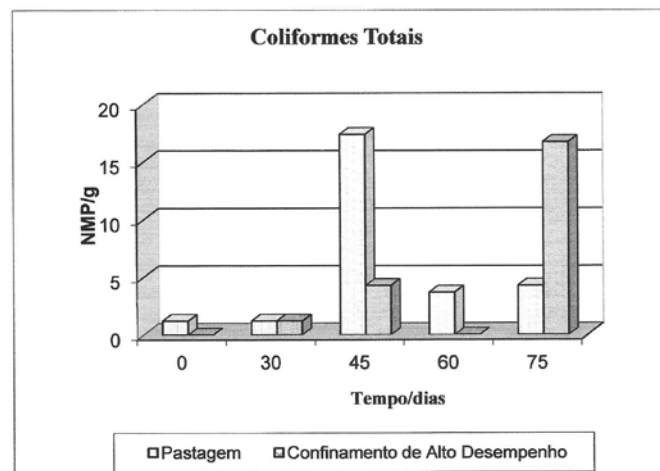


Figura 3. Médias do NMP de Coliformes Totais por grama, em relação aos períodos de armazenamento, em dias, nos sistemas de terminação a pasto e em confinamento de alto desempenho

Observou-se alta associação entre o número mais provável de coliformes totais e termotolerantes, para os dois sistemas de produção, denotando a possibilidade de contaminação de origem fecal, sem que houvesse a exclusão da contaminação de origem ambiental. Por outro lado, os

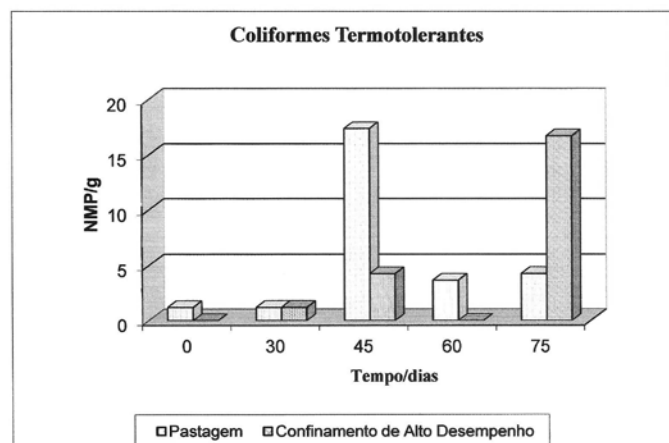


Figura 4. Médias do NMP de Coliformes Termotolerantes por grama, em relação aos períodos de armazenamento, em dias, nos sistemas de terminação a pasto e em confinamento de alto desempenho

resultados de *Escherichia coli* e coliformes termotolerantes foram idênticos, o que reforça a alta correlação dos agentes.

Da análise dos dados do presente estudo, observando o tempo zero, verificou-se que a adoção de boas práticas de fabricação, no momento do abate, contribuiu sobremaneira para a obtenção de baixos níveis de micro-organismos indicadores de contaminação fecal e ambiental. Carnes embaladas a vácuo, por períodos maiores que 45 dias e mantidas a temperaturas de ± 1 °C demonstraram alta contagem para as categorias de coliformes e *Escherichia coli*, mostrando-se impróprias para consumo.

CONCLUSÃO

A dinâmica da carga microbiana em contrafilés embalados a vácuo revelou menores contagens no tempo zero e, aos 45 dias, os cortes cárneos apresentaram contagens bacterianas elevadas, indicando início de deterioração.

Carnes embaladas a vácuo, a 6 mBar em filme plástico com permeabilidade ao O₂ máxima de 20 cm³/m²/dia, não denotam garantia de menor carga microbiana, considerando os cinco períodos de tempo avaliados.

Sistemas de terminação podem influenciar a microbiota inicial das carcaças e carnes.

REFERÊNCIAS

1. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne - ABIEC. Pecuária Brasileira. [acesso 2011 Ago 31]. Disponível em: [http://www.abiec.com.br].
2. Jardim FBB, Silva EM, Okura MH, Ramos MA. Influência dos sistemas de pastagem e confinamento na contaminação microbiana de carcaças bovinas. *Cienc Tecnol Aliment*. 2006;26(2):277-82.
3. Arrigoni MB. Eficiência produtiva de bovinos de corte no modelo biológico superprecoce [tese de livre docência]. Botucatu (SP): Universidade Estadual Paulista; 2003.
4. Jay, JM. Microbiologia de Alimentos. São Paulo: Artmed; 2005.
5. Oliveira LM, Sarantópoulos CIGL, Cunha DG, Lemos AB. Embalagens Termoformadas e Termoprocessáveis para Produtos Cárneos Processados. *Polim Cienc Tecnol*. 2006;16(3):202-10.
6. Blixt Y, Borch E. Using an electronic nose for determining the spoilage of vacuum packaged beef. *Int J Food Microbiol*. 1999;46:123-34.
7. Chaves RD. Avaliação microbiológica e do potencial de estufamento por bactérias ácido lácticas e enterobactérias em cortes bovinos embalados a vácuo [dissertação de mestrado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2010.
8. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal - DIPOA. Divisão de Inspeção de Carnes e Derivados. Inspeção de carnes, padronização de técnicas, instalações e equipamentos: I - Bovinos, currais e seus anexos. Brasília (DF): MAPA; 1971.
9. Brasil. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - RIISPOA. Brasília (DF): MAPA; 1997.
10. Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Anexo I - 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. Seção 1. [lei na internet]. [acesso em 20 Jan 2006]. Disponível em: [http://www.agricultura.gov.br/sislegis].
11. Downes FP, Ito K. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4ª ed. Washington: American Public Health Association; 2001.
12. Kornacki JL, Johnson JL. *Enterobacteriaceae*, Coliforms and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: Downes FP, Ito K. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4ª ed. Washington: American Public Health Association; 2001.
13. Jones RJ. Observations on the succession dynamics of lactic acid bacteria populations in chill-stored vacuum-packaged beef. *Int J Food Microbiol*. 2004;90:273-82.
14. Fernandes ARM, Sampaio AAM, Henrique W, Oliveira EA, Tullio RR, Percin D. Características da carcaça e da carne de bovinos sob diferentes dietas, em confinamento. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2008;60(1):139-47.
15. Holley RA, Peirson MD, Lam J, Tan KB. Microbial profiles of commercial, vacuum-packaged, fresh pork of normal or short storage life. *Int J Food Microbiol*. 2004;97:53-62.
16. Borch E, Kant-Muemansb ML, Blixt Y. Bacterial spoilage of meat products and cured meat. *Int J Food Microbiol*. 1996;33:103-20.
17. Roça RO. Microbiologia da Carne. UNESP [Internet]. 2004. Disponível em: [http://www.fca.unesp.br/outros/tcarne/tecarne.htm#s5].

Processamento e avaliação da qualidade de licor de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.)

Processing and quality evaluation of açaí liqueur (*Euterpe oleracea* Mart.)

RIALA6/1409

Emanuel Neto Alves de OLIVEIRA*, Dyego da Costa SANTOS

*Endereço para correspondência: Unidade Acadêmica de Engenharia Agrícola, Centro de Tecnologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de Campina Grande, Av. Aprígio Veloso, 882, Bodocongó, CEP 58109-970, Campina Grande-PB, Brasil. Tel.: (83) 3310-1055, E-mail: emanuelnetoliveira@ig.com.br

Recebido: 06.08.2011 - Aceito para publicação: 14.12.2011

RESUMO

O objetivo deste estudo foi elaborar um licor à base de açaí e avaliar a qualidade físico-química, microbiológica e sensorial. A matéria-prima e o licor foram avaliados quanto aos parâmetros físico-químicos como umidade, lipídeos, proteína, cinzas, carboidratos totais, sólidos totais, sólidos solúveis, acidez total, açúcares (reduzidos, não reduzidos e totais), teor alcoólico, densidade, cálcio, pH, fibras e ferro; e microbiológicos quanto a presença de coliformes a 35 °C e 45 °C, bolores, leveduras e *Salmonella*. Efetuou-se um teste de aceitação com 40 provadores entre 20 e 42 anos, utilizando escala hedônica estruturada mista de nove pontos e intenção de compra. A polpa apresentou elevados teores de umidade, lipídeos e fibras e baixos conteúdos de cinzas, acidez e cálcio. A bebida elaborada apresentou teor alcoólico de 16,00 ± 0,50% (v/v), elevados teores de açúcares e baixa acidez e cinzas. O licor apresentou ausência de *Salmonella*, coliformes e bolores e leveduras. A bebida apresentou índice satisfatório de aceitabilidade para todos os atributos, destacando-se a aparência que obteve maior aceitação, seguido de consistência, textura, sabor, cor e aroma, com intenção de compra de 74,8%. Diante dos resultados verificou-se que o açaí é uma matéria-prima alternativa para elaboração de novos produtos alimentícios, dentre eles o licor.

Palavras-chave. *Euterpe oleracea* Mart., bebida alcoólica, controle de qualidade.

ABSTRACT

The study objective was to develop an açaí liqueur and assess quality physico-chemical, microbiological and sensory. The raw material and liqueur were evaluated by physico-chemical parameters, such as moisture, lipid, protein, ash, total carbohydrates, soluble solids, acidity, sugars (reducing, non-reducing and total), alcohol content, density, calcium, fiber and iron; and microbiological by analyses of coliforms at 35 °C and 45 °C, yeasts, molds and *Salmonella*. Were conducted acceptance testing with 40 tasters from 20 to 42 years, using a hedonic scale of nine points and purchase intent. The pulp showed high levels of moisture, lipid and fibers and low ash content, acidity and calcium. The beverage prepared has presented an alcohol content of 16.00 ± 0.50% (v/v), high content of sugar and acidity, and low ash content. The liquor showed absence of *Salmonella*, coliforms and yeasts and molds. The drink reached satisfactory index of acceptability for all attributes, especially the appearance attribute which obtained the highest acceptance followed by consistency, texture, flavor, color and aroma, with the intent to purchase of 74.8%. According to the results, it was found that açaí is an alternative raw material for the elaboration of new food products, including liquor.

Keywords. *Euterpe oleracea* Mart., alcoholic drink, quality control.

INTRODUÇÃO

O açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) é uma palmeira tropical nativa da Amazônia. Seus frutos são utilizados na produção da polpa de açaí, um alimento muito consumido pelas populações regionais¹.

O fruto não é consumido *in natura*, pois apresenta escasso rendimento de parte comestível e sabor relativamente insípido, quando comparado com a maioria das frutas tropicais. Além disso, o consumo direto dos frutos deixa nos lábios, dentes e gengivas manchas de coloração arroxeadas, sendo bem acentuadas e de aspecto desagradáveis, embora facilmente removíveis. Na Amazônia brasileira o fruto é usado principalmente na obtenção da bebida açaí, um refresco de consistência pastosa, obtido por extração mecânica, em máquinas despulpadoras ou manualmente. Essa bebida é obtida com a adição de água durante o processamento dos frutos, o que facilita as operações de despulpamento e filtração².

De acordo com a legislação vigente³, a polpa é classificada em função da água adicionada, por meio da análise de sólidos totais, em açaí grosso ou especial, açaí médio ou regular e açaí fino ou popular. Quando o despulpamento é efetuado sem a adição de água, obtém-se a polpa integral.

Diversas formas de apresentação do produto têm surgido no mercado tais como: açaí pasteurizado, açaí com xarope de guaraná, açaí em pó, doce de leite com açaí e, geléia². De acordo com Pereira⁴, outra maneira de aproveitamento desse produto é a sua incorporação em vários alimentos com o objetivo de enriquecê-los nutricionalmente.

Foi observado, nos últimos anos, grande interesse e investimentos em pesquisas sobre o aproveitamento tecnológico desse fruto. Este aumento pode ser atribuído às propriedades nutricionais e valor calórico do açaí, pois este é um alimento rico em proteínas, fibras, lipídios, vitamina E, e minerais como ferro, manganês, cobre, boro e cromo⁵. Dentre as possibilidades de aproveitamento do açaí, inclui-se a produção de licor.

Segundo a legislação vigente⁶, licor é a bebida com graduação alcoólica de 15 a 54% em volume, a 20 °C, com percentual de açúcar superior a 30 g.L⁻¹, elaborada com uma parte alcoólica e com uma parte não alcoólica de origem vegetal ou animal. A palavra licor tem acepção comum de bebida alcoólica que contém elevada proporção de açúcar, alto teor alcoólico e um princípio aromático extraído de raízes, sementes, frutas e cascas de plantas⁷.

Os licores são bebidas alcoólicas produzidas nas mais diversas regiões do mundo, tendo suas principais características relacionadas com a técnica de preparação, matéria-prima e finalidade⁸. De acordo com Penha et al.⁹, os processos tradicionais de fabricação de licores de frutas consistem na mistura de álcool etílico, obtido por destilação, com um xarope de açúcar contendo pequenas quantidades de essências de ervas ou de frutas, seguido de decantação e de filtração. Trata-se de um processo simples. No entanto, existem variações no processo, com registro de algumas patentes que visam, de alguma forma, melhorar a qualidade do produto final.

Têm-se observado nos últimos anos um grande interesse por frutos da Amazônia, principalmente pelo açaí. Este fruto é gerador de renda na agricultura familiar de muitos moradores da região norte do país, além de ser muito apreciado por seu sabor e propriedades. Toda forma de agregação de valor ao fruto do açaizeiro deve ser considerada, o que justifica a aplicação de processos tecnológicos para obtenção de diversos produtos derivados, dentre eles o licor.

Considerando a escassez de informações disponíveis que abordem o aproveitamento do açaí para produção de licor, o presente estudo foi realizado com objetivo de elaborar e avaliar a qualidade química, físico-química, microbiológica e sensorial de licor à base de açaí.

MATERIAL E MÉTODOS

Matéria-prima

Como matéria-prima, foi utilizada a polpa de açaí congelada classificada com média (11,49 ± 0,15% de sólidos totais). Os demais ingredientes foram: açúcar refinado; água potável e; destilado alcoólico, com teor alcoólico de 38% (v/v). O processamento foi realizado conforme o fluxograma apresentado na Figura 1.

Elaboração do licor: Descrição do fluxograma de produção

A matéria-prima (polpa de açaí) foi obtida no mercado varejista. Ao realizar a coleta das amostras observou-se o estado de conservação do produto, da embalagem e o modo de armazenamento.

As amostras foram transportadas em caixas térmicas, com a finalidade de manter a cadeia do frio, evitar o descongelamento e o desenvolvimento de micro-organismos indesejáveis. As amostras foram

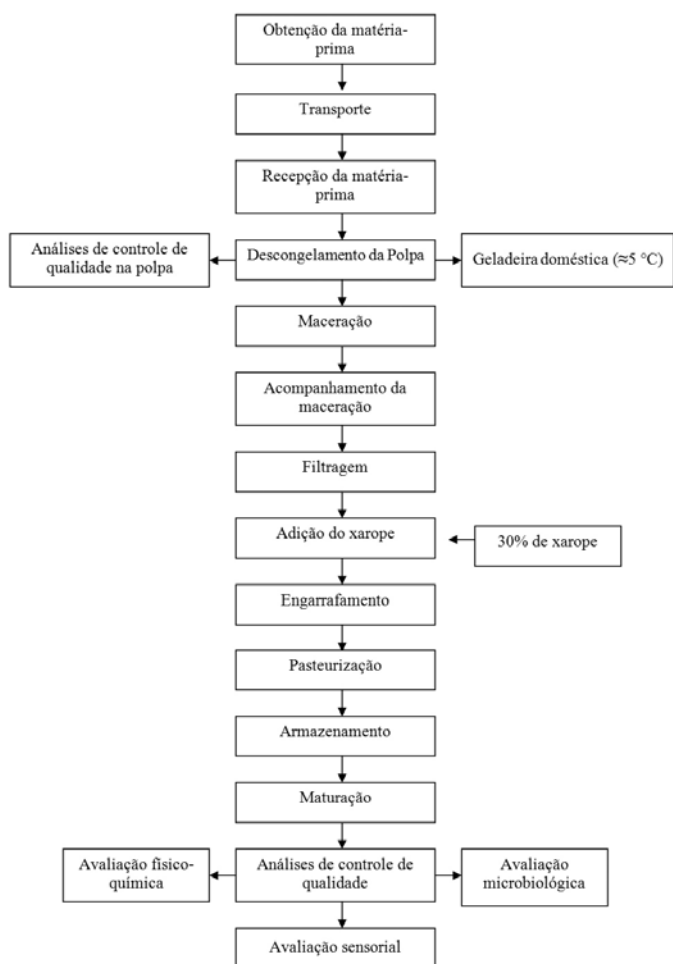


Figura 1. Fluxograma do processamento do licor de açaí

recepcionadas no Laboratório, pesadas e conduzidas para o descongelamento adequado.

A polpa foi descongelada gradativamente sob refrigeração (5 ± 2 °C), em geladeira doméstica, com o objetivo de evitar a perda de nutrientes e o desenvolvimento de micro-organismos.

A maceração da polpa ocorreu a frio, utilizando-se destilado alcoólico comercial (vodka) com graduação de 38% (v/v) de álcool durante cinco dias, em recipiente de vidro previamente esterilizado em autoclave (121 °C por 15 minutos) e seco em estufa com circulação forçada de ar a 105 °C. Para a maceração foi utilizada a proporção de 40% de polpa para 60% de vodka. A maceração baseia-se em uma operação unitária que consiste em retirar e/ou extrair de um corpo, certas substâncias que são consideradas princípios ativos por meio da adição de um solvente (álcool) durante certo período.

O licor foi filtrado a vácuo utilizando-se um frasco kitassato, provido de um funil de Buckner, que foram conectados a uma bomba, através da saída lateral do frasco. Após a filtragem foi adicionado ao macerado, 30% de uma solução açucarada com a finalidade de promover a elevação dos teores de açúcares totais do licor e reduzir seu teor alcoólico. Essa solução foi elaborada com 24,5% de açúcar refinado. A bebida foi acondicionada em garrafa de vidro previamente esterilizada em autoclave a 121 °C por 15 minutos. Após o engarrafamento, o licor foi pasteurizado em banho-maria a 63 °C por 15 minutos. A pasteurização teve o objetivo de destruir possíveis micro-organismos patogênicos e deteriorantes, garantindo estabilidade da bebida durante a estocagem.

O licor pasteurizado foi armazenado à temperatura ambiente em local seco, limpo e arejado onde permaneceu durante toda a maturação, sendo realizada durante 20 dias. Nos três primeiros dias o licor foi aquecido a 45 °C durante 80 minutos para acelerar o processo de envelhecimento. Após a maturação o licor foi submetido às análises de controle de qualidade quanto aos parâmetros físico-químicos, microbiológicos e sensoriais.

Para a elaboração do licor de açaí seguiu-se metodologia descrita por Penha et al.⁹ com algumas modificações.

Análises físico-químicas, microbiológicas e sensorial

A polpa foi analisada quanto às variáveis: umidade; lipídeos; proteínas; cinzas; açúcares totais; açúcares redutores; açúcares não redutores; pH; fibras; sólidos solúveis; sólidos totais; acidez total titulável em ácido cítrico; cálcio; e ferro. O licor foi analisado quanto às variáveis: cinzas; pH; acidez total titulável em ácido cítrico; açúcares totais; açúcares redutores; açúcares não redutores; sólidos solúveis; densidade; teor alcoólico; e ferro. Todos os parâmetros analisados e citados foram determinados seguindo os procedimentos descritos no livro de Métodos do Instituto Adolfo Lutz¹⁰, com exceção do mineral ferro, que foi determinado seguindo o método da AOAC¹¹.

A polpa e o licor de açaí foram submetidos às análises microbiológicas quanto à presença de coliformes totais, coliformes termotolerantes, bolores e leveduras e *Salmonella*, segundo os métodos descritos pela American Public Health Association¹².

Na avaliação sensorial foram avaliados os atributos aparência, aroma, sabor, cor, consistência e textura. A mesma foi realizada em local centralizado (*in focus*).

Os testes foram realizados com 40 provadores de ambos os sexos, com faixa etária entre 20 e 42 anos. Para os testes sensoriais foram servidos 20 mL da amostra, à temperatura ambiente, em copos descartáveis de aproximadamente 25 mL, servidos em bandejas de isopor.

Para a avaliação das amostras foi utilizado o teste de aceitação segundo Dutcosky¹³, utilizando escala hedônica estruturada mista de nove pontos: 1) Desgostei muitíssimo; 2) Desgostei muito; 3) Desgostei moderadamente; 4) Desgostei ligeiramente 5) Nem gostei e/ou nem desgostei; 6) Gostei ligeiramente; 7) Gostei moderadamente; 8) Gostei muito; 9) Gostei muitíssimo. No teste aplicado foi verificada a intenção de compra do produto usando a escala mista de cinco pontos: 1) Certamente não compraria o produto; 2) Provavelmente não compraria o produto; 3) Tenho dúvidas se compraria ou não o produto; 4) Provavelmente compraria o produto; 5) Certamente compraria o produto.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização físico-química da polpa

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados, expressos em base úmida e seca, das análises físico-químicas da polpa de açaí utilizada na produção do licor. A umidade encontrada foi de $88,81 \pm 0,75\%$. Esse resultado está próximo aos valores obtidos por Alexandre et al.¹⁴ ($86,01 \pm 0,31\%$), Pereira et al.¹⁵ ($84,73 \pm 0,04\%$), Tonon et al.¹⁶ ($85,95 \pm 0,11\%$) e Nascimento et al.¹⁷ ($89,18\%$) que caracterizaram polpas de açaí. Segundo Chaves et al.¹⁸, a umidade de um alimento está relacionada com sua estabilidade, qualidade e composição, e pode afetar o armazenamento, embalagem e processamento.

A polpa revelou um teor de lipídeos de $6,32 \pm 0,05\%$ b.u. ($46,74 \pm 0,29\%$ b.s.), estando de acordo com o padrão especificado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)³, que estabelece variação nos teores de lipídeos de 20 a 60% b.s. A elevada concentração de lipídeos torna o açaí um fruto muito calórico em relação aos outros frutos tropicais. Segundo Rogez⁵ e Nascimento et al.¹⁷, o óleo de açaí, da mesma forma que o óleo de oliva e abacate, é rico em ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados. Nascimento et al.¹⁷ verificaram na polpa de açaí elevados teores “de ácidos graxos insaturados (68 a 71%) o que coloca esse fruto em uma condição atraente para o mercado de alimentos funcionais”. Alexandre et al.¹⁴ reportaram teor de lipídeos de $6,75 \pm 0,15\%$ b.u., estando próximo ao verificando no

Tabela 1. Análises físico-químicas da polpa de açaí

Parâmetros analisados	Valor médio (b.u.)	Valor médio (b.s.)	Valores Especificados (b.s.)*
Umidade (%)	$88,81 \pm 0,75$	-	-
Cinzas (%)	$0,39 \pm 0,03$	$2,90 \pm 0,23$	-
Proteína (%)	$2,96 \pm 0,14$	$26,42 \pm 0,19$	Min. 6,00
Lipídeos (%)	$6,32 \pm 0,05$	$46,74 \pm 0,29$	20-60
Açúcares totais (%)	$1,52 \pm 0,68$	$11,11 \pm 0,30$	Máx. 40,00
Açúcares redutores (%)	$1,23 \pm 0,10$	-	-
Açúcares não redutores (%)	$0,28 \pm 0,05$	-	-
Sólidos totais (%)	$11,49 \pm 0,15$	-	$\geq 8,00$
Fibras (%)	$3,81 \pm 0,12$	$34,14 \pm 0,55$	-
Cálcio (mg/100g)	$0,07 \pm 0,00$	-	-
Ferro (mg/100g)	$2,16 \pm 0,07$	-	-
Sólidos solúveis (°Brix)	$2,50 \pm 0,05$	-	-
Acidez total (g/100g)	$0,12 \pm 0,01$	-	Máx. 0,40
pH	$5,05 \pm 0,00$	-	4,00-6,20

*Valores estabelecidos pela Instrução Normativa nº 01, de 7 de Janeiro de 2000³, em gramas de matéria seca (b.s.); base úmida (b.u.).

presente estudo. Já Nascimento et al.¹⁷ e Canuto et al.¹⁹ verificaram teores de lipídios em polpa de açaí de $4,61\%$ b.u. e $4,6 \pm 0,0\%$ b.u., respectivamente, estando, portanto, inferiores ao valor encontrado neste estudo.

No tocante à proteína, verificou-se teor de $2,96 \pm 0,14\%$ b.u. ($26,42 \pm 0,19\%$ b.s.), evidenciando que a polpa utilizada no processamento atende às normas brasileiras³, para esse parâmetro. A legislação vigente³ estabelece teor mínimo de 6% b.s. de proteína na polpa de açaí. Esse teor está próximo ao verificado por Aguiar²⁰ ($3,6\%$ b.u.) e superiores aos encontrados por Alexandre et al.¹⁴ ($1,50 \pm 0,11\%$ b.u.) e Pereira et al.¹⁵ ($1,63 \pm 0,01\%$ b.u.).

A polpa de açaí apresentou teor de açúcares totais de $1,52 \pm 0,68\%$ b.u. ($11,11 \pm 0,30\%$ b.s.), inferior ao máximo permitido pela legislação³, que é de 40% b.s. Segundo Fregonesi et al.²¹, esses teores apresentaram “grandes oscilações de valores, o que pode ser devido a variação na quantidade de água utilizada no processo de extração, ao estágio de maturação dos frutos utilizados na produção da polpa congelada e/ou a época de colheita do fruto que pode alterar a sua composição centesimal. De acordo com Oliveira et al.², o teor de glicídios assimiláveis (glicose, frutose e sacarose) no açaí é relativamente baixo. Desta forma o açaí natural não pode ser considerado como uma bebida que possa disponibilizar energia de consumo rápido. Alexandre et al.¹⁴, estudando a conservação do

açaí, reportaram teor de açúcares totais de $0,50 \pm 0,03$ b.u., enquanto Nascimento et al.¹⁷ encontraram em polpa de açaí classificada como média para teor de açúcares totais de 5,63% b.u. Em relação aos açúcares redutores e não redutores foram verificados valores de $1,23 \pm 0,10\%$ b.u. e $0,28 \pm 0,05\%$ b.u., respectivamente. Santos et al.²², estudando a correlação entre atividade antioxidante e compostos bioativos de polpas comerciais de açaí, encontraram valores de açúcares redutores variando de 0,50% a 26,55% b.u. (polpa integral).

Quanto às fibras, a polpa de açaí apresentou teor de $3,81 \pm 0,12\%$ b.u. A concentração em fibras alimentares totais no açaí é notavelmente elevada, sendo o segundo composto em maior quantidade no produto, após os lipídeos. As fibras têm um papel muito importante na regulação do trânsito intestinal do consumidor. A ingestão diária aconselhada de fibras alimentares totais é de 35 g, por adulto e, os brasileiros têm tendência em consumi-las em menor quantidade. Em se tratando de consumidores assíduos de açaí, eles atingem facilmente a quantidade de fibras recomendadas, pois um litro de açaí classificado como médio contém 31,5 g de fibras alimentares totais, o que corresponde a 90% da recomendação diária. Portanto, o açaí pode ser considerado como uma excelente fonte de fibras. Porém 90% das fibras são insolúveis, sendo as fibras solúveis as mais benéficas à saúde².

Fregonesi et al.²¹, estudando as características de polpa de açaí congelada, verificaram variação nos teores de fibras de 1,68 a 2,09% b.u.

O teor de cinzas encontrado foi de 0,39 ± 0,03% b.u., estando inferior aos encontrados por Alexandre et al.¹⁴ ($0,43 \pm 0,03\%$ b.u.), Nascimento et al.¹⁷ (0,41% b.u.) e Pereira et al.¹⁵ ($0,64 \pm 0,01\%$ b.u.). A polpa apresentou ainda teores médios de cálcio de $0,07 \pm 0,00$ mg/100 g e ferro de $2,16 \pm 0,07$ mg/100 g. Segundo Oliveira et al.², além do valor energético, a polpa de açaí

também é um alimento relativamente rico em minerais, principalmente em potássio, cálcio, fósforo, magnésio e ferro. Segundo Anderson et al.²³, diferentemente do que coloca a crença popular, o açaí não pode ser considerado como uma boa fonte de ferro, pois além desse mineral se encontrar na forma férrica (ou não heme) contida somente em vegetais, esta é de menor biodisponibilidade no organismo.

O valor de pH ($5,05 \pm 0,00$) e acidez total ($0,12 \pm 0,01$ g/100 g) encontrados estão de acordo com o especificado pela legislação brasileira que estabelece valores compreendidos entre 4,00 e 6,20 para pH e máximo de 0,40 g/100 g para acidez. O açaí é uma bebida pouco ácida e sua acidez não varia com o tempo, já variações de pH são devidas aos ácidos orgânicos presentes no fruto². Tonon et al.¹⁶ verificaram em polpa de açaí valor de pH de $5,18 \pm 0,02$ e acidez de $0,34 \pm 0,02$ g/100 g, enquanto Santos et al.²² encontraram valores de pH das polpas variando de 3,55 a 4,89 e acidez total variando de 0,20 a 0,94 g/100 g.

A quantidade de sólidos solúveis (°Brix) foi de $2,50 \pm 0,05$. O baixo valor de sólidos solúveis é justificado pela adição de água no processo de extração da polpa, que promove diluição de seus constituintes. Nascimento et al.¹⁷ verificaram 2,7 °Brix e Santos et al.²² reportaram valores de sólidos solúveis variando de 2,40 a 42,00 °Brix (polpa integral), estando próximo ao reportando neste estudo.

Análise microbiológica da polpa e do licor de açaí

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados das análises microbiológicas da polpa e licor de açaí. Os padrões microbiológicos para o açaí congelado e comercializado no país são estabelecidos pela Instrução Normativa nº 1 de 07/01/2000 do MAPA³ que especificam máximo de 5×10^3 UFC/g para bolores e leveduras, 1 NMP/g para coliformes a 45 °C e ausência de *Salmonella* em 25 gramas de amostra. A ANVISA, por meio da resolução RDC nº 12, de 02/01/2001²⁴, estabelece padrões microbiológicos para alimentos, em particular para sucos e polpas, e especifica valor máximo de 10^2 NMP/g para coliformes a 45 °C e ausência de salmonela em 25 g de produto.

Quanto à polpa, observa-se que os testes microbiológicos revelaram ausência para coliformes totais (a 35 °C), coliformes termotolerantes (a 45 °C) e *Salmonella* e contagem de $2,0 \times 10^2$ UFC/g para bolores e leveduras. Esses resultados evidenciam que a polpa encontrava-se de acordo com as especificações exigida pela legislação vigente^{3,24}. Eto et al.²⁵ também verificaram

Tabela 2. Análises microbiológicas da polpa e licor de açaí

Parâmetros analisados	Resultados*	
	Polpa	Licor
NMP**/mL Coliformes totais (a 35 °C)	Ausência	Ausência
NMP**/mL Coliformes termotolerantes (a 45 °C)	Ausência	Ausência
UFC***/mL Bolores e leveduras	2×10^2	<10,00
<i>Salmonella</i>	Ausência	Ausência

* Valores estabelecidos pela Instrução Normativa nº 01, de 7 de Janeiro de 2000³ e pela Resolução RDC nº 12, de 02 de Janeiro de 2001²⁴;

Número mais provável; *Unidades formadoras de colônias

ausência de *Salmonella* e coliformes a 35 °C e 45 °C em todas as marcas de polpas de açaí avaliadas.

Rogez et al.²⁶ relatam que a contaminação microbiológica do açaí pode ocorrer por diversas razões: o substrato é propício para o crescimento dos contaminantes; a razão entre a superfície da fruta em contato com o ar e o peso da polpa é considerável (polpa de pequena espessura - 1 mm); a palmeira de açaí cresce em meios tropicais muito úmidos e quentes, o que é propício ao crescimento de microrganismos e de insetos; a falta de cuidado durante a colheita e o transporte da fruta é a origem de contaminação suplementar pelo contato com superfícies contaminadas (solo, plásticos, recipientes, etc.).

O licor apresentou ausência de coliformes (35 e 45 °C) e *Salmonella* e menos de 10 UFC/g de bolores e leveduras. A ausência de bolores de leveduras é justificada pela aplicação de pasteurização no licor, após engarrafamento.

Caracterização físico-química do licor

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados das análises físico-químicas do licor a base de açaí. Observa-se que o teor alcoólico foi de $16,00 \pm 0,50\%$ (v/v), em acordo com o especificado pela legislação vigente⁶, que estabelece variação de 15 a 54% (v/v) de álcool para licores de frutas. O teor alcoólico encontrado está próximo ao verificado por Barros et al.²⁷, que obtiveram 15% (v/v) em licor de leite. O teor alcoólico é um parâmetro importante na avaliação da aceitabilidade das bebidas alcoólicas, pois à medida que aumenta o teor alcoólico, ocorre uma diminuição na aceitabilidade²⁷. Segundo Vieira et al.²⁸, a maioria dos licores industriais de frutas possuem teor alcoólico, declarado em rótulo, entre 18 e 25% (v/v).

O licor apresentou densidade de $1,12 \pm 0,12$ g/mL. Teixeira et al.²⁹ elaboraram licor de banana e verificaram valores de densidade variando de 1,16 a 1,18 g/mL, estando próximos, portanto, ao observado neste estudo. Na presente pesquisa, o teor de sólidos solúveis foi de $38,60 \pm 0,10$ °Brix, sendo inferiores aos reportados por Penha et al.³⁰, que encontraram valores de sólidos solúveis em licor de polpa de acerola de $25,47 \pm 0,58$ °Brix e por Vieira et al.²⁸, que verificaram sólidos solúveis de $33,00 \pm 0,05$ °Brix em licor de camu-camu. Já Teixeira et al.²⁹ encontraram em licor de banana teor de sólidos solúveis variando de 36,00 a 40,67 °Brix, sendo semelhante ao observado no presente estudo.

Tabela 3. Análises físico-químicas do licor de açaí

Parâmetros analisados	Valor médio (base úmida)	Valores especificados*
Teor alcoólico (% v/v)	$16,00 \pm 0,50$	15-54
Acidez total (g/100g)	$0,04 \pm 0,00$	-
Açúcares totais (%)	$40,50 \pm 0,25$	-
Açúcares redutores (%)	$7,07 \pm 0,45$	-
Açúcares não redutores (%)	$31,76 \pm 0,35$	≥ 30
Sólidos solúveis (°Brix)	$38,60 \pm 0,10$	-
Densidade (g/mL)	$1,1225 \pm 0,12$	-
Cinzas (%)	$0,05 \pm 0,01$	-
Ferro (mg/100g)	$2,04 \pm 0,15$	-
pH	$3,52 \pm 0,05$	-

* Valores estabelecidos pelo Decreto n° 6.871, de 4 de Julho de 2009⁶

Os teores de açúcares totais, açúcares não redutores e açúcares redutores revelaram valores de $40,50 \pm 0,25\%$, $31,76 \pm 0,35\%$ e $7,07 \pm 0,45\%$, respectivamente. O resultado para açúcares não redutores encontra-se de acordo com o especificado pela legislação brasileira⁶ que estabelece teor igual ou superior a 30% para licor. A combinação adequada de açúcar e teor alcoólico desempenha papel fundamental na aceitação dos licores²⁷. Teixeira et al.²⁹, por exemplo, aplicaram testes de aceitabilidade em licores de banana e constataram que o licor de menor teor alcoólico e de menor teor de açúcar foi o mais aceito.

Os valores de acidez total e pH foram de $0,04 \pm 0,00$ g/100 mL e $3,52 \pm 0,05$, respectivamente, estando próximos aos resultados citados por Vieira et al.²⁸ em licor de camu-camu, que foram de $0,056 \pm 0,15$ g/100 mL para a acidez total e de $3,60 \pm 0,05$ para o pH. Penha et al.³⁰ reportaram valor do pH para licor de polpa de acerola de $3,66 \pm 0,06$, estando semelhante ao verificado neste trabalho, no entanto, Teixeira et al.²⁹ mencionaram, para licor de banana, valores de pH variando de 4,72 a 4,79, sendo superiores ao verificado no licor de açaí.

Observa-se que os teores de cinzas ($0,05 \pm 0,01\%$) e ferro ($2,04 \pm 0,15$ mg/100g) no licor de açaí foram semelhantes aos verificados na polpa, permitindo afirmar que houve migração de boa parte dos componentes minerais da polpa para o álcool através do processo de maceração.

Análise sensorial do licor

De acordo com a Tabela 4, o licor de açaí apresentou boa aceitação para todos os atributos avaliados, com aceitação média de 74,46%. O atributo aparência apresentou o maior índice de aceitação, correspondendo a 79,5%, seguido de consistência (78,0%), textura (74,4 %), sabor

(73,1%), cor (71,3%) e aroma (70,45%). A aparência de um produto é um dos fatores mais importantes relacionados à aquisição do mesmo no mercado, seguido dos atributos sabor, aroma e consistência¹³. Segundo Dutcosky¹³, para que um produto seja aceito quanto às suas características sensoriais é necessário que seu índice de aceitabilidade seja, no mínimo, de 70%. Vieira et al.²⁸ realizaram análise sensorial em licor de camu-camu e verificaram que o licor elaborado apresentou aceitabilidade média de 72,3% pelos provadores, em uma escala de 1 a 5 pontos, sendo semelhante a observada para o licor de açaí.

Todos os atributos avaliados no teste de aceitabilidade obtiveram escores entre 6,34 e 7,16, sendo a maior nota atribuída para a aparência (Tabela 4). Teixeira et al.²⁹ obtiveram escores compreendidos entre 6,0 e 8,0 ao estudarem o perfil sensorial de licor de banana, sendo semelhante ao verificado neste estudo. Barros et al.²⁷ reportaram escores para a análise sensorial de licor de leite variando de 5,8 a 6,38, estando inferior ao verificado para o licor de açaí.

Tabela 4. Valores médios das notas e aceitabilidade do licor de açaí

Escores	Aparência	Consistência	Sabor	Aroma	Cor	Textura
Média das notas	7,16	7,02	6,58	6,34	6,42	6,7
Aceitabilidade (%)	79,50	78,00	73,10	70,45	71,30	74,40

Descritores da análise sensorial com pontuação variando entre (1) desgostei muitíssimo e (9) gostei muitíssimo

O teste de intenção de compra do licor de açaí revelou resultado satisfatório, pois 74,8% dos julgadores assinalaram que provavelmente ou certamente comprariam o licor a base de açaí. Esse resultado está próximo aos de Vieira et al.²⁸ que verificaram intenção de compra do licor de camu-camu de 78,7%.

CONCLUSÃO

As características físico-químicas e microbiológicas da polpa atenderam às legislações vigentes, mostrando-se viáveis ao processamento de licor.

Os dados das análises físico-químicas demonstraram que o licor elaborado com açaí atendeu aos requisitos de qualidade exigidos pela norma brasileira.

Os resultados da análise sensorial reforçaram que o açaí foi a matéria-prima alternativa para elaboração de novos produtos alimentícios como licor, podendo ser fonte de renda para pequenos produtores na região norte do país.

REFERÊNCIAS

1. Sousa CL, Melo GMC, Almeida SCS. Avaliação da qualidade do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) comercializado na cidade de Macapá – AP. *Bol Centro Pesq Process Aliment*. 1999;17(2):127-36.
2. Oliveira MSP, Farias Neto JT, Pena RS. Açaí: técnicas de cultivo e processamento. Fortaleza: Instituto Frutal; 2007. p. 104.
3. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 01, de 7 de Janeiro de 2000. Aprova o regulamento técnico geral para fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpa de fruta. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 07 de jan. 2000.
4. Pereira EA. Propriedades termofísicas da polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) [dissertação de mestrado]. Campina Grande (PB): Universidade Federal da Paraíba; 2001.
5. Rogez H. Açaí: Preparo, composição e melhoramento da conservação. Pará: Universidade Federal do Pará; 2000. p. 360.
6. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 6.871, de 4 de Julho de 2009. 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, 05 de jun. 2009.
7. Ribeiro RD. Bebidas: Grande manual globo agricultura pecuária e receituário industrial. Porto Alegre: Editora Globo; 1979. p. 115.
8. Marques CD, Hellín LC, Ruiz LG, Aurora Zapata Revilla AZ. Analytical study of apple liqueurs. *Zeitschrift fuer Lebensmittel Untersuchung und Forschung*. 1994;198(1):60-5.
9. Penha EM, Della Modesta RC, Gonçalves EB, Silva ALS, Moretti RH. Efeito dos Teores de álcool e açúcar no perfil sensorial de licor de acerola. *Braz J Food Technol*. 2003;6(1):33-42.
10. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo - Brasil). Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4a ed. [1ª ed. Digital]. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz; 2008. [acesso 2011 Feb 10]. Disponível em: [http://www.ial.sp.gov.br/index.php?option=com_repositorio&Itemid=7&func=select&orderby=1&Itemid=7].
11. Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis*. 18th ed, 3ª Revisão. Washington; 2010. p.1094.
12. American Public Health Association. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4ª ed. Washington; 2001. p. 600.
13. Dutcosky SD. Análise sensorial de alimentos. Curitiba: DA Champagnat; 2007. p. 239.
14. Alexandre D, Cunha RL, Hubinger MD. Conservação do açaí pela tecnologia de obstáculos. *Cienc Tecnol Aliment*. 2004;24(1):114-9.
15. Pereira EA, Queiroz AJM, Figueirêdo RMF. Massa específica de polpa de açaí em função do teor de sólidos totais e da temperatura. *R Bras Eng Agríc Ambiental*. 2002;6(3): 526-30.
16. Tonon RV, Brabet C, Hubinger MD. Influência da temperatura do ar de secagem e da concentração de agente carreador sobre as propriedades físico-químicas do suco de açaí em pó. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2009;29(2):444-50.
17. Nascimento RJS, Couri S, Antoniassi R, Freitas SP. Composição em ácidos graxos do óleo da polpa de açaí extraído com enzimas e com hexano. *Rev Bras Frutic*. 2008;30(2):498-502.

18. Chaves MCV, Gouveia JPG, Almeida FAC, Leite JCA, Silva FLH. Caracterização físico-química do suco da acerola. *Rev Bio Ciênc Terra*. 2004;4(2):1-10.
19. Canuto GAB, Xavier AAO, Neves LC, Benassi MT. Caracterização físico-química de polpas de frutos da Amazônia e sua correlação com a atividade anti-radical livre. *Rev Bras Frutic*. 2010;32(4):1196-205.
20. Aguiar JPL. Tabela de composição de alimentos da Amazônia. *Acta Amaz*. 1996;26(1/2):121-6.
21. Fregonesi BM, Yokosawa CE, Okada IA, Massafera G, Braga Costa TM, Prado SPT. Polpa de açaí congelada: características nutricionais, físico-químicas, microscópicas e avaliação da rotulagem. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2010;69(3):387-95.
22. Santos GM, Maia GA, Sousa PHM, Costa JMC, Figueiredo RW, Prado GM. Correlação entre atividade antioxidante e compostos bioativos de polpas comerciais de açaí (*Euterpe oleracea* Mart). *Arch Latinoam Nutr*. 2008;58(2):187-92.
23. Anderson L, Dibble MV, Turkki PR, Mitchell HS, Rynbergen HJ. *Nutrição*. 17^a ed. Cap. 6. São Paulo (SP): Guanabara Koogan;1998. p. 737.
24. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC n° 12, de 02 de Janeiro de 2001. Aprova o Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 02 de jan. 2001.
25. Eto DK, Kano AM, Borges MTMR, Brugnaro C, Ceccato-Antonini SR, Verruma-Bernardi MR. Qualidade microbiológica e físico-química da polpa e mix de açaí armazenada sob congelamento. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2010;69(3):304-10.
26. Rogez et al. Identificação dos principais fungos e leveduras presentes na polpa do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). XIX Congresso Brasileiro de Microbiologia; v.1; outubro de 1997; Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microbiologia. p. 269 [Resumo].
27. Barros JC, Santos PA, Isepon JS, Silva JW, Silva MAP. Obtenção e avaliação de licor de leite a partir de diferentes fontes alcoólicas. *Gl Sci Technol*. 2008;1(4):27-33.
28. Viera VB, Rodrigues JB, Brasil CCB, Rosa CS. Produção, caracterização e aceitabilidade de licor de camu-camu (*Myrciaria dúbia* (H.B.K.) Mcvaugh). *Alim Nutr*. 2010;21(4):519-22.
29. Teixeira LJQ, Ramos AM, Chaves JBP, Silva PHA, Stringheta PC. Avaliação tecnológica da extração alcoólica no processamento de licor de banana. *Bol Centro Pesq Process Aliment*. 2005;23(2):329-46.
30. Penha EM, Braga NCAS, Matta VM, Cabral LMC, Modesta RCD, Freitas SC. Utilização do retentado da ultrafiltração do suco de acerola na elaboração de licor. *Bol Centro Pesq Process Aliment*. 2001;19 (2):267-76.
31. Teixeira LJQ, Ramos AM, Chaves JBP, Stringheta PC. Testes de aceitabilidade de licores de banana. *R Bras Agrociência*. 2007;13(2):205-9.

***Pseudomonas aeruginosa*: ocorrência e suscetibilidade aos agentes antimicrobianos de isolados de amostras de água tratada utilizada em solução de diálise**

Pseudomonas aeruginosa: the occurrence and the antimicrobial susceptibility of bacteria isolates from treated water samples utilized for preparing dialysis solution

RIALA6/1410

Jacqueline Tanury Macruz PERESI*, Ivete Aparecida Zago Castanheira de ALMEIDA, Inara Siqueira de Carvalho TEIXEIRA, Sonia Izaura de Lima e SILVA, Elisabete Cardiga ALVES, Denise Fusco MARQUES, Aparecida Klai RIBEIRO

*Endereço para correspondência: Centro de Laboratório Regional de São José do Rio Preto – X, Instituto Adolfo Lutz, Rua Alberto Sufredine Bertoni n°. 2325 – São José do Rio Preto – SP – CEP. 15060-020, e-mail: jtmperesi@ial.sp.gov.br, Tel: 17- 32242602
Recebido 11.10.2011 – Aceito para publicação 20.12.2011

RESUMO

A pesquisa de *Pseudomonas aeruginosa* foi realizada em amostras de água tratada utilizada na solução de diálise de oito Unidades de Terapia Renal Substitutiva (UTRS) em quatro municípios do noroeste do estado de São Paulo e o perfil de resistência aos agentes antimicrobianos das cepas isoladas foi avaliado por teste de sensibilidade (TSA). Entre 2000 e 2009 foram analisadas 508 amostras seguindo-se a metodologia descrita no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (2005) e 43 (8,5%) evidenciaram contaminação por *P. aeruginosa*. Dessas amostras, 55,8%, 23,3% e 20,9% foram, respectivamente, oriundas da sala branca, ponto de pós-osmose/deionizador e sala amarela das diferentes UTRS. A frequência de isolamento da bactéria foi maior em amostras da UTRS A (53,5%) e em 2004 houve a detecção de maior número de amostras contaminadas (16,7%). Dos 43 isolados, 38 foram analisados pelo TSA, sendo identificadas resistência intermediária a gentamicina em um (2,6%) e resistência a aztreonam e ticarcilina/ácido clavulânico em outro isolado (2,6%). Pelas implicações da *P. aeruginosa* em saúde pública, sua investigação no monitoramento de qualidade da água para diálise constitui medida necessária e sua ocorrência indica as possíveis deficiências no controle da rede de distribuição da água. **Palavras-chave.** *Pseudomonas aeruginosa*, água tratada para solução de diálise, resistência bacteriana, contaminação bacteriana.

ABSTRACT

This study reports the presence of *Pseudomonas aeruginosa* in samples of treated water used in the dialysis solution in eight Renal Replacement Therapy Units in four cities of the northwest region of São Paulo state; and the isolated strains were analyzed on the resistance profile by antimicrobial susceptibility testing. From 2000 to 2009, 508 samples were analyzed following Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (2005). *P. aeruginosa* was isolated from 43 (8.5%) samples, and 55.8, 23.3 and 20.9% of them were from white room, post-osmosis/deionizer point and yellow room of different units, respectively. The A Unit water samples have showed the highest bacterium isolation frequency (53.5%); and the detection of the highest number of contaminated samples (16.7%) occurred in 2004. Of all the 43 isolates, 38 were submitted to the antimicrobial susceptibility testing; an intermediate resistance to gentamicin in one sample (2.6%) and resistance to aztreonam and ticarcillin / clavulanic acid in another (2.6%) were identified. Considering the implications of *P. aeruginosa* to the public health, this survey of bacterium should be included in monitoring water quality for hemodialysis and this procedure might be an indicator for evidencing deficiencies on the water distribution network control. **Keywords.** *Pseudomonas aeruginosa*, treated water for dialysis solution, bacterial resistance, bacterial contamination.

INTRODUÇÃO

O censo realizado em 2010 pela Sociedade Brasileira de Nefrologia estimou o total de 92.091 pacientes em tratamento dialítico no país¹. Trata-se de um meio artificial de remover do sangue as impurezas, corrigir o equilíbrio ácido-básico e os distúrbios eletrolíticos do paciente renal crônico.

Os pacientes no tratamento regular de hemodiálise são expostos, semanalmente, a centenas de litros de água de diálise por meio de circulação extra corporal². Se a água não for corretamente tratada, vários contaminantes químicos, bacteriológicos e tóxicos poderão ser transferidos para os pacientes³.

A ocorrência de reações pirogênicas e bacteremia são consequências potenciais da má qualidade microbiológica da água tratada para a preparação do dialisato e para o reprocessamento dos dializadores (reuso)⁴. Diversos fatores favorecem a multiplicação bacteriana nos sistemas do tratamento da água para hemodiálise, incluindo filtro de areia e de carbono ou componentes do sistema com baixa circulação, como os tanques e as torneiras⁵. A formação de biofilme facilita a persistência bacteriana em pontos diferentes do sistema, protege as bactérias da desinfecção e aumenta o risco de contaminação e os níveis de endotoxina na água⁶.

Alguns estudos observaram uma relação direta entre a ocorrência de casos de bacteremia causados por bactérias Gram negativas e o isolamento desses micro-organismos a partir da água purificada, possivelmente devido a falhas na integridade da membrana ou a utilização de água contaminada no reprocessamento dos dializadores⁷⁻⁹, sendo *Pseudomonas aeruginosa*, frequentemente, associada a estas ocorrências¹⁰⁻¹³. Sua capacidade de sobrevivência neste meio pode ser explicada pelas suas poucas necessidades nutricionais e tolerância à variação de condições físicas. Um exemplo disso é a sua capacidade de proliferação em água destilada e em águas minerais¹⁴.

P. aeruginosa é um dos principais agentes de infecção em indivíduos imunodeprimidos, raramente afetando indivíduos saudáveis. Portanto, sua patogênese deve ser discutida no contexto de uma infecção oportunista, sendo necessária a existência de quebra de barreiras ou de defeitos específicos de alguns dos mecanismos de defesa imunológica¹⁵. Sua importância clínica está baseada na difícil erradicação da infecção e contínuos fracassos terapêuticos, consequência direta da ampla expressão de

fatores de virulência, assim como a resistência natural e adquirida a muitos antibióticos e desinfetantes¹⁴.

O objetivo deste estudo foi relatar a presença de *P. aeruginosa* em amostras de água tratada utilizadas na solução de diálise em Unidades de Terapia Renal Substitutiva (UTRS) localizadas em quatro municípios da região noroeste do estado de São Paulo, e analisar o perfil de suscetibilidade aos agentes antimicrobianos das cepas isoladas.

MATERIAL E MÉTODOS

No período de 2000 a 2009, foram analisadas 508 amostras de água tratada para solução de diálise de oito UTRS pertencentes aos municípios de São José do Rio Preto, Catanduva, Votuporanga e Fernandópolis. As coletas foram realizadas pelos respectivos órgãos municipais de Vigilância Sanitária (VISA) e pelo Grupo de Vigilância Sanitária de São José do Rio Preto-SP (GVS XXIX) obedecendo, inicialmente, a uma programação instituída pelo Centro de Laboratório Regional do Instituto Adolfo Lutz - São José do Rio Preto - X (CRL-IAL-SJRP-X) e VISA de São José do Rio Preto estendendo, posteriormente, por meio do Programa Estadual de Monitoramento da Água Tratada para Hemodiálise do Estado de São Paulo, aos demais municípios da região.

As coletas das amostras de água ocorreram em pontos de pós-tratamento e/ou na rede de distribuição das UTRS localizadas nas salas brancas e/ou amarelas, ressaltando que não foram realizadas coletas simultâneas nos três pontos citados.

As amostras coletadas foram encaminhadas ao CRL-IAL-SJRP-X e submetidas à pesquisa dos parâmetros previstos na legislação vigente¹⁶ (bactérias do grupo coliforme e bactérias heterotróficas), além da pesquisa de *P. aeruginosa* (parâmetro não previsto) de acordo com o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (2005)¹⁷. Os isolados de *P. aeruginosa* foram identificados segundo o critério apresentado pelo *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2005)¹⁸.

Do total de cepas confirmadas como *P. aeruginosa*, 38 (88,4%) foram submetidas ao teste de disco-difusão (método de Kirby e Bauer)¹⁹ frente aos seguintes antimicrobianos: ceftazidima (30 µg), gentamicina (10 µg), tobramicina (10 µg), piperacilina-tazobactam (100/10 µg), amicacina (30 µg), aztreonam (30 µg), cefepime (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), levofloxacina (5 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), ticarcilina-ácido clavulânico

(75/10 µg). A leitura e interpretação dos resultados foram realizadas de acordo com o *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2011)²⁰.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No Brasil, após o acidente em Caruaru (PE) ocorrido em 1996, onde 52 pacientes em terapia renal foram a óbito pela contaminação da água utilizada para hemodiálise por toxinas de cianobactérias, o Ministério da Saúde estabeleceu normas de funcionamento a serem cumpridas pelas Unidades de Diálise, por meio da Portaria GM/MS nº 2042 (1996) e atualmente regulamentada pela Resolução RDC nº 154 de 15/06/2004 da ANVISA, republicada em 31/05/2006, sendo posteriormente modificada em 14/02/2011 pela Resolução RDC ANVISA nº 6²¹. Nesta Resolução, inclui-se também, o controle da qualidade da água tratada utilizada na preparação da solução de diálise, um dos principais veiculadores microbianos no sistema de diálise devendo assim, ser rigorosamente monitorada, no intuito de prevenção de complicações para os pacientes.

Ressalta-se que, nas normas citadas não foi incluída a pesquisa de *P. aeruginosa*, lembrando que o gênero bacteriano mais frequentemente isolado em águas tratadas para diálise, solução dialisadora e dialisato tem sido *Pseudomonas*^{3,10,22} e que sua presença está relacionada à ocorrência de endotoxinas bacterianas e à possibilidade de formação de biofilmes²³, representando, portanto, riscos à saúde dos pacientes que necessitam do tratamento.

Os resultados deste estudo revelaram que no período de 2000 a 2009, 43 (8,5%) das 508 amostras de água de diálise analisadas apresentaram-se contaminadas por *P. aeruginosa*. A distribuição destas amostras, por UTRS, encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1. Distribuição, por UTRS, do total de amostras analisadas e de amostras contaminadas por *P. aeruginosa*

UTRS	Analisadas	Total de amostras	
		Contaminadas por <i>P. aeruginosa</i>	
		Nº.	%
A	150	25	16,7
B	130	10	7,7
C	71	3	5,5
D	142	3	2,1
E	4	1	25,0
F	3	1	33,3
G	5	0	0
H	3	0	0
Total	508	43	8,5

O índice de detecção de *P. aeruginosa*, neste estudo, foi menor do que o encontrado por Montanari et al.²⁴, que isolaram este agente em 25 (28,4%) das 88 amostras de água coletadas após tratamento de osmose reversa em uma UTRS no interior do estado de São Paulo, no período de 2004 a 2006. Simões e Pires²⁵ em estudo de duas UTRS do município de Campinas isolaram *P. aeruginosa* em 19 (9,5%) das 200 amostras analisadas, sendo que destas, 15,8% foram isoladas de água tratada não adicionada de sais. Reis et al.²⁶ isolaram *P. aeruginosa* em 19 (14,1%) das 135 amostras de água de diferentes pontos das UTRS da rede pública e privada do Distrito Federal. Ferreira²⁷ isolou 56 cepas de *P. aeruginosa* de amostras de água provenientes de clínicas de diálise do estado do Rio de Janeiro no período de 2004-2008.

Apesar das UTRS A, B e D apresentarem números aproximados de amostras analisadas, houve significativa diferença de qualidade da água quanto à presença de *P. aeruginosa*, sendo a unidade A, aquela que apresentou o maior percentual de amostras contaminadas (16,7%), contrastando com a unidade D, que teve 2,1% de positividade. A detecção deste micro-organismo é de grande importância em saúde pública tendo em vista sua capacidade de sobrevivência, a frequente multirresistência aos agentes antimicrobianos e a implicação em reações pirogênicas e em surtos de bacteremia.

Do total de amostras com contaminação por *P. aeruginosa*, 27 (62,8%) apresentaram-se satisfatórias, segundo a legislação vigente, quanto à contagem de bactérias heterotróficas (CBH), ou seja, menor ou igual a 200 UFC/mL e 16 (37,2%) apresentaram-se insatisfatórias (acima de 200 UFC/mL), cuja variação encontrada foi de $2,1 \times 10^2$ a $3,2 \times 10^4$ UFC/mL, conforme demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2. Nível de contaminação, por bactérias heterotróficas, das amostras de água de diálise com presença de *P. aeruginosa*

Nível de contaminação por bactérias heterotróficas (UFC/mL)	UTRS						Total	
	A	B	C	D	E	F	Nº.	%
0 a $2,0 \times 10^2$	15	9	0	2	1	0	27	62,8
$2,1 \times 10^2$ a $9,9 \times 10^2$	5	1	1	1	0	1	9	20,9
$1,0 \times 10^3$ a $9,9 \times 10^3$	4	0	2	0	0	0	6	14,0
$1,0 \times 10^4$ a $3,2 \times 10^4$	1	0	0	0	0	0	1	2,3
Total	25	10	3	3	1	1	43	100

De acordo com a Resolução RDC 154 da ANVISA, a contagem de bactérias heterotróficas constitui parâmetro microbiológico de avaliação da qualidade da água de diálise permitindo dimensionar a população bacteriana e indicar

suas condições higiênicas. Destacando-se a UTRS A que apresentou o maior número de isolamento de *P. aeruginosa*, verifica-se que 40,0% das amostras encontravam-se fora do padrão legal para CBH. Ressalta-se que, das 18 amostras com presença de *P. aeruginosa* oriundas da sala branca desta mesma unidade, 9 (50,0%) apresentaram CBH acima do limite estabelecido e dessas, 55,6% acima de $1,0 \times 10^3$ UFC/mL, atingindo níveis de até $3,2 \times 10^4$ UFC/mL.

Embora *P. aeruginosa* não tenha sido quantificada nas amostras analisadas no presente estudo, mas considerando sua inclusão na CBH e, ainda, a possibilidade de representar grande parte da população bacteriana encontrada, tornam-se preocupantes estes achados laboratoriais na água tratada utilizada nas soluções de diálise.

A elevada contaminação bacteriana pode estar relacionada à qualidade da água de alimentação, embora seja mais associada à eficácia do processo de desinfecção e manutenção do sistema de tratamento e distribuição da água tratada²⁸⁻³¹, ressaltando a possibilidade de rompimento da membrana de osmose reversa, o que permite a passagem de micro-organismos e endotoxinas^{3,29,31}. Estudos demonstraram que os excessivos níveis de bactérias no dialisato (água adicionada de sais) são responsáveis por reações pirogênicas e bacteremia, sendo a endotoxina, derivada de bactérias Gram negativas, capaz de penetrar na membrana semipermeável do dialisador³².

Tabela 3. Distribuição de amostras com presença de *P. aeruginosa*, por ponto de coleta, nas UTRS

UTRS	Total de amostras com presença de <i>P. aeruginosa</i>			
	Pós- tratamento	Sala amarela	Sala branca	Total
A	7	-	18	25
B	1	7	2	10
C	1	2	0	3
D	1	0	2	3
E	0	0	1	1
F	0	0	1	1
Total	10 (23,3%)	9 (20,9%)	24 (55,8%)	43

Pode-se observar na Tabela 3, a distribuição dos isolados de *P. aeruginosa* em amostras coletadas em pontos pós-tratamento, indicando possíveis falhas no processo de tratamento e distribuição da água. A escolha do tipo de sistema de tratamento da água é de vital importância nas unidades de diálise, não significando que a melhor alternativa seja a solução de todos os problemas relacionados à sua qualidade, pois a manutenção e monitoramento do sistema são fundamentais²³.

Nota-se que 41,9% e 16,2% do total de isolamentos ocorreram na sala branca da UTRS A e na sala amarela da UTRS B, respectivamente, indicando a vulnerabilidade dos pacientes, nelas tratados, aos agravos decorrentes dessa contaminação. Ressalta-se que, na sala amarela são tratados os pacientes portadores de hepatite B, portanto com possibilidade de maior comprometimento da saúde.

Na UTRS A, em 14 dias no decorrer do período analisado foram coletadas amostras, simultaneamente, nos pontos de pós-tratamento e na sala branca, sendo que em seis das 14 coletas distintas houve detecção do concomitante de *P. aeruginosa*, ocorrendo quatro episódios em 2004 e dois em 2005. Nas demais unidades de tratamento, não houve detecção simultânea de *P. aeruginosa* nos diferentes pontos amostrados. Este fato ocorrido na UTRS A demonstra a disseminação deste agente ao longo do sistema e/ou um possível problema de integridade das membranas de osmose reversa. A disseminação de bactérias ocorre, particularmente, quando as medidas básicas de prevenção e controle não são respeitadas³³. Nas demais datas de coleta, a contaminação ocorreu isoladamente, apenas no ponto de pós-tratamento (uma coleta) e na sala branca (12 coletas) indicando, neste último caso, a possibilidade, entre outras, de formação de biofilme.

A mesma situação pode ter ocorrido na UTRS B, onde em todas as coletas que incluíram amostras positivas para *P. aeruginosa* na sala branca ou na amarela, também foram obtidas amostras do ponto pós-tratamento que, na análise, revelaram resultado negativo para este agente.

A Figura 1 apresenta a distribuição anual dos isolados de *P. aeruginosa* nas amostras analisadas. Observa-se que, 23 (53,5%) deles ocorreram no ano de 2004, constituindo o ano de maior isolamento nas UTRS A, B e D, ressaltando que na UTRS A, 8 dos 15 isolamentos foram procedentes de dois diferentes pontos

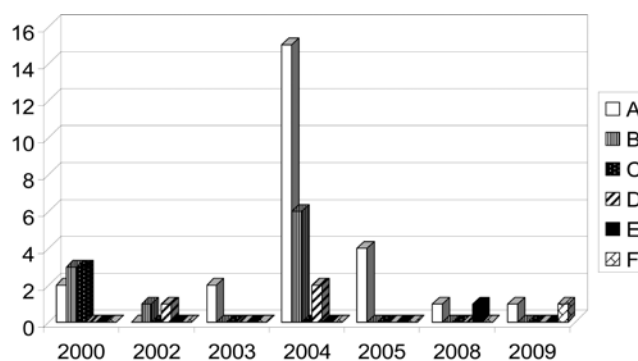


Figura 1. Distribuição anual de amostras com presença de *P. aeruginosa*, por UTRS

(pós-tratamento e sala branca) coletados em quatro datas distintas. Nos anos de 2001, 2006 e 2007 não houve isolamento em nenhuma das UTRS analisadas.

Nos últimos anos, a resistência antimicrobiana passou a ser considerada fenômeno ecológico global, onde micro-organismos e genes de resistência movem-se facilmente entre os quatro maiores ecossistemas: solo; água; corpo humano; e animais. O ambiente aquático é considerado o principal disseminador de bactérias resistentes. A distribuição geográfica de genes de resistência neste ambiente tem sido investigada em todos os continentes, indicando o papel destes compartimentos ambientais como reservatórios³⁴.

Dos 43 isolados de *P. aeruginosa*, 38 foram submetidos ao teste de suscetibilidade aos antimicrobianos, sendo 36 (94,7%) sensíveis a todos antibióticos testados. No ano 2000, foi identificada a resistência intermediária à gentamicina em um (2,6%) isolado de amostra oriunda da sala amarela da unidade B. Na mesma unidade, em 2004, foi detectada resistência à dois antibióticos, aztreonam e ticarcilina/ácido clavulânico, em apenas uma (2,6%) cepa de *P. aeruginosa*, procedente também da sala amarela.

Ressalta-se que no mesmo momento destas coletas, também foram obtidas para análise amostras do ponto de pós-tratamento de osmose reversa, todas com resultado negativo para pesquisa de *P. aeruginosa*. Analisando este fato, é provável que, nas duas ocasiões onde foram detectadas cepas resistentes, houvesse formação de biofilme na tubulação desta sala de tratamento com possível disseminação de bactérias resistentes entre os pacientes em tratamento.

Os biofilmes são os maiores responsáveis pela contaminação da água tratada para diálise, com consequências para saúde pública, associadas a custos elevados³⁵. O controle da formação de biofilmes é uma grande preocupação, uma vez que o seu desprendimento causa aumento dos níveis de endotoxinas permeáveis às membranas utilizadas no processo de purificação do sangue dos pacientes podendo causar uma série de quadros clínicos e até morte. O seu controle pode ser direcionado pela desinfecção com biocidas, biodispersantes, tecnologia enzimáticas e pela minimização do nutriente limitante^{35,36}.

Cabe ressaltar que as cepas de bactérias resistentes a múltiplos antibióticos não apresentam maior potencial de transmissibilidade ou virulência quando comparada às cepas sensíveis, entretanto, as infecções envolvendo agentes multirresistentes apresentam opção terapêutica restrita³³. O uso de antibióticos induz a pressão seletiva sobre as

cepas bacterianas, favorecendo a preservação daquelas que apresentam resistência em relação às sensíveis^{37,38}.

A resistência apresentada pela *P. aeruginosa* neste estudo é baixa quando comparada aos resultados de outros autores. Borges et al.³⁹ revelaram resistência entre 6,7% e 80,0% das cepas frente aos 11 antimicrobianos testados, sendo 13,3% a ticarcilina/ácido clavulânico e 33,3% a gentamicina e Arvanitidou et al.²² encontraram 6,0% a 100% de resistência em isolados de *P. aeruginosa* entre 8 antimicrobianos testados, embora ambos tenham analisado também amostras de dialisato.

CONCLUSÃO

A detecção de *P. aeruginosa* em 8,5% das amostras de água tratada para diálise revela o risco que os pacientes são expostos quando submetidos a esse tratamento e ressalta a importância da adoção de medidas de controle e ações voltadas à saúde do paciente renal crônico.

Considerando as implicações da *P. aeruginosa* em saúde pública, a inclusão da sua pesquisa nos padrões de qualidade da água para diálise constitui uma medida necessária onde, por meio de monitoramento sistemático, a sua presença pode revelar possíveis deficiências no controle da rede de distribuição da água nas unidades e promover a implementação da manutenção do sistema.

O baixo índice de resistência bacteriana encontrado (5,2%) pode ser atribuído ao fato das amostras analisadas serem de origem ambiental e não humana, as quais estariam mais sujeitas ao isolamento de cepas multirresistentes em decorrência da pressão seletiva causada pelo maior contato com drogas antimicrobianas.

REFERÊNCIAS

1. Sociedade Brasileira de Nefrologia. [acesso 2011 Ago 05]. Disponível em: [http://www.sbn.org.br/leigos/pdf/censo2010finalizado_leigos.ppt].
2. Arvanitidou M, Spaia S, Katsinas C, Pangidis P, Constantinidis T, Katsouyannopoulos V, et al. Microbial quality of water and dialysate in all haemodialysis centres of Greece. *Nephrol Dial Transplant*. 1998;13:949-54.
3. Silva AMM, Martins CTB, Ferraboli R, Jorgetti V, Romão Jr JE. Revisão/Atualização em diálise: água para hemodiálise. *J Bras Nefrol*. 1996;18(2):180-8.
4. Favero MS, Alter MJ, Bland LA. Dialysis-associated infections. In: Bennett JV, Brachman PS, Sanford JP (eds.). *Hospital Infections*. Boston: Little Brown; 1992. p. 375-403.

5. Du Molin GC, Coleman EC, Hedley-Whyte J. Bacterial colonization and endotoxin content of a new renal dialysis water system composed of acrylonitrile butadiene styrene. *Appl Env Microbiol*. 1987;53:1322-6.
6. Morin P. Identification of the bacteriological contamination of a water treatment line used for haemodialysis and its disinfection. *J Hosp Infect*. 2000;45:218-24.
7. Wang SA et al. An outbreak of gram-negative bacteremia in hemodialysis patients traced to hemodialysis machine waste drain ports. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1999;20(11):746-51.
8. Magalhães M, Doherty C, Govan JRW, Vandamme P. Polyclonal outbreak of *Burkholderia cepacia* complex bacteraemia in haemodialysis patients. *J Hosp Infect*. 2003;54:120-3.
9. Yan H, Shi L, Alam MJ, Li L, Yang L, Yamasaki S. Usefulness of Sau-PCR for molecular epidemiology of nosocomial outbreaks due to *Burkholderia cepacia* which occurred in a local hospital in Guangzhou, China. *Microbiol Immunol*. 2008;52:283-6.
10. Pisani B, Simões M, Prandi MA, Rocha MMM, Gonçalves CR, Vaz TMI, et al. Surto de bacteremia por *Pseudomonas aeruginosa* na unidade de hemodiálise de um hospital de Campinas, São Paulo, Brasil. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2000;59(1/2):51-6.
11. Beck-Sague CM, Jarvis WR, Bland LA, Arduino MJ, Aguero SM, Verosic G. Outbreak of Gram - Negative Bacteremia and Pyrogenic Reactions in a Hemodialysis Center. *Am J Nephrol*. 1990;10:397-403.
12. Welbel SF, Schoendorf K, Bland LA, Arduino MJ, Groves C, Schable B et al. An outbreak of gram-negative bloodstream infections in chronic hemodialysis patients. *Am J Nephrol*. 1995; 15:1-4.
13. Rudnick JR, Arduino MJ, Bland LA, Cusick L, McAllister SK, Agüero SM et al. An outbreak of pyrogenic reactions in chronic hemodialysis patients associated with hemodialyzer reuse. *J Artif Organs*. 1995;19:289-94.
14. Lincopan N, Trablusi LR. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Trablusi LR, Alterthum F, editores. *Microbiologia*. São Paulo: Editora Atheneu; 2008. p. 369-81.
15. Levin ASS, Arruda EAG. Infecções por *Pseudomonas*. In: Veronesi R, Focaccia R, editores. *Tratado de infectologia*. São Paulo: Editora Atheneu; 1996. p.739-45.
16. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução Diretoria Colegiada Nº154, de 15 de junho de 2004. Estabelece o Regulamento Técnico para o funcionamento dos serviços de Diálise. Diário Oficial [da] União. Brasília, DF; 17 jun 2004. Republicada em 31 mai. 2006. [acesso 2011 Jul 01]. Disponível em: [http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?].
17. American Public Health Association. *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*. 21st ed. Washington: APHA; 2005.
18. Palleroni NJ. Genus I. *Pseudomonas*. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM. (eds.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. East Lansing: Springer; 2005, p.323-79.
19. Bauer AW, Kirby Wmm, Sherris JSC, Turk M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*. 1966;45(4):493-6.
20. Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. Twentieth Informational Supplement M100-S20, 30(1), Wayne; 2011.
21. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução Diretoria Colegiada ANVISA nº 6, de 14/02/2011. Altera a Resolução RDC nº 154, de 15/06/2004, que estabelece o Regulamento Técnico para o funcionamento dos serviços de Diálise, republicada em 31/05/2006. Diário Oficial [da] União. Brasília, DF; 15 fev. 2006. Seção 1. p.55.
22. Arvanitidou M, Vayona A, Spanakis N, Tsakris A. Occurrence and antimicrobial resistance of Gram-negative bacteria isolated in haemodialysis water and dialysate of renal units: results of a Greek multicentre study. *J Appl Microbiol*. 2003;95:80-5.
23. Bugno A, Almodóvar AAB, Pereira TC, Auricchio M. Detecção de bactérias Gram-negativas não fermentadoras em água tratada para diálise. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2007;66(2):172-5.
24. Montanari LB, Sartori FG, Cardoso MJO, Varo SD, Pires RH, Leite CQF, et al. Microbiological contamination of a hemodialysis center water distribution system. *Rev Inst Med Trop S. Paulo*. 2009;51(1):37-43.
25. Simões M, Pires MFC. Água de diálise: ocorrência de leveduras, *Pseudomonas aeruginosa* e bactérias heterotróficas. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2004;63(2):224-31.
26. Reis JDP, Faria NC, Filter A. Qualidade bacteriológica da água para hemodiálise do Distrito Federal. *Rev Saúde Distr Fed*. 1998;9(2):39-43.
27. Ferreira JAB. *Diversidade genética, perfil de resistência aos antimicrobianos e produção de biofilme de amostras de Pseudomonas aeruginosa isoladas da água utilizada em unidades de terapia renal substitutiva [dissertação de mestrado]*. Rio de Janeiro (RJ): Fundação Oswaldo Cruz; 2009. [acesso 2011 Ago 05]. Disponível em: [http://teses.icict.fiocruz.br/pdf/3551_JoanaAngelicaBarbosaFerreira.pdf].
28. Vorbeck-Meister I, Sommer R, Vorbeck F, Hörl WH. Quality of water used for haemodialysis: bacteriological and chemical parameters. *Nephrol Dial Transplant*. 1999;14:666-75.
29. Roth VR, Jarvis WR. Outbreaks of infection and or pyrogenic reactions in dialysis patients. *Semin Dial*. 2000;13(2):92-6.
30. Smeets E, Kooman J, van der Sande F, Stobberingh E, Frederik P, Claessens P et al. Prevention of biofilm formation in dialysis water treatment systems. *Kidney Int*. 2003;63:1574-6.
31. Pontoriero G, Pozzoni P, Andrulli S, Locatelli F. The quality of dialysis water. *Nephrol Dial Transplant*. 2003;18 (suppl 7):vii21-5.
32. Lonnemann, G. The quality of dialysate: an integrated approach. *Kidney Int*. 2000;76:S112-9.
33. Padoveze MC, Oliveira EL. Bactérias Multi-Resistentes. [acesso 2011 Ago 12]. Disponível em: [http://www.hospvirt.org.br/enfermagem/port/bacterias_multi.html].
34. Laroche E, Pawlak B, Berthe T, Skurnik D, Petit F. Occurrence of antibiotic resistance and class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli* isolated from a densely populated estuary (Seine, France). *FEMS Microbiol Ecol*. 2009;68(1):118-30.
35. Marion K, Pasmore M, Freny J, Delawari E, Renaud F, Costerton JW, Traeger J. A new procedure allowing the complete removal and prevention of hemodialysis biofilms. *Blood Purif*. 2005;23(5):339-48.
36. Cappelli G, Riccardi M, Perrone S, Bondi M, Ligabue G, Albertazzi A. Water treatment and monitor disinfection. *Hemodial Int*. 2006;10(1):13-8.
37. Del Fiol FS, Mattos Filho TR, Groppo FC. Resistência bacteriana. *Rev Bras Med*. 2000;57(10):85-7.
38. Wenzel RP, Edmond MB. Managing antibiotic resistance. *N Engl J Med*. 2000;343(26):1961-3.
39. Borges CR, Lascowski KM, Filho NR, Pelayo JS. Microbiological quality of water and dialysate in a hemodialysis unit in Ponta Grossa-PR, Brazil. *J Appl Microbiol*. 2007;103(5):1791-7.

Ocorrência de *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) em alimentos infantis adquiridos em um hospital público

Occurrence of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in infant food purchased in a public hospital

RIALA6/1411

Luciana Giorgetti FREITAS, Christiane Asturiano RISTORI, Miyoko JAKABI, Ana Maria Ramalho de PAULA, Ruth Estela Gravato ROWLANDS*

*Endereço para correspondência: Núcleo de Microbiologia, Centro de Alimentos, Instituto Adolfo Lutz. Av. Dr. Arnaldo, 355, 1º andar, CEP: 01246-000, São Paulo, SP, e-mail: rrowlands@usp.br

Recebido: 26.08.2011 – Aceito para publicação: 22.11.2011

RESUMO

Cronobacter spp. (*E. sakazakii*) é considerada um micro-organismo oportunista que vem ganhando atenção de autoridades de Saúde Pública, pelo crescente número de surtos de infecção em recém-nascidos e lactentes. A bactéria está associada a casos raros, com alta taxa de mortalidade, podendo causar meningites, enterocolite necrosante e septicemia. *Cronobacter* spp. tem ampla disseminação, porém apenas as fórmulas lácteas infantis em pó foram, epidemiologicamente, associadas às doenças causadas por esse agente. No presente estudo foi avaliada a ocorrência de *Cronobacter* spp. em alimentos destinados às crianças de 0-36 meses de idade, adquiridos em lactário de um hospital público do município de São Paulo. Vinte e seis amostras de fórmulas reconstituídas e 24 produtos em pó foram analisados segundo a metodologia da ISO. *Cronobacter* spp. foi detectada em uma amostra (3,8%) reconstituída de alimento infantil à base de farinha de milho e em quatro desse produto em pó (16,7%). A bactéria não foi detectada nas fórmulas infantis destinadas às crianças de 0-6 meses, contudo sua presença em outros alimentos infantis pode contribuir para a contaminação do ambiente e dos utensílios dos lactários por meio da contaminação cruzada.

Palavras-chave. *Cronobacter* spp. (*E. sakazakii*), fórmulas infantis, neonatos.

ABSTRACT

Cronobacter spp. (*E. sakazakii*) is considered an opportunistic pathogen and the public health authorities have given attention to this matter because of the increasing number of infection outbreaks in neonates and infants. The bacterium is associated with rare cases which can cause meningitis, necrotizing enterocolitis and septicemia, with a high mortality rate. *Cronobacter* spp. is widely disseminated, but only the powdered infant milk formulas were epidemiologically linked to diseases caused by this agent. The aim of this study was to evaluate the occurrence of *Cronobacter* spp. in foods for children aged 0-36 months, that were purchased in a public hospital in São Paulo. Twenty six reconstituted samples and 24 powdered formulas were analyzed according to the methodology established by ISO. *Cronobacter* spp. was detected in one sample (3.8%) of reconstituted infant food based on corn flour and in other four samples (16.7%) of these powdered products. The bacterium was not detected in infant formula for children aged 0-6 months, although its presence in baby food might contribute to contaminate the lactary environment and devices by cross-contamination.

Keywords. *Cronobacter* spp (*E. sakazakii*), infant formulas, neonates.

INTRODUÇÃO

Enterobacter sakazakii é um patógeno oportunista que nos últimos anos vem ganhando a atenção de autoridades de Saúde Pública, em diversos países, pelo crescente número de surtos de infecções^{1,2}.

Recentemente, *Cronobacter* spp. foi reclassificado como um novo gênero denominado *Cronobacter* spp. incluindo seis espécies: *C. sakazakii*; *C. turicensis*; *C. muytjensii*; *C. malonaticus*; *C. dublinensis*; e *Cronobacter* genospecies^{1,3}.

O principal grupo de risco envolvido em casos e surtos de infecções por *Cronobacter* spp. são os recém-nascidos, neonatos de baixo peso (<2500g), imunocomprometidos e particularmente os prematuros, que necessitam de cuidados especiais na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) neonatal. A bactéria pode afetar também indivíduos de outras faixas etárias, entretanto os casos envolvendo adultos e crianças com idade superior a 12 meses são raros^{2,4,5}.

A forma clínica mais frequente da infecção por *Cronobacter* spp. é a meningite que ocorre em 70% dos casos⁶. As complicações e a letalidade são elevadas, podendo ocorrer enterocolite necrosante, bacteremia e septicemia^{5,7,8}. A maioria das crianças que sobrevivem à meningite associada à *Cronobacter* spp. desenvolve sequelas neurológicas irreversíveis como hidrocefalia, tetraplegia e retardamento do desenvolvimento neurológico⁹. A taxa de mortalidade é elevada, variando de 60 a 80%^{9,10}.

Cronobacter spp. é um organismo ubíquo¹¹ cujo reservatório primário ainda é desconhecido, mas o solo, a água e os vegetais são as principais fontes de contaminação dos alimentos, sendo os ratos e as moscas considerados fontes adicionais de contaminação¹². A bactéria tem sido isolada de ambientes domésticos e indústrias, como as fábricas de leite em pó^{11,13} e de diversos alimentos como queijos, produtos cárneos, hortaliças¹⁴, frutas, vegetais, cereais, ervas e condimentos¹⁵.

Embora este micro-organismo já tenha sido isolado de uma grande variedade de alimentos e ambientes, somente as fórmulas lácteas infantis em pó foram associadas, epidemiologicamente, às doenças causadas por *Cronobacter* spp.^{5,10,16,17}.

De acordo com a *Food and Agriculture Organization* (FAO) e a *World Health Organization* (WHO)¹, as fórmulas lácteas infantis em pó destinadas às crianças de 0-6 meses apresentam risco significativo de contaminação por *Cronobacter* spp., entretanto, nos últimos anos, as fórmulas

lácteas infantis em pó destinadas às crianças entre 6-12 meses (fórmulas de segmento) e os ingredientes adicionais utilizados nessas fórmulas, têm sido as principais fontes de contaminação cruzada e de isolamento do patógeno. As fórmulas lácteas infantis em pó são os substitutos que mais se aproximam da composição do leite materno e, geralmente, são utilizadas por crianças hospitalizadas e prematuras, mais susceptíveis a infecções, crianças de mães portadoras do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e por crianças de mães impossibilitadas de amamentar ou que simplesmente optam pela não amamentação¹⁰.

No Brasil, alguns estudos sobre a ocorrência de *Cronobacter* spp. em alimentos infantis já foram realizados¹⁸⁻²⁰, entretanto ainda são poucas as informações com relação à presença desta bactéria nestes produtos. Além disso, há poucos casos descritos de infecções por *Cronobacter* spp.^{7,21}. A escassez de dados, principalmente os epidemiológicos, dificulta o monitoramento de surtos de origem alimentar no país, bem como a realização de estudos de Avaliação de Risco²².

A FAO e WHO¹ sugerem que os países investiguem as fontes e veículos de infecção desse micro-organismo, dentre os quais, as fórmulas lácteas infantis em pó, para um melhor entendimento da ecologia, virulência e reservatório do micro-organismo.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a ocorrência de *Cronobacter* spp. em fórmulas lácteas infantis e outras preparações, em pó e reconstituídas, não autoclavadas, destinadas a crianças entre 0-36 meses de idade, adquiridas em lactário de um hospital público do município de São Paulo.

MATERIAL E MÉTODOS

No período de agosto a novembro de 2008 foram coletadas amostras de fórmulas lácteas infantis e outras preparações, em pó e reconstituídas, não autoclavadas. Foram analisadas 50 amostras, sendo 26 amostras reconstituídas (5 fórmulas lácteas infantis, 7 fórmulas de segmento, 8 de alimento infantil à base de farinha de milho, 4 de alimento infantil à base de farinha de arroz, 1 de aveia em flocos e 1 de leite em pó integral) e 24 amostras em pó (4 de fórmulas lácteas infantis, 7 fórmulas de segmento, 8 de alimento infantil à base de farinha de milho, 3 de alimento infantil à base de farinha de arroz, 1 aveia em flocos e 1 de leite em pó integral).

Os produtos foram reconstituídos de acordo com as normas estabelecidas pelo lactário, sendo as fórmulas

Tabela 1. Ocorrência de *Cronobacter* spp. em amostras, de produtos em pó, adquiridas em lactário de um hospital público do município de São Paulo

Tipo de Amostra	Nº amostras analisadas	Nº amostras positivas	
		Teste convencional	kit API 20E
Fórmula infantil (0-6 meses)	4	0	0
Fórmula de segmento (6-12 meses)	7	0	0
Alimento infantil à base de farinha de milho (6-36 meses)	8	5	4
Alimento infantil à base de cereais de farinha de arroz (6-36 meses)	3	0	0
Aveia em flocos (6-36 meses)	1	0	0
Leite em pó (6-36 meses)	1	0	0
Total	24	5	4

láticas infantis, fórmulas de segmento e leite em pó reconstituídos com água fervente e os demais alimentos com leite tipo B fervente.

As amostras de produtos em pó foram coletadas em bolsas plásticas esterilizadas e as reconstituídas, em recipientes plásticos esterilizados; cada amostra foi constituída por no mínimo 200 g ou 200 mL e, foram transportadas ao laboratório em caixas isotérmicas, sob refrigeração e analisadas após, no máximo, 2 horas da reconstituição.

A metodologia da *International Organization for Standardization*²³ foi utilizada. Inicialmente, foi realizada a etapa de pré-enriquecimento em que uma porção de 100 g ou 100 mL de cada amostra foi homogeneizada em 900 mL de água peptonada tamponada 1% e incubada a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 18 ± 2 horas. Em seguida, 0,1 mL de cada amostra foi transferido para 10 mL de caldo lauril sulfato triptose modificado adicionado de 0,1 mL de solução vancomicina na concentração final de 10µg/mL. Os tubos foram incubados em banho-maria a $45 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 24 ± 2 horas. Após este período uma alíquota de cada tubo foi estriada em placas de ágar de isolamento de *Enterobacter sakazakii* (ESIA) e incubadas a $44 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 ± 2 horas.

As colônias suspeitas, com coloração verde-azulada, foram isoladas em ágar tripticase de soja e incubadas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ por 44-48 horas. Após a incubação foram realizadas as seguintes provas bioquímicas

Tabela 2. Ocorrência de *Cronobacter* spp. em amostras, de produtos reconstituídos, adquiridas em lactário de um hospital público do município de São Paulo

Amostra	Nº amostras analisadas	Nº amostras positivas	
		Teste convencional	Kit API 20E
Fórmula infantil (0-6 meses)	5	0	0
Fórmula de segmento (6-12 meses)	7	0	0
Alimento infantil à base de farinha de milho (6-36 meses)	8	1	1
Alimento infantil à base de cereais de farinha de arroz (6-36 meses)	4	0	0
Aveia em flocos (6-36 meses)	1	0	0
Leite em pó (6-36 meses)	1	0	0
Total	26	1	1

para a confirmação de *Cronobacter* spp.: hidrólise de citrato; teste de oxidase; teste de arginina desidrolase e lisina/ ornitina descarboxilase e teste de fermentação de carboidratos (D-sorbitol, D-rhamnose, D-sucrose e D- melibiose). As colônias positivas pelos testes bioquímicos convencionais também foram confirmadas no Kit API® 20E (Biomérieux®).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras de produtos em pó analisadas, destinadas às crianças com idade entre 0 a 36 meses, foram obtidas de embalagens manipuladas no lactário (latas abertas) para o preparo das fórmulas reconstituídas. *Cronobacter* spp. foi detectada somente em alimentos infantis à base de farinha de milho, sendo isolada em 16,7% (4/24) do total de amostras em pó analisadas de diferentes lotes. Entre as cinco amostras positivas pelos testes bioquímicos convencionais, apenas quatro foram confirmadas pelo Kit API®, sendo este último resultado considerado no presente estudo. Nos demais tipos de amostras analisadas, o patógeno não foi encontrado (Tabela 1).

Com relação aos produtos reconstituídos, foram analisadas 26 amostras, sendo que apenas uma (3,8%) de alimento infantil à base de farinha de milho foi positiva para *Cronobacter* spp. (Tabela 2). Esta amostra foi preparada com o produto em pó que apresentou resultado positivo para o patógeno.

Em diversos países, a investigação de surtos causados por *Cronobacter* spp. em hospitais, principalmente em UTI, demonstraram que a bactéria pode ser detectada em amostras de fórmulas infantis, provenientes de embalagens fechadas ou não, fórmulas reconstituídas e utensílios utilizados para preparação dessas fórmulas^{5,24-26}.

No presente estudo, a *Cronobacter* spp. não foi detectada entre as fórmulas destinadas ao principal grupo de risco para este micro-organismo (crianças de 0-6 meses), entretanto a sua ocorrência em outros tipos de produtos, como as farinhas de milho, pode favorecer a circulação do patógeno no lactário e, conseqüentemente, representar um risco de contaminação para os demais produtos desidratados e reconstituídos.

Resultados similares aos do presente estudo foram observados por Restaino et al.²⁷ que não detectaram *Cronobacter* spp. em fórmulas infantis em pó, mas verificaram sua presença em outros produtos em pó como farinhas (trigo, milho, soja e arroz), cereais infantis, vegetais e condimentos secos.

Shaker et al.²⁸ avaliaram a ocorrência de *Cronobacter* spp. em 106 amostras de fórmulas lácteas reconstituídas, fórmulas lácteas em pó, alimentos infantis, cereais, açúcares e especiarias. A bactéria foi isolada de duas amostras de fórmulas reconstituídas, duas de alimentos infantis e uma de cereais. Nazaromec-White e Farber²⁹ analisaram 120 amostras de fórmulas lácteas em pó de cinco produtores e lotes diferentes e verificaram a presença de *Cronobacter* spp. em oito (6,7%) amostras.

No Brasil, alguns estudos sobre a ocorrência de *Cronobacter* spp. já foram realizados em produtos lácteos, utensílios e no ambiente de maternidades. Gillio¹⁸ analisou 150 amostras de fórmulas lácteas infantis em pó e todas apresentaram população de *Cronobacter* spp. menor que 0,03 NMP/100g. Santos²⁰ analisou 175 amostras provenientes de hospitais e maternidades da região de Campinas (SP), constituídas por fórmulas lácteas em pó e reconstituídas, leite de vaca com amido, leite UHT, amido, utensílios usados na preparação das mamadeiras e água utilizada para reconstituição das fórmulas. *Cronobacter* spp. foi isolada em 12 amostras de fórmulas lácteas em pó e em quatro de amido. No estudo realizado por Palcich¹⁹ foram analisadas 292 amostras (fórmulas desidratadas e reconstituídas, e utensílios) provenientes de três Hospitais Maternidades da Grande São Paulo. *Cronobacter* spp. foi isolada em amostras

de mamadeira, fórmula infantil desidratada lacrada e esponja de lavagem das mamadeiras.

A contaminação das fórmulas em pó por *Cronobacter* spp. pode ocorrer durante a etapa de processamento na indústria devido às condições higiênicas inadequadas e/ou adição de ingredientes contaminados^{16,30}. A presença de *Cronobacter* spp. em fórmulas lácteas, mesmo em baixos níveis, pode estar relacionada à elevada resistência térmica desse micro-organismo e ao seu grande potencial de multiplicação, particularmente no intervalo de tempo entre o preparo e o consumo da fórmula reconstituída, sendo considerados fatores de risco significativo². Além disso, quando comparados com outras bactérias da família Enterobacteriaceae o micro-organismo apresenta maior resistência à temperatura^{31,32}, ao stress osmótico e dissecação³³, o que garante a sua sobrevivência em produtos desidratados.

Alguns estudos sugerem que as fórmulas devem ser reconstituídas com água aquecida em torno de 70 °C e armazenadas abaixo de 4 °C, minimizando a multiplicação de *Cronobacter* spp.^{10,34}. Entretanto, essa prática nem sempre é adotada e algumas fórmulas possuem instruções com temperatura de reconstituição em torno de 40 °C, faixa de temperatura que favorece o desenvolvimento de *Cronobacter* spp. e outras enterobactérias³⁵. Por outro lado, a FAO e WHO¹ alertam que temperaturas superiores a 70 °C favorecem a formação da reação de Maillard, reduzindo a biodisponibilidade de micronutrientes, perdendo assim, o valor nutricional do alimento.

Apesar das normas do lactário em questão preconizarem a utilização de água ou leite tipo B fervente para reconstituição dos produtos, verificou-se a presença de *Cronobacter* spp. em uma amostra de alimento infantil a base de farinha de milho reconstituída com leite. O binômio tempo/temperatura pode não ter sido suficiente para eliminar o micro-organismo, uma vez que a bactéria foi também detectada no produto em pó. Além disso, fórmulas reconstituídas com água ou leite apresentam pH inicial em torno de 6,0 o que permite o desenvolvimento de *Cronobacter* spp.³⁵.

De acordo com o *Centers for Diseases Control and Prevention* (CDC)⁶, se a única opção disponível para atender as necessidades nutricionais dos recém-nascidos e crianças forem as fórmulas lácteas infantis, condições adequadas de temperatura e armazenamento durante o preparo destes produtos devem ser adotadas para reduzir os riscos de contaminação e infecções por micro-organismos patogênicos.

CONCLUSÃO

A presença de *Cronobacter* spp. em outras preparações destinadas às crianças, além das fórmulas infantis, pode contribuir para a contaminação do ambiente e de utensílios dos lactários, favorecendo a contaminação cruzada.

Portanto, a implantação de medidas preventivas em ambientes como lactários e indústrias é fundamental para minimizar os riscos associados ao consumo desse tipo de alimento, principalmente aqueles destinados às crianças com idade entre 0 a 6 meses.

REFERÊNCIAS

1. Food and Agriculture Organization/World Health Organization - FAO/WHO. *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in powdered follow-up formulae. Microbiological Risk Assessment Series, 2008. [acesso 2008 Jun 15]. Disponível em: [http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra_followup/en/index.html].
2. World Health Organization - WHO. *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula. In: Joint FAO/WHO Workshop; 2004; Geneva, Sz. [Acesso 2008 Jun 20]. Disponível em [http://www.who.int/foodsafety/micro/jemra/meetings/feb2004/en/].
3. Healy B, Cooney S, O'Brien S, Iversen C, Whyte P, Nally J, et al. *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*): An Opportunistic Foodborne Pathogen. *Foodborne Pathog Dis*. 2010;7(4):339-50.
4. Food and Drug Administration - FDA. Health professionals letter on *Enterobacter sakazakii* infections associated with used of powdered (dry) infant formulas in neonatal intensive care units. 2002. [acesso 2007 Jun 20]. Disponível em: [http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/Product-SpecificInformation/InfantFormula/AlertsSafetyInformation/ucm11299.htm].
5. Van Acker J de, Smet F, Muyldermans G, Bougateg A, Naessens A, Lauwers S. Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Cronobacter* spp. in powdered milk formula. *J Clin Microbiol*. 2001;39(1):293-7.
6. Centers for Diseases Control and Prevention - CDC. *Enterobacter sakazakii* infections associated with the use of powdered infant formula-Tennessee. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2002;51(14):297-300.
7. Barreira ER, Souza DC, Góis PF, Fernandes JC. Meningite por *Enterobacter sakazakii* em recém-nascido: relato de um caso. *Pediatr*. 2003;25(1/2):65-70.
8. Lai KK. *Enterobacter sakazakii* infection among neonates, infants, children, and adults: case report and review of the literature. *Medicine*. 2001;80(2):113-22.
9. Farber JM. *E. sakazakii*: new foods for thought? *Lancet*. 2004;363(9402):5-6.
10. World Health Organization - WHO. *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formulas: meeting report. In: Microbiological Risk Assessment Series. 2007. [Acesso 2008 Jun 20]. Disponível em: [http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra/index/html/].
11. Kandhai MC, Reij MW, Van-Puyvelde K, Guillaume-Gentil O, Beumer, RR, Van Schothorst M et al. Occurrence of *E. sakazakii* in food production environments and households. *Lancet*. 2004;363(9402):39-40.
12. Hamilton JV, Lehane MJ, Braig HR. Isolation of *Enterobacter sakazakii* from midgut of *Stomoxys calcitrans*. *Emerg Infect Dis*. 2003;9(10):1355-6.
13. Mullane NR, Iversen C, Healy B, Walsh C, Whyte P, Wall PG, et al. *Enterobacter sakazakii* an emerging bacterial pathogen with implications for infant health. *Minerva Pediatr*. 2008; 59(2):137-48.
14. Leclercq A, Wanegue C, Baylac P. Comparation of fecal coliform agar and violet red bile lactose agar for fecal coliform enumeration in foods. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68(4):1631-8.
15. Friedemann M. *Enterobacter sakazakii* in food and beverages (other than infant formula and milk powder). *Int J Food Microbiol*. 2007;116(1):1-10.
16. Iversen C, Forsythe SJ. Comparison of Media for the Isolation of *Enterobacter sakazakii*. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73(1):48-52.
17. Lehner A, Stephan R. Microbiological, epidemiological, and food safety aspects of *Enterobacter sakazakii*. *J Food Prot*. 2004;67(12):2850-7.
18. Gillio CM. *Enterobacter sakazakii* em fórmulas lácteas infantis desidratadas para bebês de 0-6 meses [dissertação de mestrado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2006.
19. Palcich G. Ocorrência de *Enterobacter sakazakii* no ambiente de lactários de Maternidades da Grande São Paulo [dissertação de mestrado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2007.
20. Santos, RFS. Ocorrência de *Enterobacter sakazakii* em fórmulas infantis para lactantes em Hospitais e Maternidades da região de Campinas – SP [dissertação de mestrado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2006.
21. Santos M, Silva C, Sampaio J, Marangoni D, Pinto M, Moreira B. Detection and control of *Enterobacter sakazakii* sepsis outbreak in four hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Infect Control Hosp Ep*. 2000;21(2):140.
22. Nero LA. *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. em leite cru produzido em quatro regiões leiteiras no Brasil: ocorrência e fatores que interferem na sua detecção [tese de doutorado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2005.
23. International Standard Organization (ISO) TC34/SC 5N. Milk and Milk products – Detection of *Enterobacter sakazakii*. Geneva; 2004.
24. Bar-Oz B, Peleg O, Block C, Arad, I. *Enterobacter sakazakii* infection in the newborn. *Acta Paediatr*. 2001;90(3):356-8.
25. Block C, Peleg O, Bar-Oz B, Simhon A, Arad I, Shapiro M et al. Cluster of neonatal infections in Jerusalem due to unusual biochemical variant of *Enterobacter sakazakii*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2002;21(8):613-6.
26. Simmons BP, Gelfand MS, Haas M, Metts L, Ferguson J. *Enterobacter sakazakii* infections in neonates associated with intrinsic contamination of a powdered infant formula. *Infect Control Hosp Ep*. 1989;10 (9):398-401.
27. Restaino L, Frampton EW, Lionberg WC, Becker RJ. A chromogenic plating medium for the isolation and identification

- of *Enterobacter sakazakii* from foods, food ingredients, and environmental sources. *J Food Prot*. 2006;69(2):315-22.
28. Shaker R, Osaili T, Al-Omary W, Jaradat, Z, Al-Zuby, M. Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacter* sp. from food and food production environments. *Food Control*. 2007;18(7): 1241-5.
 29. Nazarowec-White M, Farber JM. Incidence, survival and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. *J Food Prot*.1997;60(3):103-13.
 30. Iversen C, Forsythe, SJ. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. *Trends Food Sci Tech*. 2003;14(11): 443-54.
 31. Nazarowec-White M, Farber JM. Thermal resistance of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted dried-infant formula. *Lett Appl Microbiol* .1997;24(1):9-13.
 32. Breeuwer P, Lardeau A, Peterz M, Joosten HM. Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. *J Appl Microbiol*. 2003;95(5):967-73.
 33. Barron JC, Forsythe S. Dry stress and survival time of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* in dehydrated powdered infant formula. *Food Protect*. 2007;70(9):2111-7.
 34. Gurtler JB, Beuchat LR. Growth of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted infant formula as affected by composition and temperature. *J Food Prot*. 2007;70(9):2095-103.
 35. Osaili T, Shaker R, Ayyash M, Al-Nabulsi AA, Forsythe SJ. Survival and growth of Cronobacter species (*Enterobacter sakazakii*) in wheat-based infant follow-on formulas. *Lett Appl Microbiol*. 2008;48(4):408-12.

Qualidade microbiológica de ricotas comerciais e os riscos associados à presença de *Listeria monocytogenes*

Microbiological quality of marketed ricotta cheese and disease risks associated with *Listeria monocytogenes* contamination

RIALA6/1412

Luciana Maria Ramires ESPER^{1*}, Dirce Yorika KABUKI², Arnaldo Yoshiteru KUAYE²

*Endereço para correspondência: ¹Laboratório de Controle Microbiológico de Alimentos, Departamento de Bromatologia, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal Fluminense (UFF). Rua Dr Mario Viana, 523. Niterói/RJ, fone: (21) 26299589. E-mail: lesper@id.uff.br

²Laboratório de Higiene e Legislação, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Recebido: 13.09.2010 - Aceito para publicação: 25.10.2011

RESUMO

No presente estudo foi avaliada a qualidade microbiológica de ricotas comercializadas na região de Campinas-SP e caracterizado o potencial patogênico das cepas isoladas de *Listeria monocytogenes*. Um total de 45 amostras de ricota foi submetido às análises de contagens de coliformes termotolerantes, estafilococos coagulase positiva, bolores, leveduras e detecção de *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes*. Os resultados apontaram que 46,7% (21/45) das ricotas estavam em desacordo com os padrões microbiológicos para alimentos estabelecidos pela Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Resolução RDC 12/2001. O número de amostras que apresentaram contagens acima das permitidas pela legislação em relação aos coliformes termotolerantes foi de 46,7% e em relação a estafilococos coagulase positiva foi de 2,2%, além de 6,7% das amostras apresentaram *Listeria monocytogenes*. Não foi isolada *Salmonella* das amostras analisadas. Destaca-se a presença de *L. monocytogenes* em 6,7% (3/45) das amostras com perfil genético *actA* tipo 4 e *hly* tipo 1 e pertencente à linhagem I, potencialmente patogênico ao homem. Este estudo indica que o produto analisado merece maior atenção por parte da comunidade científica, bem como pelo setor produtivo e órgãos de vigilância sanitária com o intuito de empreender a melhoria da qualidade e consequente, segurança ao consumidor.

Palavras-chave. ricota, qualidade microbiológica, *Listeria monocytogenes*, genes de virulência e PCR.

ABSTRACT

The present study aimed at evaluating the quality of ricotta cheeses marketed in the region of Campinas, SP, and to characterize the pathogenic potential of the isolated *Listeria monocytogenes* strains. Of 45 analyzed samples, 46.7% (21/45) did not comply with the Brazilian microbiological standard established. Most of the evaluated samples showed the microorganisms counts above those established by the regulation, that is, 46.7% for thermotolerant coliforms, 2.2% for coagulase-positive staphylococci, and 6.7% for *Listeria monocytogenes*. No *Salmonella* was isolated from these samples. It was evidenced the occurrence of *Listeria monocytogenes* strains, with virulence genes *actA* type 4 and *hly* type 1, and classified as lineage I, which indicate the pathogenic potential for human. This study evidenced that this class of product deserves more attention from the scientific community, and also from manufacturing sector and sanitary surveillance bureau, improving the products quality, and consequently the consumer safety.

Keywords. ricotta cheese, Microbiological quality, *Listeria monocytogenes*, Virulence genes, PCR.

INTRODUÇÃO

O nome ricota é derivado da palavra latina “recocta”, que significa recozido, ou cozido duas vezes. É um produto de origem italiana, suave, com textura delicada e agradável sabor¹. A ricota possui alto conteúdo protéico (10 a 14%), baixo teor de gordura (4 a 5%), apresenta alto grau de digestibilidade, consequência de sua boa solubilidade no suco gástrico e pH entre 4,9 a 6,1. Em geral, é comercializada sem sal ou com porcentagem reduzida (0,1%). O teor de umidade (acima de 70%) caracteriza a ricota como um alimento de muito alta umidade, o que a torna muito susceptível à multiplicação microbiana. Mesmo sendo armazenada sob refrigeração, apresenta uma vida de prateleira muito limitada, de até cinco semanas, se não houver contaminação por coliformes e, principalmente, bolores e leveduras^{1,2}.

Os padrões microbiológicos estabelecidos para este alimento pela Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Resolução RDC 12/2001³ são: coliformes a 45 °C (máximo de 5×10^2 UFC/g), estafilococos coagulase positiva (máximo de 5×10^2 UFC/g), *Salmonella* spp. (ausência em 25 g) e *Listeria monocytogenes* (ausência em 25 g).

Nas escassas pesquisas sobre a qualidade microbiológica de ricotas, podemos verificar a necessidade de maior atenção e estudos em relação a este produto.

A análise de diferentes marcas de ricota comercializadas no município de Alfenas/MG mostrou que 66,7% das amostras estavam fora dos padrões estabelecidos pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 12/2001⁴.

A análise de 4 pratos contendo ricota, servidos em uma empresa aérea brasileira, mostrou que 3 (75%) apresentaram *Escherichia coli*, sendo dois com valores iguais a $6,5 \times 10^2$ UFC/g e um com valor maior que $3,0 \times 10^4$ UFC/g⁵.

Na Itália, Cosseddu et al.⁶ analisaram 32 amostras de ricota e verificaram presença de enterococos, micro-organismos aeróbios mesófilos e *Bacillus cereus*, não sendo encontrado *Staphylococcus aureus*, *Listeria*, *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*.

Nos Estados Unidos, segundo a *Food and Drug Administration*⁷, em 2003 o Departamento de Agricultura da Geórgia (EUA) promoveu o recolhimento de 3 t de queijo tipo ricota de uma marca específica devido à presença de *Listeria monocytogenes*. Um caso de listeriose causado pelo consumo de ricota foi registrado em New Jersey em 1999⁸.

Listeria monocytogenes é um dos micro-organismos patogênicos de maior risco à saúde humana. Ela tem sido associada a vários surtos de origem alimentar e tem como veículo, o ambiente e os alimentos, destacando-se o leite e seus derivados, como o queijo⁹.

Surtos e casos de listeriose humana já foram relatados, atingindo principalmente mulheres grávidas, ocasionando aborto, parto prematuro com mortes fetais e neonatais e nascimento de crianças com meningite ou outras lesões neurológicas¹⁰⁻¹².

Todos estes fatos demonstram a importância da pesquisa e do controle de qualidade de ricotas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade microbiológica de ricotas comercializadas na região de Campinas-SP, bem como os genes de virulência de *L. monocytogenes*.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Foram coletadas 45 amostras de ricota, sendo 15 marcas comerciais diferentes, identificadas como marca A, B, C, D e assim, consecutivamente até a marca O, com registro no Serviço de Inspeção Federal (SIF) ou no Serviço de Inspeção do Estado de São Paulo (SISP). As coletas foram realizadas no varejo do município de Campinas-SP, em três períodos diferentes do ano, apresentando de 10 a 15 dias de fabricação, sendo adquiridas no comércio dentro das condições normais de exposição de produtos refrigerados.

As amostras foram retiradas de sua embalagem, após prévia desinfecção com álcool 70%, sob condições assépticas, em capela de fluxo laminar (Veco, modelo VLFS-12). Cada unidade amostral foi homogeneizada e então subdividida para a realização dos ensaios microbiológicos.

Análises microbiológicas

Vinte e cinco gramas de amostra foram pesados em balança semianalítica (Micronal, modelo B400) para posterior homogeneização em equipamento tipo “stomacher” (*Seaward Medical*, modelo *Lab Blender* 400) com os diluentes específicos para cada micro-organismo investigado.

A contagem de coliformes termotolerantes (45 °C) foi realizada utilizando-se a técnica do Número Mais Provável (NMP) de três tubos, segundo recomendação da *American Public Health Association-APHA*¹³. A contagem de estafilococos coagulase positiva foi realizada utilizando-se o método recomendado pela

APHA¹⁴ e o teste da Furazolidona¹⁵ foi realizado para diferenciação de estafilococos e micrococos. A contagem de bolores e leveduras e a determinação de *Salmonella* também foram realizadas conforme metodologia recomendada pela APHA^{16,17}.

A pesquisa de *Listeria monocytogenes* foi realizada segundo o método recomendado pelo *Canadian Health Product and Food Branch*¹⁸. O kit API Listeria (Biomerieux®) também foi utilizado para a identificação de alguns isolados, sendo este utilizado conforme instruções do fabricante.

Avaliação do potencial patogênico das cepas de *Listeria monocytogenes* isoladas

Os isolados identificados como *L. monocytogenes* pelo kit API Listeria foram subtipados utilizando-se a análise alélica dos genes de virulência *actA* e *hly*. O polimorfismo alélico da *actA* foi verificado por PCR e *hly-A* por PCR-RFLP (Polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição) utilizando as enzimas de restrição *HhaI* e *HpaII* de acordo com Wiedmann et al.¹⁹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total de 45 amostras avaliadas, 46,7% (21/45) apresentaram-se em desacordo com os padrões microbiológicos (RDC 12/2001 da ANVISA). Em 46,7% (21/45) os limites máximos permitidos para coliformes termotolerantes foram superados. Apenas 2,2% (1/45) das amostras apresentaram contagens de estafilococos coagulase positiva acima do limite e em 6,7% (3/45) foi observada a presença de *Listeria monocytogenes* (Figura 1).

Embora a utilização de leite pasteurizado e a temperatura mais elevada na coagulação da massa (~90 °C) durante o processamento de ricota criassem a expectativa de produtos com menor grau de contaminação, neste trabalho observou-se elevada incidência de coliformes termotolerantes nas amostras. Os resultados obtidos atestaram a qualidade insatisfatória das ricotas comercializadas, fato este, já evidenciado anteriormente por Raimundo⁴, que detectou 83,3% de ricotas fora do padrão para coliformes termotolerantes, e também por Tebaldi et al.²⁰, que verificou que todas as três marcas de ricota avaliadas estavam fora do padrão legal. Este fato evidencia a deficiência nas condições higiênico-sanitárias dos estabelecimentos nacionais envolvidos na produção de ricotas e a necessidade

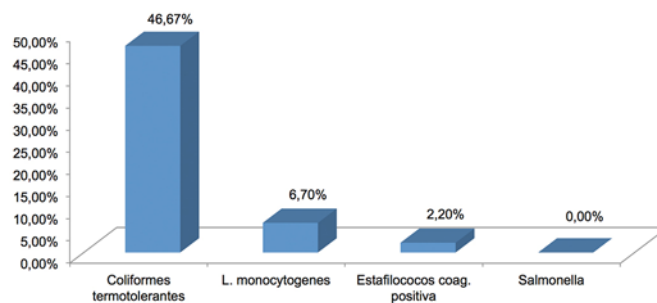


Figura 1. Porcentagem de amostras de ricota do varejo do município de Campinas-SP em desacordo com os limites estabelecidos pela Resolução RDC 12/2001

de maior atenção com as operações e condições pós-processamento térmico.

Apesar dos elevados índices de coliformes termotolerantes encontrados, verificou-se ausência de *Salmonella* spp. em 100% (45/45) das amostras (Figura 1). Estes resultados corroboram com os obtidos por outros pesquisadores^{4,6} que não verificaram a presença de *Salmonella* spp. nas ricotas analisadas. No entanto, outros autores como Tebaldi et al.²⁰ detectaram *Salmonella* spp. em uma das três marcas de ricota analisadas, sendo que esta também estava fora do padrão microbiológico para coliformes termotolerantes. Brindani et al.²¹ isolaram *Salmonella* Bredeney em uma amostra de ricota. Este sorotipo já foi causador de surtos de origem alimentar^{22,23}.

A presença de estafilococos coagulase positiva nas amostras de ricotas foi relativamente baixa (4,4%; 2/45) e apenas uma delas (1/45) fora do padrão legal, com contagem de $4,7 \times 10^3$ UFC/g. Normano et al.²⁴ analisaram 194 amostras de ricotas e destas 24,2% (47/194) estavam contaminadas com estafilococos coagulase positiva, sendo 6 identificadas como *S. aureus* e 5 destas (83,3%; 5/6) foram produtoras das enterotoxinas SEA e SED. Segundo os autores, a contaminação por estafilococos coagulase positiva se devia às condições higiênico-sanitárias inadequadas pós-processamento.

O gênero *Listeria* foi isolado de 20% (9/45) das amostras analisadas, compreendendo 6 estabelecimentos produtores diferentes.

Foram isoladas 118 culturas típicas de *Listeria* spp. referentes a 9 amostras e dentre as espécies identificadas, *L. monocytogenes* foi encontrada em 6,7% das amostras (3/45), *L. grayi* em 2,2% (1/45), *L. innocua* em 13,3% (6/45), *L. seeligeri* em 2,2% (1/45) e *L. welshimeri* em 6,7% (3/45) das amostras, conforme apresentado na Tabela 1.

A presença de *L. monocytogenes* em 6,7% das amostras é um fato preocupante, já que este produto é consumido muitas vezes sem qualquer tipo de tratamento térmico, em sanduíches naturais e patês.

Tabela 1. Espécies de *Listeria* isoladas de ricotas do varejo do município de Campinas-SP e sua distribuição entre as amostras analisadas

Espécie isolada	Amostras positivas	% de isolados*
<i>L. innocua</i>	F2, H1, H2, H3, K2 e N1 13,3%	78,0% (92/118)
<i>L. monocytogenes</i>	H3, O1 e O3 6,7%	11,0% (13/118)
<i>L. welshimeri</i>	F2, H2 e O1 6,7%	5,1% (6/118)
<i>L. grayi</i>	O1 2,2%	1,7% (2/118)
<i>L. seeligeri</i>	B2 2,2%	4,2% (5/118)

*nº de isolados / nº total de isolados de *Listeria*

A presença de outras espécies de *Listeria*, como *L. grayi*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* e *L. innocua*, também merece atenção, pois revela que há condições potenciais de instalação e desenvolvimento de *L. monocytogenes* nestes produtos. Segundo Tompikin²⁵, existe a necessidade de uma resposta à presença de qualquer espécie de *Listeria* spp. com o mesmo rigor dispensado à *L. monocytogenes*, por meio de procedimentos efetivos de higienização durante o processamento, para garantir o controle eficaz desses micro-organismos. A contaminação por *Listeria* spp. está relacionada à contaminação ambiental na indústria pela não aplicação de um programa efetivo de boas práticas de manufatura.

Kabuki et al.²⁶ rastreamos *Listeria* spp. em plantas de produção de queijos frescos, detectando elevada contaminação por *L. monocytogenes* em pisos e drenos, com 30% e 20,6 %, respectivamente, de amostras positivas. Rocha²⁷ analisou 120 amostras de superfícies de ambientes e equipamentos de laticínios produtores de queijo Minas frescal e verificou que 17,5% delas apresentaram resultados positivos para *Listeria* spp. As seguintes espécies foram encontradas: *L. grayi* (drenos); *L. welshimeri* (piso e bomba de transporte de soro); *L. innocua* (piso e mesa da sala de coagulação e piso da câmara fria) e *L. seeligeri* (dreno, piso, tanque de coagulação e piso da câmara fria). Brito et al.²⁸ após detectar *Listeria monocytogenes* em queijos Minas frescal, avaliaram a indústria processadora do queijo e isolaram *L. monocytogenes* sorotipo 1/2a, com o mesmo perfil genético encontrado no queijo, de

equipamentos e utensílios da indústria, relacionando as unidades de refrigeração (estocagem) como fonte de contaminação dos queijos.

Avaliação do potencial patogênico das cepas de *Listeria monocytogenes* isoladas

Treze isolados foram positivos para *L. monocytogenes* pelo kit API *Listeria*®. Estes, foram subtipados utilizando a análise alélica dos genes de virulência *actA* e *hly* por PCR-RFLP (Polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição).

O gene *actA* tipo 4 foi encontrado em todos os isolados, não sendo encontrado o tipo 3. A subtipagem dos isolados pela PCR-RFLP utilizada permite diferenciar 8 alelos do gene *hly* e também, separar *L. monocytogenes* em três linhagens (I, II e III) com perfis patogênicos diferentes. Segundo Wiedmann et al.¹⁹, a linhagem I compreende cepas dos sorotipos 1/2b, 3b, 3c e 4b, associadas à ocorrência de surtos e casos de listeriose em humanos, sugerindo maior potencial patogênico ao homem quando comparado às outras linhagens. Todos os isolados neste estudo apresentaram-se como pertencentes ao alelo tipo 1 do gene *hly* e à linhagem I e este perfil genético também foi o mais frequentemente encontrado no alimento¹⁹.

Kabuki et al.²⁶ ao analisarem 36 isolados de *L. monocytogenes* de amostras de plantas de processamento de queijo fresco tipo latino, revelaram que 24 pertenciam à linhagem I (*actA* tipo 4 e *hly* tipo 1). Este perfil também foi encontrado em *L. monocytogenes* isoladas de alimentos²⁹.

Além dos parâmetros microbiológicos definidos pela Resolução RDC nº12/2001, no presente estudo pesquisou-se também outros micro-organismos que pudessem servir como parâmetro de avaliação das condições higiênicas no processamento de ricota, como os bolores e as leveduras.

Os resultados da contagem de bolores e leveduras em 40 amostras de ricota analisadas, conforme apresentados na Tabela 2, revelaram elevada ocorrência, sendo 47,5% (19/40) das amostras contaminadas por bolores e 97,5% (39/40) por leveduras. Além disso, elevado nível de contaminação foi observado, pois 97,5% das amostras apresentaram contagens acima de 2,3 x 10³ UFC/g, principalmente de leveduras. Contagens de leveduras entre 10⁶ a 10⁷ UFC/g foram observadas em 55% (22/40) das amostras. No estudo realizado por Carminati et al.³⁰, foram encontrados níveis de até 6,6 x 10⁴ UFC/g de leveduras em amostras de ricota.

Embora a presença de leveduras possa representar uma contribuição positiva no desenvolvimento do sabor durante a maturação de alguns queijos, em outros, pode atuar negativamente ao favorecer a deterioração, causar produção excessiva de gás, aumentar a acidez, promover mudanças na textura e sabor amargo e de ranço. No caso específico da ricota, altas contagens destes microorganismos são críticas para a estabilidade e a vida de prateleira, e indicam falta de higiene na fabricação.

Tabela 2. Frequência de bolores e leveduras nas ricotas analisadas do varejo do município de Campinas-SP de acordo com as contagens encontradas

Contagem (UFC/g)	Bolores	Leveduras
< 10 ²	52,5 % (21/40)	2,5% (1/40)
10 ² a 10 ³	10,0% (4/40)	0,0% (0/40)
> 10 ³ a 10 ⁵	17,5% (7/40)	22,5% (9/40)
> 10 ⁵ a 10 ⁶	15,0% (6/40)	20,0% (8/40)
> 10 ⁶ a 10 ⁸	5,0% (2/40)	55,0% (22/40)

CONCLUSÃO

Os resultados apresentados revelam alta frequência de amostras de ricota em condições microbiológicas insatisfatórias e a presença de *Listeria monocytogenes* pertencentes à linhagem I, potencialmente patogênica ao homem. Portanto, este produto deveria receber maior atenção por parte da comunidade científica, do setor produtivo e dos órgãos de vigilância sanitária visando à melhoria da qualidade e consequente segurança do consumidor, tendo em vista o seu consumo crescente e a sua utilização em dietas especiais.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP pelo auxílio à Pesquisa e à CAPES pela bolsa de estudo concedida.

REFERÊNCIAS

- Kosikowski FV, Mistry VV. Soft Italian Cheese-Mozzarella and Ricotta. Cheese and Fermented Milk Foods: Volume I: Origins and Principles. 3ª ed. Virginia; 1999.
- Hough G, Pugliese ML, Sanchez R, Silva MO. Sensory and Microbiological Shelf-Life of a Commercial Ricotta Cheese. J Dairy Sci. 1999;82(3):454-9.
- 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 República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1, nº7-E. p.45-53.
- Raimundo IC. Avaliação microbiológica de amostras de ricotas comercializadas no município de Alfenas [dissertação de mestrado]. Lavras (MG): Universidade Federal de Lavras; 2004.
- Beltrán JFN, Neto AC, Pires EMF, Stamford TLM. Avaliação microbiológica de refeições servidas por empresas aéreas nacionais. Hig Aliment. 1999;59(13):49-56.
- Cossedu AM, Santi EPL, Mazzette R, Fresi A, Lai G. Ricotta bovina fresca confezionata: caratteristiche microbiologiche di interesse igienico-sanitario. Latte. 1997;7: 76-81.
- Food and Drug Association - FDA. Enforcement report. [acesso 2009 Set 09]. Disponível em: [www.fda.gov/bbs/topics/enforce/2003/ENF00797.html].
- Ryser ET, Marth EH. Listeria, listeriosis and food safety. 2ªed. New York: Marcel Dekker; 1999.
- Jay, JM. Microbiologia de alimentos. 6ªed. Porto Alegre: Artmed; 2008.
- Hofer E, Nascimento RS, Oliveira MA. Meningite por *Listeria monocytogenes*. Relato de casos em pacientes do Distrito Federal. Rev Soc Bras Med Trop. 1998;31:173-7.
- Centers for Diseases Control and Prevention. Outbreak of listeriosis associated with homemade Mexican-style cheese – North Caroline, October 2000 - January 2001. MMWR - Morb Mortal Wkly Rep. 2001;50(26):560-2.
- Schwab JP, Edelweiss MIA. Identificação imuno-histoquímica de *Listeria monocytogenes* em placentas fixadas em formol e embebidas em parafina. Rev Bras Ginecol Obstet. 2003;25(7):501-5.
- Kornacki JL, Johnson JL. Enterobacteriaceae, Coliforms, and Escherichia coli as Quality and Safety Indicators. In: American Public Health Association-APHA. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods; 2001; Washington, US; p.69-82.
- Lancette GA, Bennett RW. Staphylococcus aureus and Staphylococcal Enterotoxins. In: American Public Health Association-APHA. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods; 2001; Washington, US; p. 387-403.
- Rheinbaben KE, Hadlok RM. Rapid distinction between micrococci and staphylococci with furazolidone agars. Antonie van Leeuwenhoek. 1991;47:41-51.
- Andrews HW, Flowers RS, Silikers J, Bailey SJ. Salmonella. In: American Public Health Association-APHA. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods; 2001; Washington, US; p.357-80.
- Beuchat LR, Cousin MA. Molds and Yeast. In: American Public Health Association-APHA. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods; 2001; Washington, US;p.209-13.
- Pagotto F, Daley E, Farber J, Warburton D. Isolation of *Listeria monocytogenes* from all food environmental samples. In: CANADA. Health Products Food Branch. Compendium of analytical methods: laboratory procedures of microbiological analytical of foods [MFHPB 30]. [acesso 2009 Fev 02]. Disponível em: [www.hc-sc.gc.ca/food-aliment].
- Wiedmann M, Bruce JL, Keating C, Johnson AE, Mc Donough PL, Batt CA. Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggests three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with difference in pathogenic potential. Infect Immun.1997;65 (7): 2707-16.

20. Tebaldi VMR, Ramalho GCA, Oliveira TLC, Schwan RF, Piccoli RH. Alteração microbiológica de ricota durante a vida de prateleira. Congresso Brasileiro de Microbiologia [CD-ROM]. Santos: Anais Sociedade Brasileira de Microbiologia. [Resumo 23]; 2005.
21. Brindani F, Pizzin G, Bonardi S, Bacci C. Traditional cows' milk ricotta produced in the Parmigiano-Reggiano cheese area: assessment of the microbiological profile. *Annali Fac Med Vet*. 2002;21:283-92.
22. Landgraf M, Gonçalves JÁ, Falcão DP. Surto de toxinfecção alimentar por *Salmonella* Bredeney. *Rev Saúde Públ*. 1985;19:92-3.
23. Baker DF, Kraa E, Corbett SJ. A multi-state outbreak of *Salmonella* bredeney food poisoning: a case control study. *Aust N Z J Public Health*. 1998;22(5):552-5.
24. Normano G, Firinu A, Mula G, Dambrosio A, Poggiu A, Descastelli L, et al. Coagulase-positive *Staphylococci* and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. *Int J Food Microbiol*. 2005;98:73-9.
25. Tompikin RB. Control of *Listeria monocytogenes* in the food - processing environment. *J Food Prot*. 2002;65(4):709-25.
26. Kabuki DY, Kuaye AY, Wiedmann M, Boor KJ. Molecular subtyping and tracking of *Listeria monocytogenes* in latin-style fresh-cheese processing plants. *J Dairy Sci*. 2004;87:2803-12.
27. Rocha JAK. Estudo da presença de *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus* em indústria processadora de queijo Minas frescal [dissertação de mestrado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2004.
28. Brito JRF, Santos EMP, Arcuri EF, Lange CC, Brito MAVP, Souza GN, et al. Retail Survey of Brazilian Milk and Minas Frescal Cheese and a Contaminated Dairy Plant To Establish Prevalence, Relatedness, and Sources of *Listeria monocytogenes* Isolates. *Appl and Environ Microbiol*. 2008;74(15):4954-61.
29. Kabuki DY, Souza RM, Kuaye AY. Caracterização genética de *Listeria monocytogenes* isoladas de alimentos. In: XX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos; 2006; Curitiba.
30. Carminati D, Bellini E, Perrone A, Neviani E, Mucchetti G. Traditional ricotta cheese: survey of the microbiological quality and its shelf life. *Industrie Aliment*. 2002;41:549-55.

Microbiological quality of pre-cooked seafood marketed in Santa Catarina Island, Brazil

Qualidade microbiológica de frutos do mar pré-cozidos comercializados na Ilha de Santa Catarina, Brasil

RIALA6/1413

Roberta Juliano RAMOS*, Andréia CIROLINI, Helen Silvestre da SILVA, Letícia Adélia MIOTTO, Marília MIOTTO, Cleide Rosana Werneck VIEIRA

*Endereço para correspondência: Núcleo de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil. CEP 88040-900; tel: (48)37215379 (48)99384862, e-mail: robertajulianoramos@yahoo.com.br

Recebido: 10.06.2011 – Aceito para publicação: 25.10.2011

ABSTRACT

The present study assessed the microbiological quality of pre-cooked and refrigerated seafood marketed in Santa Catarina Island, Brazil. Forty-eight samples of crabs, mussels, shrimp and clams were purchased at fish markets in Santa Catarina Island from June to September 2008. Microbiological analysis were conducted for total counts of psychrotrophic, coliforms at 45 °C, *Enterococcus* spp., *Escherichia coli*, coagulase-positive staphylococci and *Salmonella* spp. detecting. All of analyzed samples showed absence of *Salmonella* spp. in 25g. Two (4.2%) samples exceeded the counting limits of coliforms at 45 °C (one of mussel and one of crab meat), and nine (18.75%) samples (five of clams and four of crab meat) exceeded the limits for coagulase-positive staphylococci. The psychrotrophic counts were high in all products analyzed. Positive correlations were found between coliforms counting at 45 °C and *Escherichia coli*, but no correlation was found between *Enterococcus* spp. and coliforms at 45 °C or *Escherichia coli*. This study evidenced that about 20% of the samples were not comply with the sanitary standards established by the Brazilian legislation.

Keywords. pre-cooked seafood, risk assessment, shelf life.

RESUMO

Este estudo teve por objetivo avaliar a qualidade microbiológica de frutos do mar pré-cozidos e refrigerados comercializados em Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. Quarenta e oito amostras de carne de siri, mexilhão, camarão e berbigão foram adquiridas em peixarias, entre os meses de junho e setembro de 2008. Foram realizados ensaios microbiológicos para contagem total de psicrotróficos, coliformes a 45 °C, *Enterococcus* spp., *Escherichia coli*, estafilococos coagulase positiva e detecção de *Salmonella* spp. Todas as amostras foram negativas para *Salmonella* spp. em 25 g. Duas (4,2%) amostras ultrapassaram os limites estabelecidos de coliformes a 45 °C, sendo uma de mexilhão e outra de carne de siri. Nove (18,75%) amostras, cinco de berbigão e quatro de carne de siri, ultrapassaram os limites estabelecidos para estafilococos coagulase positiva. As contagens de microrganismos psicrotróficos foram elevadas em todos os produtos analisados. Foram observadas correlações estatísticas positivas ($p < 0,05$) entre as contagens de coliformes a 45 °C e *Escherichia coli*, mas não foi observada correlação ($p > 0,05$) entre *Enterococcus* spp. e coliformes a 45 °C ou *Escherichia coli*. O presente estudo demonstrou que 20% das amostras não atendiam aos parâmetros higiênico-sanitários estabelecidos pela legislação vigente no Brasil.

Palavras-chave. frutos do mar pré-cozidos, análise de risco, vida de prateleira.

INTRODUCTION

World production of fish products is estimated in 100 million tons/year, being 70 tons for human consumption¹. Both production and consumption of fish products have increased in the last years, being the main animal protein consumed in several countries¹⁻³. Ready-to-eat seafood, as cooked shrimp, requires a high microbiological safety once it is often consumed with no subsequent thermal treatment^{4,5}. The control of microorganism growth aims to obtain healthier food products, resulting on the elimination or reduction of risks to consumer health⁶. The refrigeration process does not present sterilizing action, just retards the microbial activity and prevents the growth of new spoiling agents, while thermal treatment can physically modify the meat and promote changes in several constituents⁷.

Generally, seafood microbiota reflects the quality of the water where such animals live and, besides water, microorganisms are acquired in the several processing steps, such as peeling, deshell, descale, evisceration, among others⁸. According to Huss⁹, the real incidence of foodborne diseases caused by seafood is unknown and the majority of cases are not reported. However, there are evidences that the seafood and the seafood products are frequently associated with foodborne diseases. The microbiological quality of post-processing seafood reflects the original hygienic-sanitary conditions of the product, equipments, staff, thermal treatment, time/temperature control, good manufacturing practices, as well as caution in packaging and freezing¹⁰.

Transmission of enterical pathogenic bacteria from human or animal wastewaters by seafood, including *Salmonella* spp., has been reported¹¹. The contamination of seafood by *Streptococcus* spp. and *Staphylococcus aureus* (both of human origin) can appear as a direct consequence of inappropriate handling. Both species are found in mucosa and skin surface, being seafood a suitable environment for growing¹²⁻¹⁴. The detection of coliforms at 45 °C and *Escherichia coli* provides information about the hygienic-sanitary conditions and indicates the presence of possible pathogenic enterobacteria⁸.

The aim of the present work was to evaluate the microbiological quality of pre-cooked and chilled seafood commercialized in the Island of Santa Catarina.

MATERIAL AND METHODS

Samples

Samples were acquired in seafood stores from June to September, 2008. Samples of crab (*Callinectes danae*), mussel (*Perna perna*), shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and clams (*Anomalocardia brasiliensis*) were analyzed. All samples were found pre-cooked and stored under refrigeration. Once collected, samples were transported to the Food Microbiology Laboratory, located in the Department of Food Science and Technology of the Federal University of Santa Catarina in isothermal boxes containing ice. Analyses were performed within a period of 2 hours.

Microbiological analysis

Microbiological analyses were performed to evaluate total psychrotrophic count, coliforms at 45 °C, *Enterococcus* spp., *Escherichia coli*, positive coagulase *Staphylococcus* and *Salmonella* spp. All analyses were carried out according to American Public Health Association¹⁵.

For each sample, two portions of 25 g were weighted aseptically, one portion for *Salmonella* spp. analysis and the other for the remaining analyses. The 25 g were placed in a sterile pack, added of 225 mL of buffered peptone water and peptone water 1%, respectively. The samples were disintegrated on Bagmixer® (Interscience, France). The serial decimal dilutions were prepared from these solutions. All analyses were performed in duplicate.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed in *Statistica 7.0*® software, Stat-Soft, Inc., USA¹⁶. Averages of microbiological counts were compared using Tukey's test at a level of significance of 5%. In order to evaluate the correlation among the hygienic-sanitary indicators, the Spearman non parametric test was used.

RESULTS AND DISCUSSION

The Brazilian legislation, by RDC 12/2001 – ANVISA¹⁷, establishes microbiological parameters for different types of food. For cooked and frozen seafood, the limits are 5 x 10 MPN/g for coliforms at 45 °C, 10³ CFU/g for positive coagulase *Staphylococcus* and absence of *Salmonella* spp. in 25 g of sample.

Among the different seafood analyzed in the present work, *Salmonella* spp. was not detected in none sample of shrimp, crab, clam and mussel, being

Table 1. Counts of different microorganisms in seafood sold pre-cooked on the Island of Santa Catarina

Microorganism	Seafood (n)	Minimum count	Maximum count	Average count
Coliforms 45 °C		(MPN/g)*	(MPN/g)*	(MPN/g)*
	Mussels (12)	< 3.0	2.4 x 10 ²	6.0 ^a
	Clams (12)	< 3.0	2.3 x 10	3.8 ^a
	Crabs meat (12)	< 3.0	2.4 x 10 ²	3.7 ^a
	Shrimp (12)	< 3.0	9.0	2.6 ^a
Escherichia coli		(MPN/g)*	(MPN/g)*	(MPN/g)*
	Mussels (12)	< 3.0	2.4 x 10 ²	5.4 ^b
	Clams (12)	< 3.0	2.3 x 10	3.5 ^b
	Crabs meat (12)	< 3.0	4.0	2.2 ^b
	Shrimp (12)	< 3.0	4.0	2.1 ^b
Psychrotrophic		(CFU/g)**	(CFU/g)**	(CFU/g)**
	Mussels (12)	1.3 x 10 ³	1.1 x 10 ⁷	3.8x 10 ⁵ c
	Clams (12)	1.0 x 10 ⁴	1.7 x 10 ⁸	2.2 x 10 ⁶ c
	Crabs meat (12)	7.2 x 10 ⁵	2.7 x 10 ⁹	2.8 x 10 ⁷ c
	Shrimp (12)	1.5 x 10 ⁶	2.9 x 10 ⁸	3.3 x 10 ⁷ c
Enterococcus spp.		(CFU/g)**	(CFU/g)**	(CFU/g)**
	Mussels (12)	1.6 x 10 ²	1.5 x 10 ⁵	7.9 x 10 ² d
	Clams (12)	< 1.0 x 10	8.9 x 10 ⁵	1.2 x 10 ⁴ d
	Crabs meat (12)	< 1.0 x 10	5.4 x 10 ⁵	1.5 x 10 ⁴ d
	Shrimp (12)	< 1.0 x 10	2.8 x 10 ⁵	7.4 x 10 ² d
Positive coagulase staphylococci		(CFU/g)**	(CFU/g)**	(CFU/g)**
	Mussels (12)	< 1.0 x 10 ²	1.5 x 10 ²	1.0x 10 ² e
	Clams (12)	< 1.0 x 10 ²	1.9 x 10 ⁵	1.6 x 10 ³ e
	Crabs meat (12)	< 1.0 x 10 ²	3.6 x 10 ³	3.6 x 10 ² e
	Shrimp (12)	< 1.0 x 10 ²	1.0 x 10 ³	2.0 x 10 ² e

Note: * MPN/g = Most probable number per gram; **CFU/g = Colony forming unit per gram
Average counts of each microorganism presenting the same letter were not statistically different ($p > 0.05$) among the different seafood samples

in agreement with Brazilian legislation. Vieira et al.¹⁸, evaluating microbiological quality of crab meat processed in Antonina, Paraná, did not detect this microorganism in the samples analyzed. Sombrio et al.¹⁹ did not detect *Salmonella* spp. by analyzing samples of pre-cooked mussel and canned mussel. Kumar et al.²⁰, evaluating the incidence of *Salmonella* spp. in 247 samples of non processed seafood in India, found contamination in 20% of samples. Aveiro²¹, evaluating the quality of *in natura* clams collected in Pirajubaé, Florianópolis, Santa Catarina, did not detect *Salmonella* spp. in none analyzed sample.

Evaluating the counts of the main hygienic-sanitary indicators in the different samples of seafood pre-cooked it was observed that only two out of 48 samples were not in agreement with Brazilian legislation for coliforms at 45 °C, i.e., presenting counts higher than 50 MPN/g. Regarding to these two samples, one was of mussel (it also presented high count for *E. coli*) and one was of crab meat (it presented count for *E. coli* lower than for coliforms at 45 °C). The presence of bacteria from fecal coliforms group is interpreted as an

indicative of fecal contamination, i.e., unsuitable hygienic-sanitary conditions, because populations from this group are constituted of high proportions of *Escherichia coli*. Thus, the occurrence of enteric pathogens is possible²². It can be observed that average counts of coliforms at 45 °C presented lower values than the limit fixed by legislation, suggesting that these products present a suitable hygienic-sanitary quality. A strong positive correlation was observed between counts of coliforms at 45 °C and *E. coli* (Spearman, 0.87, $p < 0.05$). Significant statistical differences ($p > 0.05$) were not observed for counts of coliforms at 45 °C and *E. coli* in seafood samples analyzed (Table 1).

Vieira et al.¹⁸, evaluating the quality of processed crab meat, found low counts for coliforms at 45 °C (4 MPN/g). Similar results were found by Sombrio et al.¹⁹, which evaluated canned mussel. Also, Cordeiro et al.²³, evaluating cooked mussel stored for 90 days, did not detect coliforms at 45 °C.

Minimal, maximal and average counts for coliforms at 45 °C and *Escherichia coli* are presented in Table 1.

Hagler et al.²⁴ suggested the quantification of *Enterococcus* spp. instead of coliforms for epidemiological studies, mainly because that these microorganisms are resistant to several environmental conditions such as high levels of salinity, dehydration, pollution with detergents and disinfectants, low pH values and moderate thermal treatment. *Enterococcus* spp. consist of lactic bacteria, Gram positive, coccus or cocobacillus-shaped and, generally, are not present in non polluted water or soil⁸. In the present study high counts of *Enterococcus* spp. were observed in the different pre-cooked seafood samples, suggesting high tolerance to the cooking process and even to an unsuitable thermal treatment or recontamination after cooking. Correlations between *Enterococcus* spp. and coliforms at 45 °C (Spearman 0.03, $p > 0.05$) and between *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* (Spearman 0.00, $p > 0.05$) were not observed. Comparing the analyzed products (Figure 1), it can be notice that crab meat and clams presented higher *Enterococcus* spp. counts than mussel and shrimp, with a difference of 2 log cycles. However, significant differences ($p > 0.05$) were not observed for average counts of *Enterococcus* spp. in the different seafood analyzed (Table 1).

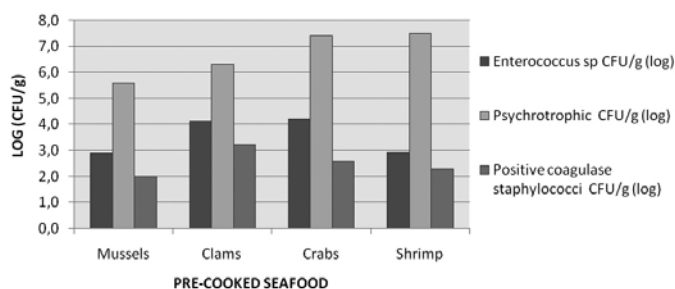


Figure 1. Average counts (log) of psychrotrophic microorganisms, *Enterococcus* spp. and positive coagulase staphylococci in samples of pre-cooked seafood commercialized in the Santa Catarina Island

Observing the averages of psychrotrophic counts (Figure 1) it can be notice high counts in all analyzed products, with crab meat and shrimp reaching more than 7 log cycles and mussel and clams reaching 5 and 6 log cycles, respectively. Table 1 shows that the lowest counts, minimal and maximal, were observed for mussels, while highest minimal and maximal were observed for shrimp and crab meat, respectively. Significant differences ($p > 0.05$) were not observed for average counts of psychrotrophic in the analyzed seafood samples (Table 1).

According to Huss²⁵, the lost in seafood quality occurs when counts of aerobic bacteria on the fish skin

reach 10^8 - 10^9 CFU/g. Fresh seafood products are highly perishable and susceptible to spoiling caused by the increasing of psychrotrophic population. Storage of such products in ice or under refrigeration during distribution and commercialization results in a small shelf life, between 5 and 10 days²⁶. These products did not present any kind of information regarding to expiration date and it is possible that some samples were already near the end of its expiration date or even over once, two clams samples, five crab meat samples and four shrimp samples presented counts higher than 8 log cycles. Ready-to-eat seafood, as pre-cooked peeled shrimp, demands microbiological safety because of the consumption of these products which occurs without any subsequent thermal treatment⁵.

Cordeiro et al.²³, evaluating counts of psychrotrophic bacteria on *in natura* and pre-cooked mussels found values lower than those found in the present study, 9.3×10^3 CFU/g and 3.1×10 CFU/g, respectively. It is possible that such difference in counts occurred once mussels were cooked under controlled conditions of time and temperature and counts were carried out right after cooking process, not being stored or exposed for sale, avoiding a recontamination or growth of remaining viable cells. Such conditions were very different from those observed in the present study.

Regarding to positive coagulase staphylococci, nine out of 48 analyzed samples presented counts above the limit established by legislation, being five clams samples and four crab meat samples, representing 18.8 % of samples presenting unsuitable hygienic-sanitary conditions. Besides, two shrimp samples presented counts reaching the maximum limit, 1×10^3 CFU/g. Staphylococci are commonly found in humans (airways and hair) being transferred to food by unsuitable handling and, due to this, the presence of such microorganisms reflects unsuitable handling and storage²⁷. It can be point out that this kind of food is very handled, once meat is manually separated after cooking process and the lack of good manufacturing process can put consumer health at risk. Vieira et al.¹⁸, evaluating microbiological quality of crab meat processed in Antoninha-PR, found three out of 11 (27.3%) samples with positive coagulase staphylococci counts above the limit established by Brazilian legislation. Valdimarsson et al.⁵, on the other hand, evaluating the quality of 1913 samples of cooked and peeled irish shrimps, found staphylococci in less than 0.2% of analyzed samples.

Figure 1 shows that clams samples presented counts with more than three log cycles, above the limit established by legislation (1.0×10^3 CFU/g), while samples of mussels, crab meat and shrimp presented counts ranging from 2 to 3 log cycles, being in agreement with Brazilian legislation¹⁷. Significant differences ($p > 0.05$) were not observed for average counts of positive coagulase staphylococci in the analyzed seafood samples (Table 1).

Table 1 shows the minimal and maximal counts, as well as averaged values for the contamination of different seafood samples. The lowest value found was of $< 1 \times 10^2$ CFU/g, while the highest value was found for clams samples, 1.9×10^5 CFU/g. Such high value allows the production of a thermostable staphylococcal enterotoxin, which remains in food after cooking process and can lead to food intoxication²⁸.

Ten (20.8%) out of 48 analyzed samples were not in agreement with the microbiological standards established on RDC 12/2001-ANVISA¹⁷. One sample of crab meat presented counts higher than 1.0×10^3 CFU/g for positive coagulase staphylococci and higher than 5.0×10 MPN/g for coliforms at 45 °C, being disapproved for these two parameters.

CONCLUSION

Considering the current legislation it can be observed that approximately 20% of the analyzed samples presented unsuitable hygienic-sanitary conditions. This should alert the Municipal Health Surveillance Agency, once pre-cooked seafood are consumed without any subsequent thermal treatment, or even sufficient thermal treatment in order to eliminate pathogenic microorganisms, being a risk to consumers food safety. High counts of psychrotrophic microorganisms observed in the present study show lack of control on the shelf life of these products, which were exposed for selling with no information about their expiration date.

REFERENCES

- Huss HH, Reilly A, Embarek PKB. Prevention and control of hazards in seafood. *Food Control*. 2000;11:149-56.
- Feldhusen F. The role of seafood in bacterial foodborne diseases. *Microbes Infect*. 2000;2:1651-60.
- Ababouch L. Potential of *Listeria* hazard in African fishery products and possible control measures. *Int J Food Microbiol*. 2000;62:211-5.
- Miget R. Microbiology of crustacean processing: Shrimp, crawfish and prawns. In: Ward DR, Hackney CR, Editors. *Microbiology of Marine Food Products*. New York: Van Nostrand Reinhold; 1991.p.65-87.
- Valdimarsson G, Einarsson H, Gudbjornsdottir B, Magnusson H. Microbiological quality of Icelandic cooked-peeled shrimp (*Pandalus borealis*). *Int J Food Microbiol*. 1998;45:157-61.
- Alves CL, Carvalho FLN, Guerra CG, Araújo WMM. Comercialização de pescado no Distrito Federal: avaliação das condições. *Hig aliment*. 2002;16:41-9.
- Ben AM. Effect of freezing and microbial growth on myoglobin derivatives of beef. *J Agric Food Chem*. 1999;47:4093-9.
- Jay JM. *Microbiologia de Alimentos*. 6a ed. Porto Alegre: Editora Artmed; 2005.
- Huss HH. Control of indigenous pathogenic bacteria in seafood. *Food Control*. 1997;8:91-8.
- Liston J. Microbial hazards of seafood consumption. *Food Technol*. 1990;44:56-62.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods - ICMSE. *Ecologia Microbiana de los Alimentos II, Productos Alimenticios*. Zaragoza: Acribia Publisher; 1985.
- Adams AM, Leja LL, Jinneman K, Beeh J. Anisakid parasites, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* in sushi and sashimi from Seattle area restaurants. *J Food Prot*. 1994;57: 311-7.
- Cardonha AMS, Casimiro, ARS, Vieira RHSE. Identificação de bactérias psicotróficas em caudas de lagosta, durante processo industrial com tripolifosfato de sódio. *Hig aliment*. 1994;8: 29-34.
- Germano PML, Oliveira JCF, Germano MIS. O pescado como causa de toxinfecções bacterianas. *Hig aliment*. 1993;7: 40-5.
- American Public Health Association - APHA. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, 4th ed. Washington: USA; 2001.
- Statistica, version 7.1 [Data Analysis Software System]. Stat-Soft, Inc.; 2006. Disponível em: [http://www.statsoft.com].
- 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.
- Vieira DM, Naumann CRC, Ichikawa T, Cândido LMB. Microbiological characteristics of meat of siri benefited in Antonina (PR) before and after the adoption of good measures of practical. *Scientia Agraria*. 2006;7: 41-8.
- Sombrio PS, Prudêncio ES, Amboni RDMC, Barreto PLM, Amante ER. Avaliação tecnológica, microbiológica, química e física de conservas de mexilhões (*Perna perna*) embaladas a vácuo. *B Ceppa*. 2008;26: 277-86.
- Kumar R, Surendran PK, Thampuran N. Detection and characterization of virulence factors in lactose positive and lactose negative *Salmonella* serovars isolated from seafood. *Food Control*. 2009;20: 376-80.
- Aveiro MV. Análise nutricional, microbiológica e histológica do berbigão *Anomalocardia brasiliiana* da Reserva Extrativista Marinha do Pirajubaé (REMAPI), Florianópolis/SC [dissertação de Mestrado]. Florianópolis (SC): Universidade Federal de Santa Catarina; 2007.

22. 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 aliment*. 2003;17: 90- 4.
23. Cordeiro D, Lopes TGG, Oetterer M, Porto E, Galvão JA. Qualidade do mexilhão *Perna perna* submetido ao processo combinado de cocção, congelamento e armazenamento. *B Ceppa*. 2007;25: 165-79.
24. Hagler AN, Mendonça-Hagler LC, Santos EA, Farage S, Silva-Filho JB, Schrank A. Microbial pollution indicators in brazilian tropical and subtropical marine surface waters. *Sci Total Environ*. 1986;58: 151-60.
25. Huss HH. Fresh fish: quality and quality changes. A training manual prepared for the FAO/DANIDA Training Programme on Fish Technology and Quality Control. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations Publisher; 1988. (FAO Fisheries Series, 29).
26. Reddy NR, Paradis A, Ropman MG, Solomon HM, Rhodehamel EJ. Toxin development by *Clostridium botulinum* in modified atmosphere-packaged fresh tilapia filets during storage. *J Food Sci*. 1996;61:632-5.
27. Galvão JA, Furlan EF, Sálán EO, Porto E, Oetterer M. Características físico-químicas e microbiológicas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*) da água e dos mexilhões cultivados na região de Ubatuba, SP. *Ciênc agrotec*. 2006;30: 1124-9.
28. Cunha Neto A, Silva CGM, Stamford TLM. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos *in natura* e processados no estado de Pernambuco, Brasil. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2002;22: 263-71.

Staphylococcus* coagulase-positiva e enterobactérias em camarão *Litopenaeus vannamei* comercializado *in natura

Coagulase-positive staphylococci and enterobacteria in fresh shrimp *Litopenaeus vannamei*

RIALA6/1414

Renata Albuquerque COSTA^{1*}, Bruno Átila Batista MOREIRA¹, Fátima Cristiane Teles de CARVALHO², Francisca Gleire Rodrigues MENEZES¹, Camila Magalhães SILVA¹, Regine Helena Silva dos Fernandes VIEIRA²

*Endereço para correspondência: ¹Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado, Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará (UFC), Avenida Abolição 3207. CEP 60165-081. Fortaleza-CE. Fone: (85) 3366-7027. E-mail: renata.albuq@gmail.com

² Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) - UFC.

Recebido: 15.07.2011 - Aceito para publicação: 05.10.2011

RESUMO

A qualidade microbiológica de camarões (*Litopenaeus vannamei*) comercializados *in natura* em Fortaleza (CE) foi investigada por meio de quantificação de *Staphylococcus* coagulase-positiva (Sph CP), coliformes totais (CT) e termotolerantes (CTT) e também pela detecção de *Salmonella* e isolamento de *Escherichia coli*. Das 24 amostras adquiridas no comércio varejista, quatro (16,7%) apresentaram índices de Sph CP acima de $10^3/g$. Não foi detectada *Salmonella* nas amostras analisadas. O número de amostras positivas para CT, CTT e *E. coli* foi, respectivamente, de 23 (95,8%), 13 (54,2%) e 6 (25%). De acordo com a legislação vigente no Brasil, as quatro amostras com contagens de Sph CP $> 10^3/g$ são consideradas impróprias para o consumo. Ademais, chama-se a atenção para a ocorrência de *E. coli* em 25% das amostras analisadas, uma vez que essa bactéria é indicadora de contaminação fecal.

Palavras-chave. estafilococos, coliformes, *Salmonella*, camarão.

ABSTRACT

The microbiological quality of fresh shrimp (*Litopenaeus vannamei*) commercialized in Fortaleza (CE) was investigated by quantifying the coagulase-positive staphylococci (CP Sph), total coliform (TC) and thermotolerant coliform (TTC). Besides, detection of *Salmonella* and *Escherichia coli* isolation techniques were carried out. Twenty-four samples purchased at retail were analyzed. Four (16.7%) samples showed CP Sph counts above of $10^3/g$. No *Salmonella* was isolated from the analyzed samples. The rates of positive samples for TC, TTC and *E. coli* were 95.8%, 54.2% and 25.0%, respectively. According to the Brazilian legislation in force, those four Sph CP-positive samples with counts $> 10^3/g$ should be considered unsuitable for human consumption. The other fact that called attention was the *E. coli* isolation from 25% of analyzed samples, which is an indicative of fecal contamination.

Keywords. Staphylococci, coliforms, *Salmonella*, shrimp.

INTRODUÇÃO

Os crustáceos são reconhecidos por possuírem alta perecibilidade, podendo representar riscos à saúde do consumidor quando sua qualidade química e microbiológica está comprometida. A fim de garantir as condições apropriadas para o consumo humano, o camarão deve ser submetido a tratamentos adequados relacionados à sua manutenção em baixas temperaturas e aos cuidados higiênico-sanitários rigorosos durante a sua manipulação em todas as etapas da cadeia produtiva¹.

Dentre os micro-organismos utilizados como indicadores de qualidade sanitária de camarão “in natura”, citam-se as bactérias pertencentes ao grupo dos *Staphylococcus* coagulase-positiva (Sph CP) e ao gênero *Salmonella*².

Os estafilococos são encontrados com relativa frequência na microbiota normal do corpo humano e estão associados aos casos de intoxicações alimentares que decorrem da ingestão de enterotoxinas pré-formadas³. As espécies *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. delphini*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans* e *S. hyicus* são consideradas CP e patógenos em potencial⁴. De acordo com Simon e Sanjeev⁵, os alimentos de origem marinha, por possuírem constituição química caracterizada pelo elevado teor de proteínas, podem ser colonizados por *S. aureus*.

As bactérias do gênero *Salmonella* são classificadas como patógenos entéricos responsáveis por surtos associados ao consumo de organismos aquáticos, que podem provocar febre, vômito e diarreia⁶. Considerando que o habitat desses micro-organismos é o intestino de animais homeotermos, a sua presença em camarão tem relação estreita com contaminação de origem fecal⁷.

Além dos micro-organismos preconizados pela legislação brasileira como padrões indicativos de qualidade, o grupo coliforme também se destaca como indicador de contaminação fecal em pescados. Pertencentes a esse grupo, os gêneros *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter* e *Escherichia* são originários do trato intestinal de animais endotérmicos, mas podem ocorrer no solo e em vegetais⁸. *E. coli* pode ser diferenciada dos demais coliformes por produzir β -glucuronidase e possuir como habitat primário o intestino de mamíferos e aves⁹.

O presente estudo teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica de camarões marinhos (*Litopenaeus vannamei*), comercializados “in natura”

em Fortaleza (CE), a partir da enumeração de Sph CP e coliformes, além da pesquisa de *Salmonella* e identificação de *E. coli*.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Foram adquiridas 12 amostras de camarão “in natura” em dois estabelecimentos do comércio varejista de Fortaleza (CE), perfazendo um total de 24 amostras analisadas, no período de abril a novembro de 2008. Cada amostra foi constituída por dez espécimes inteiros, com tamanho comercial médio (11-14 cm de comprimento e 30-34 g de peso) e comercializados frescos em embalagens plásticas, portanto, sem contato direto com o gelo. O transporte até o Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado (LABOMAR-UFC) foi feito em sacos de polietileno esterilizados acondicionados em recipiente isotérmico. O intervalo entre a aquisição das amostras e o início das análises bacteriológicas não excedeu a duas horas.

Preparação das amostras

Para realização das quantificações de *Staphylococcus* coagulase-positiva e coliformes, foram feitas diluições decimais seriadas (10^{-1} a 10^{-4}) na proporção de 1:9. A diluição de 10^{-1} foi obtida a partir da homogeneização de 25 g de cada amostra em 225 mL de salina a 0,85%. Desse homogenato, foi tomado um mililitro e diluído em 9 mL de salina a 0,85%, obtendo-se a diluição de 10^{-2} , a partir da qual seguiram-se as demais até a 10^{-4} .

Quantificação de *Staphylococcus* coagulase-positivo

Para a enumeração de *Staphylococcus* coagulase-positiva (Sph CP), utilizou-se a técnica de semeadura em superfície em Ágar Baird-Paker (BP - Difco) enriquecido com solução de gema de ovo a 50% e telurito de potássio a 1%, conforme detalhamento em Bennett e Lancette¹⁰. Colônias crescidas no meio BP com características típicas de Sph CP (negras e com halo) foram isoladas em caldo Infusão Cérebro Coração (BHI- Difco) e submetidas às provas de catalase e coagulase. O cálculo de CPP foi feito pela multiplicação das contagens de colônias de Sph CP pela diluição correspondente, sendo expresso em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por grama.

Quantificação de Coliformes

A quantificação de coliformes totais (CT) e termotolerantes (CTT) foi realizada de acordo com

Tabela 1. Quantificação de *Staphylococcus* coagulase-positiva (Sph CP) e coliformes totais (CT) e termotolerantes (CTT) em amostras de camarão *Litopenaeus vannamei* comercializado “in natura” em Fortaleza-CE

Amostras	Ponto 1			Ponto 2		
	Sph CP (UFC/g)	CT (NMP/g)	CTT (NMT/g)	Sph CP (UFC/g)	CT (NMP/g)	CTT (NMT/g)
1	< 10	930	43	63 x 10 ³	430	93
2	43 x 10 ⁴	210	< 3,0	< 10	10 x 10 ³	10 x 10 ³
3	< 10	15 x 10 ²	15 x 10 ²	< 10	10 x 10 ²	10 x 10 ²
4	< 10	240	23	22 x 10 ⁴	430	3,6
5	< 10	150	150	< 10	930	930
6	< 10	43	43	< 10	240	93
7	< 10	43	< 3,0	< 10	< 3,0	< 3,0
8	< 10	150	< 3,0	44 x 10 ²	10 x 10 ²	< 3,0
9	< 10	150	< 3,0	< 10	11 x 10 ²	< 3,0
10	< 10	43	3,6	< 10	43	< 3,0
11	< 10	43	< 3,0	< 10	430	7,4
12	< 10	23	< 3,0	< 10	430	< 3,0
Número de amostras acima dos limites propostos pela legislação vigente (2001)						
	1	-	-	3	-	-

*UFC= Unidades Formadoras de Colônia; Sph: *Staphylococcus*; CP= Coagulase-Positiva; NMP= Número Mais Provável; CT= Coliformes Totais; CTT= Coliformes Termotolerantes; -= limite não estabelecido pela legislação vigente no Brasil.

técnica de fermentação em tubos múltiplos¹¹. Para as provas de confirmação e detecção de CT e CTT foram utilizados os meios de Caldo Bile Verde Brilhante e Caldo EC, com incubação a 35 °C e 45 °C por 48 horas, respectivamente. O cálculo do Número Mais Provável (NMP) de CT e CTT foi feito a partir das recomendações de Blodgett¹² e expresso em NMP/g.

Isolamento e Identificação Fenotípica de *Escherichia coli*

Aliquotas dos tubos positivos no Caldo EC foram semeadas em Agar Eosina Azul de Metileno (EMB-Difco), com incubação a 35 °C por 24 horas. Após o período de incubação, colônias com centro negro e brilho verde metálico foram isoladas em Agar Tripton Soja (TSA-Difco) e submetidas à caracterização bioquímica e morfotintorial. Das 24 amostras de camarão analisadas, foram isoladas 72 cepas para identificação fenotípica a partir das provas de produção de indol, vermelho de metila, Voges-Proskauer (detecção de acetilmetilcarbinol), utilização de citrato, motilidade, produção de H₂S e fermentação de lactose¹¹. Para caracterização morfotintorial, todas as cepas foram submetidas à coloração de Gram¹³.

Detecção de *Salmonella*

Para determinação de presença/ausência de *Salmonella*, foram tomados, assepticamente, 25 g de cada amostra e inoculados em Caldo Lactosado por 24 horas a 35 °C. Após o período de incubação, seguiram-se o enriquecimento seletivo em Caldo Tetracionato (Difco) e Rappaport (Difco) e plaqueamento seletivo em Ágar Hektoen (Difco) e MacConkey (Difco)¹⁴. As colônias com características morfológicas compatíveis com *Salmonella* foram submetidas a triagens em Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI-Difco), Ágar Lisina Ferro (LIA-Difco) e Ágar Sulfeto Indol Motilidade (SIM-Difco), além de caracterização sorológica com antissoró somático polivalente (poli O:H).

RESULTADOS

Das 24 amostras de camarão analisadas, quatro (16,7%) apresentaram índices de Sph CP acima do preconizado pela legislação supracitada². Quando comparados os locais de amostragem, o ponto 2 foi o que mais exibiu amostras (n=3) com níveis de Sph CP superiores a 1.000 UFC/g (Tabela 1).

Com relação à estimativa de coliformes, 23 (95,8%) amostras apresentaram variação de 23 a 10 x 10³ nos valores de NMP de CT/g. Foi verificada uma oscilação no NMP de CTT/g de 3,6 a 10 x 10³ em 13 (54,2%) amostras (Tabela 1). Quando comparados os pontos 1 e 2, ambos apresentaram resultados semelhantes no que se refere ao número de amostras contaminadas por enterobactérias (Tabela 1).

Na presente pesquisa, foi detectado CTT em 13 amostras (54,2%) e *E. coli* em 6 (25%) unidades amostrais analisadas. Em nenhuma unidade amostral foi detectada *Salmonella*.

Dos 72 isolados do meio EMB, apenas 14 foram confirmados como *E. coli* em 6 das 13 amostras que apresentaram índices de NMP de CTT/g > 3.

DISCUSSÃO

Os padrões microbiológicos sanitários de alimentos são regulados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) na Resolução RDC N° 12 de 2 de janeiro de 2001². De acordo com essa resolução, crustáceos *in natura* resfriados ou congelados e não consumidos crus devem possuir um limite máximo de 10³ Sph CP/g e ausência de *Salmonella* spp. em 25 g para serem considerados próprios para o consumo humano.

Nascimento et al.¹⁵ pesquisaram a qualidade bacteriológica de 30 amostras de camarões frescos comercializados em São Luís (MA) e obtiveram resultados com ordem de grandeza superior ao do presente estudo, no que concerne ao número de amostras com cargas de *Staphylococcus* em desconformidade com os padrões microbiológicos estabelecidos. Os autores relataram que 40% das amostras analisadas possuíam índices de Sph CP acima de 10^3 UFC/g e relacionaram esse dado às condições inadequadas de manipulação e de tempo/temperatura de exposição do produto.

Ainda nesse contexto, a detecção de Sph CP em camarões comercializados *in natura* no Brasil já foi reportada por Ayulo et al.¹⁶ e Vieira et al.¹⁷, que relataram, entre outras conclusões, um possível despreparo por parte dos manipuladores de alimentos como uma das principais causas da ocorrência desse grupo bacteriano no crustáceo avaliado. Do mesmo modo, Dams et al.¹⁸ afirmam que a melhoria da qualidade do pescado depende, dentre outros fatores, de práticas adequadas de higiene por parte dos manipuladores, além da manutenção de utensílios limpos e sanitizados.

Apesar do elevado número de amostras (n=20) com contagens baixas de Sph CP, chama-se a atenção para a possibilidade de cepas enterotoxigênicas em unidades amostrais com índices aquém do permitido pela legislação. Cunha Neto et al.¹⁹ isolaram Sph CP enterotoxigênico de uma amostra de camarão *in natura* que apresentou contagem de 400 UFC/g da supracitada bactéria. De acordo com os autores, alimentos manipulados são potencialmente capazes de causar intoxicação por *Staphylococcus* e os manipuladores constituem um importante veículo de contaminação por esse gênero bacteriano.

Mesmo não havendo limites para carga de coliformes em pescado *in natura* não consumidos crus, é sabido que a presença desse grupo bacteriano em alimentos pode ser indicativa de contaminação de origem fecal²⁰. Álvares et al.²¹ em pesquisa sobre a qualidade microbiológica de pescado comercializado em São Paulo revelaram dados concordantes com os do presente estudo. Os autores detectaram uma contaminação por CT variando de 3,6 a >1.100 NMP/g e destacaram que apesar de não haver índices de CT estabelecidos pela legislação brasileira, a ocorrência dessas bactérias em alimento merece destaque, uma vez que não deixa de estar relacionada à qualidade higiênico-sanitária do produto.

Reis et al.²² quantificaram coliformes em camarões dulcícolas e encontraram índices de CT semelhantes aos

do presente estudo (<3 e >1.100 NMP/g), entretanto, os valores de CTT foram inferiores (<3 e 460 NMP/g). Por outro lado, Kirschnik e Viegas²³ obtiveram índices de NMP de CT/g inferiores aos da presente pesquisa, além de não terem detectado CTT quando do estudo das condições bacteriológicas do camarão *in natura* *Macrobrachium rosenbergii* acondicionado em gelo.

Citam-se diferentes fontes potenciais de contaminação fecal em pescados, que incluem alteração da qualidade bacteriológica do local de captura²⁴, acondicionamento inadequado nos barcos pesqueiros²⁵, manipulação inadequada²⁶, utensílios e equipamentos²⁷ e estocagem em contato direto com gelo contaminado²⁸.

Parente et al.²⁹ investigaram a ocorrência de bactérias entéricas no camarão *L. vannamei* cultivado em duas fazendas do Ceará. Os autores verificaram CTT em camarões de ambas as fazendas, detectando uma oscilação de <3 a 29×10^3 NMP/g. Considerando que a espécie *L. vannamei* é exótica no Brasil e que a sua oferta no comércio varejista pode advir da produção local de fazendas de carcinicultura, a presença de coliformes em peneídeos cultivados reflete o ambiente de onde ele provém.

Kumar et al.³⁰, em pesquisa sobre a prevalência de *E. coli* em alimentos de origem marinha na Índia, relataram a ocorrência de CTT e *E. coli* em 100% e 15% das amostras de camarões comercializados *in natura*, respectivamente. De acordo com os autores, a *E. coli* faz parte da microbiota do trato intestinal de animais homeotermos e a sua presença em pescados marinhos é indicativa de contaminação fecal.

O número baixo de isolados confirmados como *E. coli* (n=14; 19,4%) pode ser decorrente do método empregado para quantificação desse grupo bacteriano. Raghubeer e Matches³¹ demonstraram que *E. coli* O157:H7 pode não se multiplicar em temperaturas normalmente utilizadas em procedimentos de enumeração de *E. coli* e outros coliformes fecais. Ainda, segundo os autores, o sorotipo O157:H7 multiplica-se bem na faixa de temperatura característica de coliformes não fecais, sendo possível que esta *E. coli* patogênica não seja detectada na triagem usual de CTT.

A ausência de *Salmonella* nas amostras analisadas é indicativa de qualidade bacteriológica satisfatória e classifica as unidades amostrais como próprias para o consumo². Phan et al.³² reportaram contaminação por *Salmonella* em 24,5% de amostras de camarão obtidas no comércio varejista do Vietnã, com predominância dos sorovars *S. Weltevreden*, *S. Tennessee* e *S. Dessau*.

Wan Norhana et al.³³ afirmaram que geralmente a prevalência de *Salmonella* é mais acentuada em camarões frescos oriundos do varejo do que aqueles obtidos em plantas de processamento, posto que o controle da temperatura e da contaminação cruzada tende a ser mais rigoroso na indústria.

Considerando os padrões vigentes no Brasil (Sph CP e *Salmonella*), apenas quatro amostras de camarão podem ser consideradas impróprias para o consumo. Entretanto, a ocorrência de coliformes e o isolamento de *E. coli* sustentam a conclusão de que um percentual das amostras foi exposto a alguma fonte de contaminação fecal e tiveram, portanto, sua qualidade bacteriológica comprometida. Para ser considerada segura, sob o ponto de vista microbiológico, a comercialização de pescado *in natura* deve obedecer a rigorosas práticas higiênico-sanitárias, que contemplam o treinamento constante dos manipuladores de alimento sobre os riscos de veiculação de patógenos, além do controle da temperatura durante todas as fases da cadeia produtiva.

REFERÊNCIAS

1. Moura AFP, Mayer MM del B, Landgraf M, Tenuta Filho A. Qualidade química e microbiológica de camarão-rosa comercializado em São Paulo. *Rev Bras Cienc Farm*. 2003;39:203-8.
2. 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.
3. Seo YH, Jang JH, Moon KD. Occurrence and characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from minimally processed vegetables and sprouts in Korea. *Food Sci Biotechnol*. 2010;19:313-9.
4. Foster G, Ross HM, Hutson RA, Collins MD. *Staphylococcus lutrae* sp. nov., a new coagulase-positive species isolated from otters. *Int J Syst Bacteriol*. 1997;47:724-6.
5. Simon SS, Sanjeev S. Prevalence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in fishery products and fish processing factory workers. *Food Control*. 2007;18:1565-8.
6. Brands DA, Inman AE, Gerba CP, Maré CJ, Billington SJ, Saif LA, et al. Prevalence of *Salmonella* spp. in oysters in the United States. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71:893-7.
7. Shabarinath S, Kumar HS, Khushiramani R, Karunasagar I, Karunasagar I. Detection and characterization of *Salmonella* associated with tropical seafood. *Int J Food Microbiol*. 2007;114:227-33.
8. Vieira RHSE, Tôres RCO. Estimativa da população de coliformes totais e fecais (termotolerantes) e *Escherichia coli* através do Número Mais Provável (NMP). In: Vieira RHSE, organizador. Microbiologia, Higiene e Qualidade do Pescado – teoria e prática. São Paulo: Varela; 2004.p.219-26.
9. Tryland I, Fiksdal L. Enzyme characteristics of β -D-galactosidase- and β -D-glucuronidase-positive bacteria and their interference in rapid methods for detection of waterborne coliforms and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*. 1998;64:1018-23.
10. Bennett RW, Lancette GA. *Staphylococcus aureus*. In: Bacteriological Analytical Manual. U.S. Food & Drug Administration Center for Food Safety & Applied Nutrition, 2001. [acesso 2008 Dez 10]. Disponível em: [http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm071429.htm].
11. Feng P, Weagent SD. Diarrheagenic *Escherichia coli*. In: Bacteriological Analytical Manual. U.S. Food & Drug Administration Center for Food Safety & Applied Nutrition, 2011. [acesso 2011 Jul 15]. Disponível em: [http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm070080.htm].
12. Blodgett R. Appendix 2: Most Probable Number from Serial Dilutions. In: Bacteriological Analytical Manual. U.S. Food & Drug Administration Center for Food Safety & Applied Nutrition, 2010. [acesso 2011 Jul 15]. Disponível em: [http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm109656.htm].
13. Soares JB, Cassimiro ARS, Albuquerque LMB. Microbiologia básica. Fortaleza: EUFC; 1991.
14. Andrews WA, Hammack TS. *Salmonella*. In: Bacteriological Analytical Manual. U.S. Food & Drug Administration Center for Food Safety & Applied Nutrition, 2011. [acesso 2011 Jul 15]. Disponível em: [http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm070149.htm].
15. Nascimento AR, Jesus JR, Pereira MSS. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* e bactérias aeróbias mesófilas em camarão fresco, sururu e carne moída comercializados em São Luís (MA). *Cad Pesq*. 1999;10:9-18.
16. Ayulo AM, Machado RA, Scussel VM. Enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in fish and seafood from the southern region of Brazil. *Int J Food Microbiol*. 1994;24:171-8.
17. Vieira RHSE, Rebouças RH, Albuquerque WF. *Staphylococcus* coagulase positiva em camarão sete-barbas, *Xiphopenaeus kroyeri*, comercializado na feira-livre de pescado do Mucuripe – Fortaleza (CE). *Bol Técn Cient CEPENE*. 2006;14:11-22.
18. Dams RJ, Teixeira E, Beirão LH. Práticas de higiene e sanificação em indústria de pescado congelado. *Bol CEPPA*. 1997;15:159-66.
19. Cunha Neto A, Silva CGM, Satmford TLM. Estafilococos enterotoxigênicos em alimentos “in natura” e processados no Estado de Pernambuco, Brasil. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2002;22:263-71.
20. Costa RA, Vieira GHF, Albuquerque IA, Alves LAO, Mourão JA, Vieira RHSE, et al. Enterobactérias em pescado oriundo da Lagoa da Fazenda, Sobral, CE. *Hig Aliment*. 2009;23:102-5.
21. Álvares PP, Martins L, Borghoff T, Silva WA, Abreu TQ, Gonçalves FB. Análise das características higiênico-sanitárias e microbiológicas de pescado comercializado na grande São Paulo. *Hig Aliment*. 2008;22:88-93.

22. Reis JA, Hoffmann P, Marcos LM, Taddei FG, Gonçalves TMV, Hoffman FL. Estudo higiênico-sanitário dos camarões dulcíolas *Macrobrachium amazonicum* e *M. jelskii*. *Hig Aliment*. 2004;18:58-67.
23. Kirschnik PG, Viegas EMM. Alterações na qualidade do camarão de água doce *Macrobrachium rosenbergii* durante estocagem em gelo. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2004;24:407-12.
24. Vieira RHSE. Microbiota natural do pescado fresco. In: Vieira RHSE, organizador. *Microbiologia, Higiene e Qualidade do Pescado – teoria e prática*. São Paulo: Varela; 2004.p.45-57.
25. Vieira RHSE, Saker-Sampaio S. Emprego de gelo nos barcos de pesca. In: Vieira RHSE, organizador. *Microbiologia, Higiene e Qualidade do Pescado – teoria e prática*. São Paulo: Varela; 2004.p.37-43.
26. Oliveira ACG, Seixas ASS, Sousa CP, Souza CWO. Microbiological evaluation of sugarcane juice sold at street stands and juice handling conditions in São Carlos, São Paulo, Brazil. *Cad Saúde Pública*. 2006;22:1111-4.
27. Keeratipibul S, Oupaichit T, Techaruwichit P. Contamination profiles of *Escherichia coli* and enterococci in steamed chicken meat products. *J Food Prot*. 2009;72:1821-9.
28. Vieira RHSE, Souza OV, Patel TR. Bacteriological quality of ice used in Mucuripe Market, Fortaleza, Brazil. *Food Control*. 1997;8:83-5
29. Parente LS, Costa RA, Vieira GHF, Reis EMF, Hofer E, Fonteles AA, et al. Bactérias entéricas presentes em amostras de água e camarão marinho *Litopenaeus vannamei* oriundos de fazendas de cultivo no Estado do Ceará, Brasil. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 2011; 48:46-53.
30. Kumar HS, Parvathi A, Karunasagar I, Karunasagar I. Prevalence and antibiotic resistance of *Escherichia coli* in tropical seafood. *World J Microbiol Biotechnol*. 2005;21:619-23.
31. Raghubeer EV, Matches JR. Temperature range for growth of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and selected coliforms in *E. coli* medium. *J Clin Microbiol*. 1990;28:803-5.
32. Phan TT, Khai LT, Ogasawara N, Tam NT, Okatani AT, Akiba M, et al. Contamination of *Salmonella* in retail meats and shrimps in the Mekong Delta, Vietnam. *J Food Prot*. 2005;68:1077-80.
33. Wan Norhana MN, Poole SE, Deeth HC, Dykes GA. Prevalence, persistence and control of *Salmonella* and *Listeria* in shrimp and shrimp products: A review. *Food Control* 2010;21:343-61.

Alimentos comercializados nas escolas e estratégias de intervenção para promover a alimentação escolar saudável: revisão sistemática

Food sold at schools and the intervention strategies for promoting healthy nourishments at schools: a systematic review

RIALA6/1415

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

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

Recebido: 30.11.2010 - Aceito para publicação: 09.10.2011

RESUMO

Com o objetivo de realizar uma revisão sistemática da literatura sobre alimentos comercializados e estratégias desenvolvidas nas escolas para promover alimentação saudável, efetuaram-se buscas de artigos científicos publicados no período compreendido entre janeiro de 2002 e junho de 2011, nas bases eletrônicas Medline, Lilacs e SciELO-Br. Dentre os 26 artigos incluídos na análise, 19 indicaram alta disponibilidade de alimentos de baixo valor nutricional nas escolas e escassez na implementação e avaliação de políticas de alimentação escolar. Sete artigos relataram estratégias de intervenção positivas, visando aumentar a disponibilidade e o comércio de alimentos saudáveis nas escolas. Apesar da existência de políticas de alimentação e estratégias de intervenção nas escolas, o valor nutricional dos alimentos disponíveis para comercialização é preocupante. A implementação de políticas públicas bem estruturadas que visem à alimentação saudável é fundamental para promover a saúde de crianças e adolescentes em fase escolar. Concomitantemente, destaca-se a necessidade da fiscalização para avaliar o cumprimento de legislações específicas, bem como a realização sistemática de estudos longitudinais que acompanhem a implementação das medidas destinadas à melhoria da qualidade nutricional dos alimentos comercializados no ambiente escolar e oferecidos nos programas institucionais de alimentação escolar.

Palavras-chave. cantina escolar, alimentação escolar, alimentos comercializados, políticas de alimentação e nutrição.

ABSTRACT

With the aim at conducting a systematic literature review regarding to the food marketed at schools, as well on the intervention strategies for promoting the healthy nourishment, a search was carried out in the Medline, Lilacs and SciELO-Br databases on scientific articles published from January 2002 to June 2011. Among the twenty-six articles included in this analysis, nineteen evidenced a wide availability of foods with low nutritional value at schools, and a lack of implementation and evaluation of school food policies. Seven articles reported the positive intervention strategies aimed at increasing the availability and the sale of healthy food at schools. Despite the existence of policies for food and intervention strategies in schools, the nutritional value of the food for sale is troublesome. Implementation of well-designed public policies aiming at strengthening the healthy nourishment, is important to assure the health promotion at schools. At the same time, the strict controls are essential for assessing the legislation effectiveness. It is also necessary to undertake systematic and longitudinal studies to follow up on the implementation of measures for improving the nutritional quality of foods sold at the school surroundings and of those offered in school meals.

Keywords. school canteen, school food, commercialized food, food and nutrition policies.

INTRODUÇÃO

O ambiente escolar como espaço de convivência e interações sociais, tem sido frequentemente reconhecido como um terreno fértil para implementação de estratégias e ações de promoção da saúde e nutrição e por consequência, de incentivo ao processo de crescimento e desenvolvimento saudável e de melhoria da qualidade de vida de crianças e adolescentes^{1,2}.

Neste contexto, o projeto *Escolas Promotoras de Saúde* (EPS), iniciativa lançada pela Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) e Organização Mundial de Saúde (OMS) na América Latina em 1995, objetiva fortalecer e ampliar parcerias entre os setores de saúde e educação nas práticas de promoção da saúde do escolar, incluindo o apoio dos pais, professores, gestores e outros atores da comunidade escolar².

Em 2004 a OMS aprovou a *Estratégia Global sobre Alimentação Saudável, Atividade Física e Saúde*, a qual prevê ações de caráter regulatório, fiscal e legislativo sobre o ambiente escolar visando tornar factíveis as escolhas alimentares saudáveis de crianças e adolescentes³.

No Brasil, a *Política Nacional de Alimentação e Nutrição* (PNAN), homologada no ano de 1999, compõe o conjunto das políticas governamentais voltadas para a concretização do Direito Humano à Alimentação Adequada (DHAA) e da Segurança Alimentar e Nutricional (SAN) da população. Dentre as diretrizes da PNAN, destaca-se a importância da promoção de práticas alimentares saudáveis no ambiente escolar, ressaltando-se a introdução de temas sobre saúde, alimentação e nutrição nos currículos escolares⁴.

Do mesmo modo, a Coordenação-Geral de Alimentação e Nutrição (CGAN) tem procurado implementar ações para promoção da alimentação saudável nas escolas, dentre as quais se destaca a restrição à comercialização de alimentos e preparações com altos teores de gordura saturada, gordura trans, açúcar livre e sal no ambiente escolar⁵.

O acesso aos alimentos no ambiente escolar pode ocorrer por meio de fontes diversas⁶⁻⁸. No Brasil, as três principais formas de acesso aos alimentos no ambiente escolar são: as refeições oferecidas gratuitamente pelo *Programa Nacional de Alimentação Escolar* (PNAE); os alimentos trazidos de casa; e a compra de alimentos nas cantinas escolares⁹⁻¹¹.

A regulamentação dos alimentos comercializados no ambiente escolar tem sido reconhecida como

importante estratégia de promoção de hábitos alimentares saudáveis¹². Entretanto, apesar do efeito potencial que a regulamentação do comércio de alimentos nas escolas possa representar na qualidade da alimentação escolar, são limitados os estudos destinados a analisar o que está à disposição dos escolares, tanto em países desenvolvidos, quanto em desenvolvimento^{10,12}. Deste modo, este artigo tem como objetivo realizar uma revisão sistemática da literatura sobre os alimentos comercializados e as estratégias desenvolvidas no ambiente escolar para o oferecimento de uma alimentação saudável. A questão que norteou a presente investigação foi: Quais os alimentos comercializados e as estratégias de intervenção implementadas para a compra de alimentos saudáveis no contexto escolar?

MÉTODO

A metodologia adotada seguiu procedimentos básicos recomendados para estudos de revisão sistemática da literatura. Ou seja, o estudo foi planejado para responder a uma pergunta específica e utilizou métodos sistemáticos para identificar, selecionar e analisar criticamente os artigos publicados sobre uma determinada temática em relação aos seus objetivos, materiais e métodos e resultados obtidos, permitindo extrair conclusões sobre o estado da arte ou conhecimento científico já disponível sobre a respectiva temática^{13,14}.

A investigação consistiu na realização de levantamento sistemático de artigos científicos publicados no período de janeiro de 2002 até junho de 2011, que tivessem como objeto de estudo as temáticas: a) alimentos e bebidas comercializados nas escolas de educação básica; e/ou b) políticas e estratégias desenvolvidas para comercializar alimentos saudáveis nas escolas.

Esta investigação foi realizada nas bases eletrônicas de dados: *Medical Literature Analysis and Retrieval System Online* (Medline via *National Library of Medicine*); *Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde* (Lilacs); e *Scientific Electronic Library Online* (SciELO-Br).

Os unitermos utilizados para a captura dos artigos nas bases de dados foram: cantina escolar (*school canteen*); alimentação escolar (*school feeding*); consumo alimentar associado à escola (*food intake and school*); alimentos comercializados na escola (*competitive foods*); compra nas escolas (*purchase in schools*); e políticas de intervenção e escolas (*policy intervention and schools*).

Utilizou-se o operador lógico “OR” na combinação dos termos para rastreamento das publicações.

Inicialmente foram identificados 2.072 artigos nas bases de dados, sendo 1.317 na Medline, 113 na Scielo e 642 na Lilacs. Após a busca procedeu-se a seleção dos artigos por meio da leitura dos respectivos títulos e resumos. Excluíram-se os estudos publicados antes do ano de 2002, pesquisas desenvolvidas fora do ambiente escolar, estudos identificados em mais de uma base de dados e estudos de revisão da literatura. Os artigos selecionados na íntegra foram analisados de acordo com os critérios de inclusão. A seleção e análise foram realizadas por dois examinadores independentes.

Utilizaram-se os seguintes critérios para a inclusão dos artigos: texto completo disponível para acesso; publicação nos últimos nove anos (equivalendo ao período de janeiro de 2002 até junho de 2011); idiomas inglês, português ou espanhol; investigações envolvendo crianças e adolescentes em idade escolar; temas sobre alimentos e bebidas comercializadas nas escolas de educação básica e/ou políticas e estratégias desenvolvidas para comercializar alimentos saudáveis nas escolas.

Com base nos critérios de inclusão/exclusão, foram selecionados vinte e seis artigos. Em virtude da heterogeneidade metodológica dos 26 artigos incluídos na revisão, optou-se por uma análise descritivo-narrativa, não sendo utilizado *check list* de análise de qualidade dos artigos, nem o método estatístico para integrar/analisar (metanálise) uma síntese dos resultados dos estudos incluídos. Para a análise crítica elaborou-se um roteiro descritivo baseado nas proposições de Moher et al.¹³ e Von Elm et al.¹⁴, observando-se os objetivos, materiais e métodos, resultados e conclusões dos artigos, possibilitando uma síntese do conhecimento científico disponível sobre a temática investigada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os vinte e seis artigos selecionados para análise, dezenove foram categorizados como pesquisas observacionais que investigaram aspectos relacionados aos alimentos comercializados/consumidos no ambiente escolar e às políticas de alimentação. Destes, dois são estudos brasileiros e os demais internacionais (Tabela 1).

Sete artigos foram categorizados como pesquisas de intervenção que investigaram estratégias visando à modificação na comercialização e/ou no consumo de alimentos e bebidas na escola (Tabela 2).

Os dados de caracterização dos estudos obtidos encontram-se nas Tabelas 1 e 2. Nestas tabelas apresentam-se os dados de autoria, ano de publicação, local de realização, objetivos dos estudos, população e amostra, método de investigação/estratégia de intervenção e principais resultados.

Para melhor compreensão do texto e, sobretudo em função dos distintos desenhos metodológicos dos estudos (observacionais e de intervenção) a seção foi organizada em duas partes: estudos sobre alimentos comercializados/consumidos e políticas de alimentação no ambiente escolar e estudos de intervenção visando à alimentação escolar saudável.

Estudos sobre alimentos comercializados/consumidos e políticas de alimentação no ambiente escolar

Em relação ao delineamento dos estudos sobre alimentos comercializados/consumidos e políticas de alimentação no ambiente escolar, onze apresentaram delineamento transversal de base analítica, seis eram descritivos e dois longitudinais (Tabela 1). A grande maioria dos artigos selecionados são de natureza transversal, fato que impossibilita estabelecer relações de causa e efeito em relação aos estudos prospectivos. Portanto, é necessária a condução de estudos longitudinais para que se possa verificar a relação que se estabelece entre as políticas de alimentação no ambiente escolar e o desenvolvimento de hábitos alimentares saudáveis nos escolares.

Dentre as pesquisas observacionais, 14 foram realizadas nos Estados Unidos da América (EUA)^{1,6,15-26}, duas no Brasil^{10,27}, uma na África do Sul¹², uma na Austrália⁷ e uma na Nova Zelândia⁸ (Tabela 1). Além dos EUA ser considerado o líder mundial em termos de investimentos em pesquisa e desenvolvimento, outro fator que poderia justificar a maior quantidade de estudos realizados neste país é a elevada prevalência de obesidade, considerada um relevante problema de saúde em crianças e adolescentes neste país. Resultados do *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) 2007-2008, indicam que 17% das crianças e adolescentes entre 2-19 anos de idade são portadores de obesidade²⁸.

Quanto aos instrumentos a maioria dos estudos utilizou questionários autorresposta, prevalecendo os questionários direcionados aos diretores dos serviços de alimentação e aos professores via serviços postais de correios e correio eletrônico^{1,7,8,10,15,18-20,25-27}. Dois dos estudos utilizaram questionários autorresposta com os escolares^{12,21}. A taxa de resposta destes instrumentos

Tabela 1. Relação dos estudos observacionais sobre alimentos comercializados e consumidos na escola e políticas de alimentação, segundo autoria e ano de publicação, local de realização, objetivos, população e amostra, método de investigação e principais resultados, período de 2002 a 2011

Estudo/ ano de publicação	Local de realização	Objetivos do estudo	População e amostra	Descrição dos métodos	Principais resultados
Arcan et al. 2011	EUA Minnesota	Investigar possíveis correlações entre os alimentos disponibilizados na escola e os hábitos alimentares de estudantes.	6 escolas públicas de ensino médio, (145 adolescentes).	Estudo transversal. Registros escolares; questionários de frequência alimentar e entrevistas com representantes escolares. Análise multivariada.	Em média, os alunos consumiam refrigerantes 10 vezes/sem e frequentavam restaurantes <i>fast-food</i> pelo menos 3 vezes/sem. Três escolas possuíam MA ou lanchonetes comerciais (sem regulamentações para os alimentos comercializados nestes locais). Mais de 60% dos itens comercializados eram de baixo valor nutricional. Escolhas alimentares: positivamente associadas com o consumo de bebidas açucaradas e alimentos com AIG ($p<0,05$).
Gabriel et al. 2010	Brasil Florianópolis, Santa Catarina	Diagnosticar a existência de cantinas escolares e os itens comercializados, após instituição de Lei de Regulamentação.	105 escolas de ensino fundamental das redes municipal, estadual e particular.	Estudo transversal. Questionário aplicado por telefone com os diretores escolares ou responsáveis pelas cantinas. Análise de frequência e percentual.	53% das escolas possuíam cantina. Dentre os alimentos proibidos pela Lei, os salgadinhos fritos e industrializados não eram comercializados, e a maioria não comercializava refrigerantes (98%) e pipocas industrializadas (93%). Sucos naturais e os salgadinhos assados eram comercializados por 75% e 98% das escolas, respectivamente; 61% dos estabelecimentos não disponibilizavam frutas ou salada de frutas.
Gabriel et al. 2009	Brasil, Santa Catarina	Diagnosticar a existência de cantinas escolares e verificar se os itens comercializados estavam em conformidade com Lei de Regulamentação.	345 escolas de ensino fundamental.	Estudo transversal. Questionário aplicado com diretores escolares e responsáveis pelas cantinas. Para analisar a adequação à Lei utilizou-se a Teoria da Resposta ao Item (TRI). Análise descritiva, inferencial, cálculo de proporções. Testes: <i>qui-quadrado de Pearson</i> e análise de variância.	45% das escolas possuíam cantina; 68% das cantinas não comercializavam salgadinhos fritos, refrigerantes, pipocas/salgadinhos industrializados e balas/pirulitos/gomas de mascar. Itens com maior dificuldade de adequação à Lei: sucos artificiais (presentes em 67% das cantinas) e disponibilidade diária de frutas (83% não comercializavam frutas). Pizzas, bolos/fortas e chocolates eram comercializados por 73%; 65% e 51% das cantinas, respectivamente.
Patel et al. 2009	EUA Los Angeles	Avaliar a implementação de políticas relacionadas ao controle da obesidade escolar.	4 lanchonetes comerciais de ensino médio.	Estudo transversal. Observação e entrevistas com funcionários das escolas e alunos. Análise qualitativa.	Alimentos e bebidas comercializados de acordo com as diretrizes nutricionais do <i>Los Angeles Unified School District</i> (LAUSD). Ausência de informação nutricional dos alimentos e baixa variedade de frutas e verduras.
Terry-McElrath et al. 2009	EUA	Identificar tendências nos alimentos disponibilizados em escolas, buscando associações destes com o Índice de Massa Corporal.	684 escolas de ensino médio, (78.442 estudantes).	Estudo longitudinal (2004-2007). Administradores escolares, gestores do serviço de alimentação e estudantes completaram questionário autorresposta. Análise multivariada e <i>Marital-Haeriszszel</i> .	Tendência de diminuição na disponibilidade de alimentos ricos em açúcares e gorduras ($p<0,001$) nas MA, lanchonetes e serviços a <i>la carte</i> . Associação positiva entre o consumo regular destes alimentos nas MA ou lanchonetes e estudantes obesos (OR= 1,14; $p<0,05$).
Finkelstein, Hill Whitaker 2008	EUA	Descrever ambientes de alimentação escolar e políticas relacionadas.	395 escolas públicas de ensino fundamental e médio (129 distritos escolares de 38 estados).	Estudo transversal. Questionários aplicados com os diretores das escolas e dos serviços de alimentação. Elaborou-se <i>score</i> classificando o ambiente alimentar em <i>menos e mais saudável</i> .	86% das escolas não possuíam lanchonetes/cantinas e 55% não possuíam MA; 43% das escolas possuíam políticas de bem estar; 22% conselhos consultivos em saúde e nutrição; 68% atividades de educação nutricional em todas as séries e 54% informações nutricionais nos itens comercializados. Ambiente escolar mais saudável nas séries iniciais ($p=0,001$).

Cont. Tabela 1

McDonnell et al. 2006	EUA Pensilvânia	Verificar a existência e o cumprimento de políticas sobre os alimentos comercializados na escola.	228 diretores dos serviços de alimentação das escolas e 79 diretores das escolas.	Estudo transversal de base analítica. Questionários, via correio e eletrônica. Análise exploratória descritiva.	Poucas políticas de alimentação foram relatadas (0,5 a 15%). A existência de políticas não cumpridas variava de 0 a 13%.
Greves & Rívora 2006	EUA	Examinar políticas de alimentação para alimentos comercializados.	51 distritos escolares, abrangendo 8.310 escolas.	Estudo descritivo. Entrevista com os representantes dos distritos escolares, via internet ou contato telefônico e/ou pessoal. Análise exploratória descritiva.	19 dos 51 distritos (39%) possuíam políticas para alimentos comercializados; 74% das políticas tinham critérios para o conteúdo dos alimentos e bebidas e 63% proibia a venda de refrigerantes nas escolas; um número menor de políticas restringia o tamanho da porção de alimentos (53%) ou bebidas (47%).
Probart et al. 2006	EUA Pensilvânia	Descrever a extensão de propagandas de refrigerantes e identificar os fatores relacionados com o alcance destas propagandas.	228 escolas de ensino médio.	Estudo transversal de base analítica. Questionários autorrespostas enviados aos diretores dos serviços de alimentação das escolas, via correio e eletrônica. Análise de regressão linear múltipla e de correlação.	67% apontaram as propagandas de refrigerantes em pelo menos uma posição na escola. Extensão dos locais de propagandas de refrigerantes positivamente relacionada com a existência de contratos exclusivos ($p<0,001$) e negativamente relacionada à participação diária no almoço escolar ($p=0,001$).
Probart et al. 2006a	EUA Pensilvânia	Identificar os fatores associados ao oferecimento e a venda de alimentos na escola e a participação no almoço escolar.	228 escolas de ensino médio	Estudo transversal de base analítica. Questionários autorrespostas enviados aos diretores dos serviços de alimentação das escolas, via correio e eletrônica. Análise de regressão linear múltipla.	Alimentos menos nutritivos oferecidos nas MA ($p<0,001$) e existência de MA de refrigerantes ($p=0,002$) contribuíram para o maior número destas por escolas. Participação diária média no almoço escolar positivamente relacionada com as políticas que proíbem os pais ou escolares de trazerem alimentos dos <i>fast foods</i> para os restaurantes ($p=0,042$).
Kann et al. 2005	EUA	Identificar os itens disponíveis para compra nas escolas de ensino médio.	27 estados e 11 distritos escolares urbanos.	Estudo descritivo. Questionários autorrespostas enviados aos diretores ou professores das escolas. Análise exploratória descritiva.	Média das escolas que permitiam que os escolares comprassem lanche ou bebidas nas MA ou nos bares e/ou cantinas= 90%; frutas ou vegetais estavam menos disponíveis para compra (45%) do que chocolates (65%), doces (68%) e refresco, isotônicos ou bebidas que não são 100% suco (66%).
Probart et al. 2005	EUA Pensilvânia	Descrever os tipos e a amplitude dos alimentos comercializados nas escolas.	228 escolas de ensino médio.	Estudo descritivo. Questionários autorrespostas foram enviados aos diretores dos serviços de alimentação das escolas, via correio e eletrônica. Análise exploratória descritiva.	Principais alimentos comercializados no sistema <i>à la carte</i> : pizzas, hambúrguês e sanduíches (36%); 94% dos respondentes indicaram que as MA eram disponíveis aos escolares, 3 dos 10 itens mais vendidos foram considerados saudáveis e 41% das escolas disponibilizam bares.
Neumark-Sztainer et al. 2005	EUA Minnesota	Examinar associações entre os padrões alimentares na escola e as políticas e o ambiente de alimentação escolar.	20 escolas de ensino médio (1088 escolares).	Estudo transversal de base analítica. Os escolares preencheram um questionário e foram realizadas entrevistas com os diretores, além de observação na escola. Análise exploratória descritiva e modelos mistos.	Campus escolar aberto durante o almoço: escolares apresentaram > tendência de almoçar em <i>fast food</i> em comparação à escolas com o campus fechado (0,7 dias/sem vs 0,2 dias/sem, $p<0,001$). Escolas com políticas de alimentação: escolares referiram comprar lanches numa média de 0,5 dias/sem, vs 0,9 dias/sem nas escolas sem políticas ($p<0,001$).

Cont. Tabela 1

Temple et al. 2005	Cidade do Cabo África do Sul	Investigar os padrões de consumo alimentar de adolescentes e revelar a qualidade nutricional dos alimentos consumidos e comprados na escola.	14 escolas (476 adolescentes).	Estudo transversal de base analítica. Questionário sobre hábitos alimentares na escola. Testes: <i>qui-quadrado, t e Mann-Whitney</i> . Correlação de Pearson.	69% dos adolescentes compravam alimentos na escola. Destes 70% compravam itens "não saudáveis". Estudantes pertencentes a escolas de alto nível socioeconômico apresentavam probabilidade 2x maior de trazerem alimentos à escola (65% vs 31%, $p<0,001$) e > pontuação no teste de alimentos saudáveis e não saudáveis ($p<0,01$).
Cullen & Zakeri 2004	EUA Texas	Avaliar o impacto do acesso às lanchonetes sobre o consumo de refrigerantes, leite, vegetais e frutas em escolares.	594 escolares do ensino fundamental.	Estudo de coorte (dois anos). Escolares completaram 4 registros alimentares do almoço escolar. No 1º ano os alunos só tinham acesso à refeição do programa escolar, enquanto que no 2º bares e restaurantes <i>à la carte</i> estavam disponíveis. Análise exploratória descritiva e teste <i>Wilcoxon</i> .	1º ano: porções de frutas, vegetais e leite diminuíram 33%, 42% e 35% ($p<0,001$) e as porções de vegetais com ATG e refrigerantes aumentaram 68% e 62%, respectivamente ($p<0,001$). 2º ano: consumo de vegetais com ATG ($p<0,001$) e leite ($p<0,05$) aumentou em 30% e 14% e o consumo de vegetais ($p<0,05$) e refrigerantes ($p<0,05$) diminuiu 10% e 12%, respectivamente.
Drummond & Sheppard 2004	Sul da Austrália	Conhecer o funcionamento das cantinas escolares.	778 escolas.	Estudo descritivo. Questionários distribuídos aos supervisores das cantinas ou diretores das escolas. Análise exploratória descritiva.	Estratégias bem sucedidas para impulsionar as vendas: dias fornecendo um item alimentar específico (23%), aumento da variedade do menu e dos horários de funcionamento (38%). Estratégias sem êxito: venda de saladas (4%) e outros alimentos saudáveis (5%).
Carter & Swinburn 2004	Nova Zelândia	Identificar e quantificar a extensão de elementos "obesogênicos" e a venda dos itens de alta densidade energética nas cantinas escolares.	200 escolas de ensino fundamental e médio.	Estudo descritivo. Questionários autorrespostas enviados aos diretores ou professores das escolas. Análise exploratória descritiva e testes de proporções.	Somente 17% das escolas tinham políticas de alimentação. Os alimentos mais disponíveis eram tortas (79%), sucos (57%) e rolinhos de salsicha (55%). Escolhas menos saudáveis dominaram as vendas de alimentos numa proporção maior que 2:1.
French et al. 2003	EUA Minnesota	Descrever o ambiente de alimentação escolar.	20 escolas de ensino médio (média de 1.731 escolares cada).	Estudo descritivo. Questionários respondidos pelos diretores dos serviços de alimentação. Análise exploratória descritiva.	36% e 35% dos alimentos nas áreas <i>à la carte</i> e nas MA, respectivamente, alcançaram o critério recomendado para o teor de gorduras ($\leq 5,5$ g/porção). A categoria dos <i>chips</i> e biscoitos constituiu a maior parte dos alimentos <i>à la carte</i> (12%).
Kubik et al. 2003	EUA Minnesota	Avaliar a influência das MA disponíveis nas escolas e programas <i>à la carte</i> sobre o consumo de frutas, vegetais e gorduras totais e saturadas de adolescentes.	16 escolas (598 escolares do ensino fundamental).	Estudo transversal de base analítica. Estudantes completaram recordatório dietético de 24h e foram quantificadas a disponibilidade de restaurantes <i>à la carte</i> , o número de MA. Análise exploratória descritiva e análise de variância de modelos mistos.	Alunos de escolas sem programa <i>à la carte</i> consumiram, em média, uma porção a mais de frutas e vegetais quando comparados à escolas com programa (4,23 vs 3,39 porções; $p=0,02$) e a média de calorias provenientes de gorduras atingiu as recomendações, ao contrário das escolas com programas que as excederam (29% vs 31%; $p=0,02$). Cada lanche vendido nas MA refletiu numa diminuição de 11% no consumo de frutas ($p=0,03$).

Legenda: MA = máquinas automáticas; ATG = alto teor de gorduras

variou entre 50 e 80%. A utilização de questionários via correio tradicional e/ou online ocorre geralmente devido à facilidade e ao baixo custo da aplicação desses instrumentos, no entanto, em algumas situações a utilização de dados autorreferidos pode interferir na fidedignidade dos resultados. Apesar desta possível limitação, ressalta-se que determinados estudos necessitam que a coleta de dados seja feita desta maneira²⁹.

Outros instrumentos utilizados foram entrevistas aplicadas junto aos diretores de serviços de alimentação, representantes dos distritos escolares, funcionários das escolas e alunos^{21,23,24}, técnicas para avaliar o consumo alimentar dos escolares (registro alimentar auto aplicado¹⁶, recordatório de 24 horas¹⁷ e questionário de frequência alimentar²³) (Tabela 1). Assim, ressalta-se que apenas três estudos utilizaram métodos de investigação do consumo alimentar de escolares. A qualidade das informações obtidas a partir da aplicação destes instrumentos é dependente da capacidade cognitiva dos entrevistados, especialmente no que se refere à memória e a estimativa do tamanho das porções dos alimentos.

Cabe ressaltar que a maioria destas investigações foi realizada em escolas de ensino fundamental e médio. Temple et al.¹² investigaram os padrões de consumo alimentar de adolescentes da cidade do Cabo (África do Sul) e verificaram que a maioria dos alimentos consumidos possuíam altos teores de gorduras, açúcares e sal e continham baixos teores de fibras, sendo classificados pelos autores como escolhas não saudáveis. Corroborando com este estudo, Arcan et al.²³, em Minnesota, EUA, verificaram que as escolhas alimentares de adolescentes foram positivamente associadas com o consumo de bebidas açucaradas e alimentos com altos teores de gorduras na escola. Cullen & Zakeri¹⁶ investigando uma coorte de escolares de 4^a e 5^a séries do ensino fundamental durante dois anos no Texas- EUA, identificaram que os mesmos apresentaram um consumo inferior de frutas ($p < 0,05$) e superior de refrigerantes ($p < 0,05$) no 2^o ano em que tiveram acesso aos bares e restaurantes escolares, quando comparados com o 1^o ano, onde só tinham acesso aos programas de alimentação. Embora essas pesquisas tenham sido realizadas em diferentes locais, observa-se que a alimentação dos escolares tende a se caracterizar por escolhas não saudáveis.

Algumas pesquisas têm sido realizadas com a finalidade de descrever os alimentos disponíveis para venda no ambiente escolar. No caso dos EUA, os alimentos na escola podem ser disponibilizados por meio do programa

de café da manhã e almoço, sistemas *à la carte*, restaurantes estudantis, máquinas automáticas, entre outras¹⁶. Kann et al.¹ e Probart et al.¹⁵ ressaltaram que embora os itens alimentares saudáveis (salgados assados, frutas *in natura*, sucos naturais e saladas) estivessem disponíveis nos restaurantes *à la carte* e nas máquinas automáticas de escolas de ensino médio dos EUA, os alimentos de baixo valor nutricional (refrigerantes, sucos artificiais, pizzas, hambúrguês e guloseimas) encontravam-se amplamente disponíveis, podendo interferir negativamente na qualidade da alimentação escolar. Kubik et al.¹⁷ por sua vez, verificaram que os lanches disponíveis nas máquinas automáticas foram negativamente associados ao consumo de frutas por adolescentes ($p = 0,03$).

Carter e Swinbrun⁸ destacaram que os alimentos mais disponíveis nas cantinas escolares da Nova Zelândia eram tortas, sucos e rolinhos de salsicha, e atentaram para a importância de implantação de medidas de intervenção e políticas públicas que orientem e conduzam à alimentação escolar saudável. Terry-McElrath et al.²⁵ identificaram uma tendência do aumento na oferta de alimentos com menores teores de gorduras e a diminuição na disponibilidade de alimentos ricos em açúcares e gorduras nas máquinas automáticas, lanchonetes e serviços *à la carte* em escolas de ensino médio dos Estados Unidos.

Em uma pesquisa realizada no Brasil, no Estado de Santa Catarina, metade das escolas investigadas possuíam cantinas ($n = 156$), sendo que a rede particular de ensino destacou-se em relação a pública quanto à presença deste tipo de estabelecimento ($p < 0,001$). Muitas cantinas disponibilizavam itens de baixo valor nutricional, entretanto 68% das cantinas não comercializavam salgados fritos, refrigerantes, pipocas/salgadinhos industrializados e balas/pirulitos/gomas de mascar, conforme Lei Estadual nº 12.061/2001 que dispõe sobre critérios de concessão de serviços de lanches e bebidas nas unidades educacionais¹⁰. Em relação às dificuldades que os responsáveis pelas cantinas encontravam para implementar uma cantina escolar saudável, o estudo apontou: dificuldades financeiras (34,0%); falta de apoio da comunidade escolar (17,3%); baixa aceitação dos escolares (11,5%). A fiscalização destes estabelecimentos é necessária, juntamente com ações de educação nutricional, visando promover hábitos alimentares saudáveis e fornecer subsídios para políticas de alimentação escolar¹⁰.

Probart et al.¹⁸ sugeriram que o incentivo à comercialização de refrigerantes por meio de propagandas

Tabela 2. Relação dos estudos de intervenção no ambiente escolar, segundo autoria e ano de publicação, local de realização, local de realização, objetivo, população e amostra, estratégia de intervenção e resultados, publicados no período de 2002 a 2011

Autor/ ano de publicação	Local de realização	Objetivos	População e amostra	Estratégia de intervenção e análise dos dados	Principais resultados
Mendoza, Watson, Cullen 2010	EUA Texas	Avaliar o impacto de política de alimentação escolar na densidade energética (DE) de alimentos consumidos por escolares.	3 escolas públicas de ensino médio.	Restrição no tamanho das porções de lanches com altos teores de gorduras e/ou açúcares e bebidas açucaradas. DE1: energia dos alimentos da refeição, sem bebidas/peso em grama (previamente associada com obesidade e resistência de insulina); DE2: além dos alimentos, incluiu as bebidas. Análise de variância/co-variância e testes não paramétricos.	Após a implementação da política, a DE 1 diminuiu de 2,80 +/- 1,08 kcal/g para 2,17 +/- 0,78 kcal/g ($p < 0,0001$). A DE2 diminuiu de 1,38 +/- 0,76 kcal/g para 1,29 +/- 0,53 kcal/g ($p < 0,0001$).
Cullen et al. 2007	EUA Califórnia, Texas e Carolina do Norte	Examinar a viabilidade na substituição de mudanças ambientais em serviços de alimentação escolar, durante um estudo piloto de 6 semanas.	6 escolas de ensino médio distribuídas em três estados.	13 metas propostas para aumentar a variedade e o consumo de frutas, vegetais, água e, diminuir o acesso a bebidas industrializadas e a porções grandes de salgadinhos com altos teores de gorduras. Escola obteve sucesso quando cumpria $\geq 75\%$ das metas. Análise exploratória descritiva.	Média de alcance total das metas: 92%. Nenhum dos serviços à la carte aumentou a oferta de frutas/vegetais. Objetivos mais difíceis de serem alcançados: aumento da comercialização de água e diminuição das porções das bebidas industrializadas. A venda de bebidas e salgadinhos industrializados declinou em 28% e 16%, respectivamente; a venda da água e de salgadinhos com BTG aumentou em 51% e 775%, respectivamente.
Lytle et al. 2006	EUA Minnesota	Examinar os efeitos de uma intervenção visando aumentar a disponibilidade e a venda de frutas, vegetais e alimentos com BTG na escola.	16 escolas de ensino médio (8 intervenção e 8 controles), equivalente a 3.600 escolares.	Aulas baseadas no currículo, panfletos informativos, e aumento de opções mais saudáveis no programa <i>à la carte</i> . Análises de covariância e variância.	Comparadas com as escolas controles, as escolas com intervenção ofereceram ($p=0,04$) e venderam ($p=0,07$) alimentos mais saudáveis <i>à la carte</i> .
French 2005	EUA Minnesota	Três investigações analisaram estratégias de intervenção para aumentar a compra de alimentos saudáveis na escola.	Escolas de ensino médio. No 1º, 2º e 3º estudos participaram 12, 2 e 20 escolas, respectivamente.	Redução do preço e aumento da disponibilidade de alimentos saudáveis, nas MA e nos restaurantes <i>à la carte</i> . Análise exploratória descritiva.	Reduções nos preços de 10%, 25% e 50%, em lanches com BTG resultaram num aumento de vendas de 9%, 39% e 93%, respectivamente, em comparação com as condições de preço habituais.
Cullen & Thompson 2005	EUA Texas	Avaliar o impacto potencial da redução no tamanho das porções de alimentos comercializados na escola.	23 escolas de ensino médio.	Redução no tamanho das porções de alimentos ricos em açúcar, gordura e/ou sal. Análise exploratória descritiva.	Era vendida uma média diária de 11 lkal por escolar/dia. 47kcal/dia foram reduzidas quando as porções menores foram disponibilizadas.
Davee et al. 2005	EUA Maine	Disponibilizar lanches e bebidas mais saudáveis nas MA e programas <i>à la carte</i> .	7 escolas de ensino médio (4 intervenção e 3 controles), equivalente a 581 escolares.	Mudanças nutricionais no programa <i>à la carte</i> e nas MA foram realizadas nas escolas com intervenção. Análise exploratória descritiva.	80% dos lanches e 54% das bebidas nas MA e 69% dos itens nos programas <i>à la carte</i> não satisfiziam as orientações nutricionais. Mudanças saudáveis foram facilmente atingidas nas MA.
French et al. 2004	EUA Minnesota	Avaliar a capacidade de uma intervenção ambiental em aumentar a venda de alimentos com BTG em restaurantes de escolas de ensino médio.	20 escolas de ensino médio (10 intervenção e 10 controles), com média de 1.731 escolares cada.	Aumento da disponibilidade de alimentos com BTG e promoções destes alimentos por dois anos. Análise de série temporal com o método <i>Prais-Winsten</i> , teste <i>Wilcoxon</i> e análise de variância de modelo misto.	1º ano: escolas com intervenção mostraram aumento de 10% nas vendas de alimentos com BTG, vs uma diminuição de 2,8% no grupo controle ($p=0,002$); 2º ano: alto percentual de vendas de alimentos com BTG (33,6% nas escolas com intervenção e 22,1% nas escolas controle, $p=0,04$).

Legenda: MA = máquinas automáticas; BTG = baixo teor de gordura.

poderia interferir desfavoravelmente no desenvolvimento de ambientes escolares saudáveis, tendo em vista que as propagandas foram negativamente relacionadas à participação diária no almoço escolar ($p=0,001$). Este mesmo grupo de pesquisadores publicou outro trabalho salientando a relevância do monitoramento e cumprimento das políticas de alimentação escolar, sendo uma oportunidade ímpar para o desenvolvimento de ambientes saudáveis¹⁹.

Greves e Rivara⁶ e McDonnell et al.²⁰ por sua vez, descreveram as políticas de alimentação escolar existentes nos EUA. Apenas 19 dos 51 distritos escolares dos EUA possuíam políticas para alimentos comercializados⁶, sendo ressaltada a importância da fiscalização sobre o cumprimento das políticas existentes. Neumark-Sztainer et al.²¹ verificaram que as políticas de alimentação que objetivam diminuir o acesso aos alimentos ricos em gorduras e açúcares estiveram associadas com uma menor frequência de compra destes itens pelos escolares em Minnesota, EUA. Nas escolas com políticas de alimentação, os escolares preferiram comprar lanches numa média de 0,5 dias/semana, versus 0,9 dias/semana nas escolas sem políticas ($p<0,001$).

French et al.²² verificaram que aproximadamente 36% e 35% dos alimentos nos programas *à la carte* e nas máquinas automáticas, respectivamente, alcançaram o critério recomendado para o teor de gorduras ($\leq 5,5g$ /porção/100 g) nas escolas de ensino médio de Minnesota, EUA. Drummond e Sheppard⁷ na Austrália, verificaram que em dias especiais em que era fornecida maior variedade de alimentos, as promoções e marketing foram estratégias bem sucedidas para impulsionar as vendas em cantinas escolares, enquanto a venda de frutas e saladas não apresentou êxito.

Patel et al.²⁴ avaliaram *in loco* a implementação de políticas escolares relacionadas ao controle da obesidade, observando que os alimentos e bebidas comercializados em lanchonetes de escolas de ensino médio estavam de acordo com as diretrizes nutricionais, no entanto tais autores relatam que o número reduzido de recursos humanos e o elevado custo das lanchonetes foram obstáculos à execução das políticas. Finkelstein, Hill e Whitaker²⁶ descreveram que 43% das escolas de ensino médio dos EUA possuíam políticas de bem-estar e apenas 22% tinham conselhos consultivos em saúde e nutrição. Esses autores também observaram que a maioria das escolas vendia itens *à la carte* nas lanchonetes e em máquinas automáticas, sendo que estas fontes geralmente

continham alimentos de baixo valor nutricional e elevado valor energético, como os "junk food".

Estudos de intervenção visando à alimentação escolar saudável

Os sete estudos selecionados abordando estratégias de intervenção com o objetivo de disponibilizar alimentos mais saudáveis na escola foram desenvolvidos nos EUA. As estratégias utilizadas nesses estudos foram: aumento da disponibilidade de alimentos mais saudáveis no programa *à la carte* e nas máquinas automáticas^{30-33,35}; aulas e panfletos informativos³¹; redução de preço^{30,33} e do tamanho das porções^{34,36} (Tabela 2).

Lytle et al.³¹ sugeriram que o serviço de alimentação escolar pode e deve oferecer opções mais saudáveis (preparações com teor de gorduras ≤ 5 g/100 g, frutas e vegetais) e quando tais opções encontram-se disponíveis por meio de escolhas atrativas, os estudantes tendem a fazer essas escolhas. Este estudo destacou que pesquisas para desenvolver e validar estratégias de intervenção são de extrema importância quando se almeja hábitos alimentares saudáveis. Davee et al.³² verificaram que o aumento da disponibilidade de lanches e bebidas considerados mais saudáveis nas máquinas automáticas e programas *à la carte* (cereais, oleaginosas e frutas) pode qualificar o ambiente de alimentação escolar, sendo que quando se adotam políticas de alimentação e nutrição as mudanças são mais efetivas. Ressalta-se, no entanto, que a investigação de Davee et al.³² não avaliou o impacto das mudanças sobre o consumo alimentar dos escolares, sendo este um ponto levantado pelos autores como prioritário para futuras investigações.

Outros estudos também verificaram que estratégias para aumentar a aquisição de alimentos saudáveis na escola foram positivas^{30,33}. Cullen e Thompson³⁴ obtiveram impacto positivo com a redução no tamanho das porções de alimentos comercializados na escola, ricos em açúcar, gorduras e/ou sal, sobre o consumo energético dos alimentos consumidos por escolares, ocorrendo uma diminuição de 47kcal/dia quando as porções menores foram disponibilizadas.

Mendoza, Watson e Cullen³⁶ avaliaram o impacto da política de alimentação escolar na densidade energética (DE) de alimentos consumidos por escolares, usando registros alimentares com os estudantes, antes e após a implementação da política. Esta foi associada com reduções desejáveis na densidade energética dos alimentos consumidos pelos estudantes, sugerindo melhora na

ingestão de nutrientes, como resultado de um consumo alimentar mais saudável. Cullen et al.³⁵ verificaram que o estudo piloto realizado em três estados norte-americanos mostrou que a implementação de mudanças nos serviços comerciais de alimentação escolar foi viável, qualificando nutricionalmente os alimentos disponíveis. Por outro lado, os autores destacaram a dificuldade na adesão dos estudantes para algumas das medidas implementadas, ressaltando que os próximos estudos devem investigar estratégias para sensibilizar a comunidade escolar quanto à importância do ambiente saudável.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente revisão da literatura baseou-se na pergunta de partida “quais os alimentos comercializados e as estratégias de intervenção implementadas para a compra de alimentos saudáveis no contexto escolar”? Diante dos resultados expostos, destaca-se que os estudos internacionais e nacionais selecionados indicam que há uma ampla disponibilidade de alimentos considerados de baixo valor nutricional sendo comercializados nas escolas, de forma que a implementação de políticas bem estruturadas que visem à alimentação saudável, é fundamental para diminuir a compra destes itens e, conseqüentemente promover a saúde escolar. Além da estruturação de políticas públicas surge a necessidade da fiscalização para avaliar o seu cumprimento, bem como a realização de estudos longitudinais que acompanhem a implementação dessas políticas e o consumo alimentar nas escolas. Na literatura nacional, ressalta-se a necessidade da realização de mais pesquisas abordando a temática, tendo em vista que foram encontrados somente dois artigos sobre este assunto no período da revisão.

Enfatiza-se que os estudos de intervenção selecionados obtiveram resultados positivos, tais como aumento das vendas de alimentos com baixo teor de gordura^{30,35} e o declínio de vendas de bebidas e salgadinhos industrializados³⁵, sugerindo que o desenvolvimento de estratégias para qualificar a alimentação escolar é válido e tende a trazer resultados positivos. Destaca-se, no entanto, que as estratégias adotadas pelos estudos em questão tiveram como foco o aumento da disponibilidade no processo de comercialização de alimentos considerados saudáveis.

Foram encontrados três estudos brasileiros que relataram resultados obtidos por meio de programas de intervenção na escola, delineados para disseminar práticas

alimentares saudáveis e auxiliar na prevenção do sobrepeso/obesidade infanto-juvenil^{9,11,38}. Todavia, esses estudos não foram incluídos na revisão sistemática por não terem como foco alimentos comercializados dentro do ambiente escolar ou por não discriminarem se os hábitos alimentares e a fonte dos alimentos consumidos relacionavam-se exclusivamente aos estabelecimentos comerciais escolares. Assim, embora poucos estudos com as características buscadas na revisão tenham sido encontrados no Brasil no período investigado, torna-se importante ressaltar que os “*Dez Passos para a Promoção da Alimentação Saudável nas Escolas*”, lançado em 2004 pelo Ministério da Saúde (MS) como um conjunto de estratégias para propiciar a adesão da comunidade escolar aos hábitos alimentares saudáveis e atitudes promotoras da saúde, foi muito importante³⁷, pois dentre as estratégias propostas estão à restrição da oferta, da promoção comercial e da venda de alimentos ricos em gorduras, açúcares e sal; o desenvolvimento de opções de alimentos e refeições saudáveis na escola e o aumento da oferta e da promoção do consumo de frutas, legumes e verduras, com ênfase nos alimentos regionais. Além destas estratégias, o MS reforça a importância da abordagem da promoção da saúde e da alimentação saudável nas atividades curriculares das escolas, salientando a importância de ações bem estruturadas que envolvam a comunidade escolar³⁷.

Ainda em relação ao Brasil, vale salientar os principais achados do estudo conduzido por Assis et al.³⁹, que realizaram avaliação qualitativa da dieta de 1.232 escolares de 7 a 10 anos, matriculados em escolas públicas e privadas de Florianópolis, Santa Catarina. O referido estudo fez análise da concordância da dieta com as recomendações do Guia Alimentar para a População Brasileira, utilizando para isto o Questionário Alimentar do Dia Anterior (QUADA). A maioria das crianças apresentou concordância com o Guia para o consumo de carnes/peixes, feijão, doces e realização de três refeições e dois lanches, porém somente 6,5% atingiram as recomendações dos cereais e 15% das frutas e hortaliças.

Considerando-se que a alimentação no ambiente escolar deve ter função pedagógica, bem como as mudanças no padrão alimentar da população, com preocupantes reflexos observados na população infantil, torna-se fundamental o desenvolvimento de ações que promovam a adoção de práticas alimentares saudáveis no ambiente escolar. Faz-se necessária a ação conjunta de pais, professores, profissionais da saúde, gestores, legisladores e publicitários entre outros, para promover ambientes e

estratégias propícias à promoção de hábitos alimentares saudáveis e que incentivem também a prática de exercícios físicos entre os escolares.

Dentre as limitações do presente estudo destaca-se que esta revisão não esgotou as bases eletrônicas de dados internacionais, o que pode ter ocasionado a não inclusão de algumas investigações. Entretanto, as bases investigadas Medline, Lilacs e Scielo-Br fornecem uma ampla cobertura de periódicos no contexto mundial (Medline), latinoamericano (LILACS) e Brasil (Scielo-Br). Ressalta-se a heterogeneidade metodológica dos estudos analisados no que diz respeito ao desenho, amostragem, instrumentos de coleta e análise de dados, desfechos e estratégias de intervenção utilizadas (quando era o caso), o que limitou a realização de análise comparativa dos resultados.

Por fim, reforça-se a importância do nutricionista, em conjunto com os profissionais da educação e da saúde, no estímulo aos alunos e à comunidade escolar na prática de hábitos alimentares saudáveis na escola. Sabe-se que a transformação consciente das práticas alimentares não é um processo imediato, exigindo tempo e dedicação. Assim, o desenvolvimento de medidas paralelas como a proibição da oferta de produtos não saudáveis no ambiente escolar e o oferecimento de opções variadas e atrativas, ajudaria as crianças e os jovens a escolherem alimentos que contribuam para o crescimento e o desenvolvimento saudáveis e melhor qualidade de vida.

REFERÊNCIAS

1. Kann L, Grunbaum J, McKenna ML, Wechsler H, Galuska DA. Competitive foods and beverages available for purchase in secondary schools - selected sites, United States, 2004. *J Sch Health*. 2005; 75(10):370-4.
2. World Health Organization, Pan American Health Organization. *Escolas Promotoras de Saúde: modelo e guia para a ação*. Washington (DC): OPAS; 1996. (HSP/SILOS, 36). p.72.
3. World Health Organization. *Global strategy on diet, physical activity and health*. Fifty-seventh World Health Assembly. WHA57.17; 2004; Geneva: WHO; 2004.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. *Política Nacional de Alimentação e Nutrição*. [acesso 2011 Dez 15]. Disponível em: [http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pnan.pdf].
5. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção a Saúde. Departamento de Atenção Básica. *Experiências estaduais e municipais de regulamentação da comercialização de alimentos em escolas no Brasil: identificação e sistematização do processo de construção e dispositivos legais adotados*. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2007. (Série B. Textos Básicos de Saúde).
6. Greves HM, Rivara FP. Report card on school snack food policies among the United States' largest school districts in 2004-2005: room for improvement. *Int J Behav Nutr Phys Act* [Internet]. 2006;3(1). Disponível em: [http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1352376].
7. Drummond C, Sheppard L. South Australian school canteens 2003: Revisiting the 1990 school canteen/tuckshop survey. *J HEIA*. 2004;11(3):13-22.
8. Carter MA, Swinburn B. Measuring the 'obesogenic' food environment in New Zealand primary schools. *Health Promot Int*. 2004;19(1):15-20.
9. Fernandes PS, Bernardo CO, Campos RMB, Vasconcelos FAG. Avaliação do efeito da educação nutricional na prevalência de sobrepeso/obesidade e no consumo alimentar de escolares do ensino fundamental. *J Pediatr*. 2009;85(4):315-21.
10. Gabriel CG, Vasconcelos FAG, Andrade DF, Schmitz BAS. First Law regulating school canteens in Brazil: evaluation after seven years of implementation. *Arch Latinoam Nutr*. 2009;59(2):128-38.
11. Gabriel CG, Santos MV, Vasconcelos FAG. Avaliação de um programa para promoção de hábitos alimentares saudáveis em escolares de Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. *Rev Bras Saude Mater Infant*. 2008;8(3):299-308.
12. Temple NJ, Steyn NP, Myburgh NG, Nel JH. Food items consumed by students attending schools in different socioeconomic areas in Cape Town, South Africa. *Nutrition*. 2006;22(3):252-8.
13. Moher D, Tetzlaff J, Tricco AC, Sampson M, Altman DG. Epidemiology and reporting characteristics of Systematic Reviews. *PLoS Med*. 2007;4(3):447-55.
14. Von Elm E, Altman DG, Egger M, Pocock SJ, Gotsche PC, Vandenbroucke JP. The strengthening of reporting of observational studies in epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. *J Clin Epidemiol*. 2008;61(4): 344-9.
15. Probart C, McDonnell E, Weirich JE, Hartman T, Bailey-Davis L, Prabhakar V. Competitive foods available in Pennsylvania public high schools. *J Am Diet Assoc*. 2005;105(8):1243-9.
16. Cullen KW, Zakeri I. Fruits, vegetables, milk, and sweetened beverages consumption and access to a la carte/snack bar meals at school. *Am J Public Health*. 2004;94(3):463-7.
17. Kubik MY, Lytle LA, Hannan PJ, Perry CL, Story M. The association of the school food environment with dietary behaviors of young adolescents. *Am J Public Health*. 2003;93(7):1168-73.
18. Probart C, McDonnell E, Bailey-Davis L, Weirich E. Existence and predictors of soft drink advertisements in Pennsylvania high schools. *J Am Diet Assoc*. 2006;106(12):2052-6.
19. Probart C, McDonnell E, Hartman T, Weirich JE, Bailey-Davis L. Factors associated with the offering and sale of competitive foods and school lunch participation. *J Am Diet Assoc*. 2006;106(2):242-7.
20. McDonnell E, Probart C, Weirich E, Hartman T, Bailey-Davis L. School competitive food policies: perceptions of Pennsylvania public high school foodservice directors and principals. *J Am Diet Assoc*. 2006;106(2):271-6.
21. Neumark-Sztainer D, French SA, Hannan PJ, Story M, Fulkerson JA. School lunch and snacking patterns among high school students: associations with school food environment and policies. *Int J Behav Nutr Phys Act* [Internet]. 2005;2(14). Disponível em: [http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1266392].

22. French SA, Story M, Fulkerson JA, Gerlach AF. Food environment in secondary schools: a la carte, vending machines, and food policies and practices. *Am J Public Health*. 2003;93(7):1161-7.
23. Arcan C, Kubik MY, Fulkerson JA, Davey C, Story M. Association between food opportunities during the school day and selected dietary behaviors of alternative high school students, Minneapolis/Saint Paul, Minnesota, 2006. *Prev Chronic Dis*. 2011 Jan;8(1):A08.
24. Patel AI, Bogart LM, Uyeda KE, Martinez H, Knizewski R, Ryan GW, Schuster MA. School site visits for community-based participatory research on healthy eating. *Am J Prev Med*. 2009;37(6 Suppl 1):S300-6.
25. Terry-McElrath YM, O'Malley PM, Delva J, Johnston LD. The school food environment and student body mass index and food consumption: 2004 to 2007 national data. *J Adolesc Health*. 2009;45(3 Suppl):S45-56.
26. Finkelstein DM, Hill EL, Whitaker RC. School food environments and policies in US public schools. *Pediatrics*. 2008;122(1):e251-9.
27. Gabriel CG, Santos M V, Vasconcelos FAG, Milanez GHG, Hulse SB. Cantinas escolares de Florianópolis: existência e produtos comercializados após a instituição da Lei de Regulamentação. *Rev Nutr*. 2010;23(2):191-9.
28. National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2007-2008. [acesso 2010 Set 20]. Disponível em: [<http://www.cdc.gov/obesity/childhood/index.html>].
29. Pregolato TS, Mesquita LM, Ferreira PG, Santos MM, Santos CC, Costa RF. Validade de medidas autorreferidas de massa e estatura e seu impacto na estimativa do estado nutricional pelo Índice de Massa Corporal. *Rev Bras Crescimento Desenvolvimento Hum*. 2009;19(1):35-41.
30. French SA, Story M, Fulkerson JA, Hannan P. An environmental intervention to promote lower-fat food choices in secondary schools: outcomes of the TACOS study. *Am J Public Health*. 2004;94(9):1507-12.
31. Lytle L A, Kubik M Y, Perry C, Story M, Birnbaum A S, Murray DM. Influencing healthful food choices in school and home environments: results from the TEENS study. *Prev Med*. 2006;43(1):8-13.
32. Davee AM, Blum JEW, Devore RL, Beaudoin CM, Kaley LA, Leiter JL, et al. The Vending and à la carte policy intervention in Maine public high schools. *Prev Chronic Dis* [Internet]. 2005. Disponível em: [http://www.cdc.gov/pcd/issues/2005/nov/05_0076.htm].
33. French SA. Public health strategies for dietary change: schools and workplaces. *J Nutr*. 2005;135(4):910-2.
34. Cullen KW, Thompson DI. Texas school food policy changes related to middle school a la carte/snack bar foods: potential savings in kilocalories. *J Am Diet Assoc*. 2005;105(12):1952-4.
35. Cullen KW, Hartstein J, Reynolds KD, Vu M, Resnicow K, Greene N, White MA. Studies to Treat or Prevent Pediatric Type 2 Diabetes Prevention Study Group. Improving the school food environment: results from a pilot study in middle schools. *J Am Diet Assoc*. 2007;107(3):484-9.
36. Mendoza JA, Watson K, Cullen KW. Change in dietary energy density after implementation of the Texas Public School Nutrition Policy. *J Am Diet Assoc*. 2010;110(3):434-40.
37. Brasil. Ministério da Saúde. Dez passos para uma alimentação saudável na escola. 2004. [acesso 2011 Jul 15]. Disponível em: [<http://189.28.128.100/nutricao/docs/geral/dezPassosPasEscolas.pdf>].
38. Vargas, ICS, Sichieri R, Sandre-Pereira G, Veiga G.V. Avaliação de programa de prevenção de obesidade em adolescentes de escolas públicas. *Rev Saúde Pública*. 2011;45 (1):59-68.
39. Assis MAA, Calvo MCM, Kupek E, Vasconcelos FAG, Campos VC, Machado M, et al. Qualitative analysis of the diet of a probabilistic sample of schoolchildren from Florianópolis, Santa Catarina State, Brazil, using the Previous Day Food Questionnaire. *Cad Saúde Pública*. 2010;26(7):1355-65.
40. Brasil. Ministério da Saúde. Guia Alimentar para a População Brasileira: Promovendo a Alimentação Saudável. 2006. [acesso 2011 Jul 23]. Disponível em: [http://dtr2001.saude.gov.br/editora/produtos/livros/pdf/05_1109_M.pdf].

Caracterização de *Staphylococcus* coagulase-positiva utilizando plasmas de diferentes espécies animais

Characterization of coagulase-positive *Staphylococcus* by using plasmas from different animal species

RIALA6/1416

Geraldo Márcio da COSTA^{1*}, Ulisses de Pádua PEREIRA¹, Dircéia Aparecida da Costa CUSTÓDIO¹, Nivaldo da SILVA²

*Endereço para correspondência: ¹Laboratório de Microbiologia, Setor Medicina Veterinária Preventiva, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil. CEP-37200-000, campus universitário. Telefone: (35) 3829-1727, e-mail: gmcosta@dmv.ufla.br

²Laboratório de Doenças Bacterianas, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, UFMG.

Recebido: 09.05.2011 - Aceito para publicação: 07.10.2011

RESUMO

No presente estudo foi avaliada a eficiência de plasmas de origens leporina, bovina, equina, canina e humana na execução do teste de coagulase em cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de bovinos (n=174), de seres humanos (n=71) e de cães (n=70). As leituras dos testes foram realizadas após diferentes tempos de incubação. O plasma leporino apresentou os melhores resultados, exceto nos isolados bacterianos de cão, para os quais o plasma de equino foi o que demonstrou os melhores resultados entre 4 e 12 horas de incubação. Nenhum isolado que tenha apresentado resultado negativo frente ao plasma leporino reagiu positivamente aos demais plasmas. Os plasmas de coelho e de cavalo foram os que revelaram os melhores resultados para os isolados bacterianos de origem humana e bovina. Verificou-se que os plasmas, quando utilizados para isolados da espécie homóloga, mostraram baixa eficiência. A coagulação do plasma leporino ocorreu em até duas horas de incubação em 92% das amostras de *Staphylococcus* de origem bovina. De acordo com os resultados obtidos, o plasma de equino pode ser utilizado para a realização de testes de coagulase em cepas de *Staphylococcus* isoladas de cães, bovinos e seres humanos, com resultados semelhantes àqueles observados com o plasma leporino.

Palavras-chave. identificação bacteriana, plasma, *Staphylococcus* coagulase-positiva, *Staphylococcus* caracterização.

ABSTRACT

This study evaluated the efficiency of plasmas from rabbits, cattle, horses, dogs and humans for improving the coagulase test performance on *Staphylococcus* strains isolated from bovine mastitis (n=174), human (n=71) and dogs (n=70). The readings of the tests readings were performed after different incubation periods. Leporine plasma showed the best results in the coagulation tests, excepting on the bacteria strains isolated from dogs. To these strains, the equine plasma showed the best results in the first 12 hours of incubation and the rabbit plasma exhibited similar results after 12 hour of incubation. No strain, with a negative result for the rabbit plasma, reacted positively to the other animal plasmas. Rabbit and equine plasmas exhibited the best results to the bacterial isolates with human and bovine origins. Low efficiency was evidenced in performing the assays when using the plasmas of the homologous species from the strain that was isolated. Coagulation of leporine plasma occurred within two hours of incubation in 92% of bovine strains. According ours results, the equine plasma might be used for performing the coagulase tests in *Staphylococcus* isolates from dogs, cattle and humans, and getting similar results to those provided by the rabbits plasma.

Keywords. bacteria identification, plasma, coagulase positive *Staphylococcus*, *Staphylococcus* characterization.

INTRODUÇÃO

Os micro-organismos do gênero *Staphylococcus* apresentam um diversificado arsenal de fatores de patogenicidade, representado por adesinas, enterotoxinas, hemolisinas, leucocidinas, produção de biofilmes, habilidade de invadir células epiteliais, dentre outros, os quais contribuem para colonizar e lesionar seus hospedeiros^{1,2}. Entre estes fatores, destaca-se a estafilocagulase, uma proteína que possui ação enzimática e reage com a protrombina, formando um complexo denominado estafilotrombina que converte o fibrinogênio em fibrina e coagula o plasma^{1,3}. Esta enzima extracelular é produzida por várias espécies do gênero *Staphylococcus*, incluindo, a maioria das cepas de *Staphylococcus aureus* e de *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus delphini*, *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* e *Staphylococcus scheliferi* subsp. *coagulans*, sendo usada como um indicador de virulência e marcador fenotípico para a diferenciação destas espécies^{4,5}.

Existem 29 espécies e subespécies no gênero *Staphylococcus*⁶, as quais têm sido associadas aos diversos quadros patológicos nos seres humanos e nos animais. A identificação precisa de cada uma das espécies por meio de testes bioquímicos usuais é normalmente dispendiosa e trabalhosa. Desse modo, o teste de coagulase em tubo, um teste prático por ser rápido e necessitar de poucos recursos⁷, tem sido utilizado para a identificação de isolados deste gênero dotados de maior potencial patogênico, geralmente de maior interesse clínico e epidemiológico, tanto na medicina humana, quanto na veterinária.

Entre os *Staphylococcus* coagulase-positiva (SCP), *S. aureus* e *S. intermedius* estão envolvidos em importantes quadros patológicos em seres humanos, bovinos e caninos. Nos seres humanos, *S. aureus* tem sido associado com pneumonias, conjuntivites, osteomielites, septicemias, intoxicações alimentares, furunculose, dentre outras patologias^{1,2}. Em bovinos, este micro-organismo tem sido relatado como um dos agentes mais prevalentes na etiologia das mastites e que, isoladamente, causa os maiores prejuízos na pecuária leiteira mundial, ocasionando a redução da produtividade do rebanho e alterações físico-químicas do leite, com prejuízos para a indústria, para os produtores e para a saúde do consumidor^{8,9}. Nos caninos, *S. intermedius* tem sido associado, principalmente, a otites, conjuntivites, piodermites, discoespondilites e abscessos^{10,11}.

Devido à importância clínica e epidemiológica dos SCP nos processos patológicos em seres humanos e nos animais, em relação às demais espécies coagulase-negativa do mesmo gênero, é imprescindível a identificação dos mesmos para que possam ser adotadas alternativas mais adequadas de tratamento e de controle.

Normalmente, para a realização do teste de coagulase, utiliza-se plasma de coelho, que nem sempre está disponível nos laboratórios de diagnóstico microbiológico. Desse modo, em diversos laboratórios, são utilizados plasmas obtidos de seres humanos e de outras espécies de animais para a execução do teste, sem haver uma avaliação da eficiência desta metodologia. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar e comparar a eficiência do teste de coagulase em tubos utilizando plasmas de diferentes espécies para a discriminação de amostras de *Staphylococcus* spp. coagulase-positiva isoladas de bovinos, seres humanos e cães.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de *Staphylococcus*

Foram utilizados 315 isolados de *Staphylococcus* spp. de origens humana, canina e bovina. As amostras de origem humana (n=70) foram obtidas de *swabs* nasais de indivíduos saudáveis da cidade de Lavras, MG. As amostras provenientes de cães (n=71) foram isoladas a partir de *swabs* obtidos do conduto auditivo de cães otopatas e não otopatas atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Lavras. Os isolados de origem bovina (174) foram obtidos de quartos mamários individuais de bovinos da bacia leiteira do sul de Minas Gerais afetados por mastite clínica ou subclínica.

O isolamento das amostras foi realizado em Ágar Sangue (Agar Sangue Base-Himedia®) contendo 5% de sangue desfibrinado de carneiro. As placas foram incubadas em temperatura de 37 °C por 18-24 horas. Para a identificação presuntiva dos micro-organismos pertencentes à família Micrococcaceae e gênero *Staphylococcus*, foram realizados os seguintes testes presuntivos, de acordo com Quinn et al.⁵: observação macroscópica das colônias, verificando-se a presença de hemólise, tamanho e pigmentação de colônias; observação da morfologia microscópica por meio de esfregaços corados pela técnica de Gram; e testes de oxidase e catalase. Após a caracterização, os isolados foram estocados a -70 °C em BHI suplementado com 20% de glicerol até a realização dos ensaios.

Plasmas testados

Foram utilizados plasmas sanguíneos obtidos de coelhos, bovinos, equinos, caninos e de seres humanos. A coleta das amostras de sangue para a obtenção dos plasmas foi feita em seringas estéreis, realizando-se sangria pelas vias indicadas para cada espécie. Foi utilizado como anticoagulante o citrato de sódio na concentração final de 0,05% (p/v). Após a coleta asséptica das amostras de sangue, foi realizada a centrifugação a 5000 rpm (1.800g) por cinco minutos e o sobrenadante (plasma) foi armazenado a -20 °C em frascos esterilizados.

As amostras de plasma obtidas de mais de um doador foram asepticamente homogeneizadas, fracionadas e estocadas em temperatura de -20 °C até a realização dos testes.

Execução do teste de coagulase

Os isolados de *Staphylococcus* spp. que se encontravam estocados a -70 °C foram semeados em caldo BHI e incubados a 37 °C por 18-24 horas. Após este período, as culturas foram avaliadas quanto à pureza por meio de esfregaços corados pela técnica de Gram, sendo utilizadas para a execução dos testes somente as culturas puras.

Para a realização dos testes, as culturas recentes em caldo BHI (Himedia®), cultivadas por 18-24 horas, a 37 °C, foram homogeneizadas e 0,5 mL de cada amostra foi adicionado aos tubos de ensaio contendo 0,3mL de cada um dos tipos de plasma a serem testados (equino, bovino, canino, leporino e humano). Após a adição das culturas, os tubos foram incubados em estufa a 37 °C, realizando-se as leituras após 1, 2, 4, 8, 12, 24 e 48 horas. Foram consideradas coagulase-positiva as amostras que apresentaram formação de coágulo, independente da intensidade de coagulação.

S. aureus (ATCC 25923) foi utilizado como controle positivo dos testes de coagulase e *S. epidermidis* (ATCC 12228) como controle negativo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Oito isolados de *Staphylococcus* de origem canina, 34 de origem humana e 70 de origem bovina apresentaram resultados negativos nos testes de coagulase para todos os plasmas testados, em todos os tempos de incubação. As demais amostras denominadas de SCP, sendo 63 (origem canina), 36 (origem humana) e 104 (origem bovina), apresentaram resultado positivo no

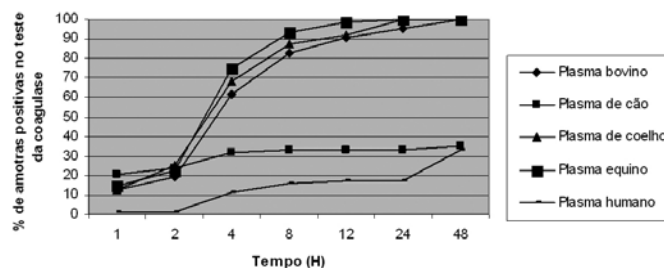


Figura 1. Porcentagens de amostras positivas nos testes de coagulase em tubo, utilizando plasma de diferentes espécies, para identificação de *Staphylococcus* spp. coagulase-positiva isolados de origem canina

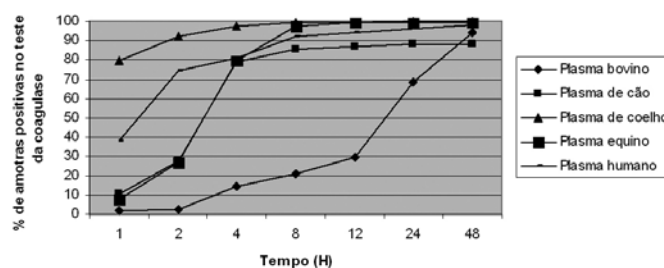


Figura 2. Porcentagens de amostras positivas nos testes de coagulase em tubo, utilizando plasma de diferentes espécies, para identificação de *Staphylococcus* spp. coagulase-positiva isolados de origem humana

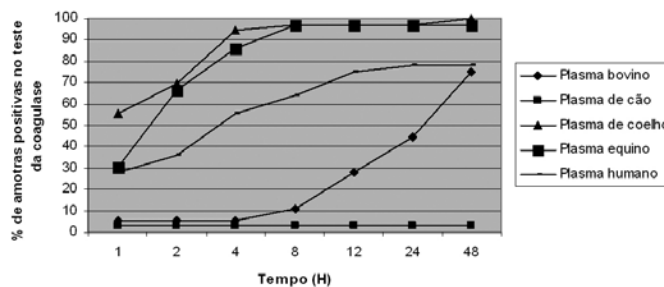


Figura 3. Porcentagens de amostras positivas nos testes de coagulase em tubo, utilizando plasma de diferentes espécies, para identificação de *Staphylococcus* spp. coagulase-positiva isolados de bovinos

teste de coagulase para o plasma de coelho e resultados variáveis para os demais plasmas testados. Nenhuma amostra apontada como coagulase-negativa ao se utilizar o plasma de coelho apresentou resultado positivo para os demais plasmas analisados.

Os resultados dos testes de coagulase obtidos para as amostras SCP podem ser visualizados nas Figuras 1, 2 e 3. Como pode observar-se, para os isolados de bovinos e de seres humanos, o plasma de coelho apresentou as maiores taxas de coagulação nos menores tempos de incubação em relação aos demais plasmas testados (Fig. 2 e 3).

Para os SCP isolados de cão (Figura 1), o plasma de equino foi o que apresentou os melhores resultados entre 4 e 12 horas de incubação, mas com resultados

semelhantes ao plasma leporino a partir da 24^a hora de incubação. O plasma de bovino também apresentou bons resultados para estes isolados, com 95% deles com reação positiva após 24 horas de incubação. Por outro lado, os plasmas de origens humana e canina apresentaram baixa eficiência na discriminação dos SCP obtidos de cães.

Para os SCP de origem humana (Figura 2), os plasmas leporino e equino foram os que apresentaram os melhores resultados, ambos com resultados positivos para 97% dos isolados a partir da oitava hora de incubação. O plasma canino foi o que apresentou o pior desempenho para isolados de origem humana, com apenas 3% dos isolados com resultados positivos frente ao teste após 48 horas de incubação. Também, os plasmas obtidos de caninos e de seres humanos apresentaram baixa eficiência para SCP de origem canina, respectivamente, com apenas 34% e 18% das amostras positivas após 24 horas de incubação (Figura 1).

O plasma de coelho apresentou melhor eficiência para SCP de origem bovina (Figura 3), verificando-se que 92,30% e 99,02% das amostras apresentaram resultados positivos após duas e oito horas de incubação, respectivamente. Para estes mesmos isolados, o plasma de equino apresentou resultados equivalentes aos obtidos para o plasma de coelho a partir da oitava hora de incubação. O plasma bovino foi o que apresentou a menor eficiência para os isolados obtidos de bovinos, com apenas 30% e 69% de reações positivas após 12 e 24 horas de incubação, respectivamente.

Os resultados obtidos mostraram-se concordantes com os relatados por Silva et al.¹² que utilizando 410 amostras de *Staphylococcus* associadas à mastite bovina, verificaram concordância de 100% entre os resultados obtidos para a prova de coagulase realizada com os plasmas de equino e de coelho. Também foram endossados pelos resultados de Bettencourt et al.¹³ que demonstraram que os plasmas de coelho e equino apresentaram melhores resultados que o plasma humano para realização do teste de coagulase para amostras de *S. aureus* isoladas de seres humanos. No entanto, foram diferentes daqueles obtidos por Adesyun e Shehu¹⁴ que observaram, em estudo semelhante, que o plasma de bovino apresentou resultados superiores ao plasma de coelho para amostras de *Staphylococcus* isoladas de swabs nasais de cães. Para os isolados de seres humanos, o plasma de cão apresentou melhores resultados que o plasma de coelho. Neste estudo, embora o plasma de bovino tenha proporcionado resultados satisfatórios

em relação à identificação dos SCP de origem canina, os melhores resultados foram obtidos com o plasma de coelho, seguido pelo plasma de equino (Figura 1). Além disto, o plasma canino foi o que apresentou os piores resultados para os SCP de origem humana (Figura 2). No entanto, estes autores verificaram maior eficiência do plasma de coelho para a discriminação de SCP de origem bovina, em concordância com nossos resultados.

O tempo de leitura demonstrou ser mais relevante para a caracterização de SCP isolados de casos de mastite bovina, verificando-se que a coagulação do plasma de coelho ocorreu em até duas horas de incubação em 92% destas amostras. Para estes mesmos isolados, os plasmas de bovino, equino, canino e humano apresentaram coagulação após duas horas de incubação para 2,8%, 26,9%, 27,8% e 74% das amostras, respectivamente. Também observou-se que uma proporção elevada de amostras de origem humana (30,5%) somente coagulou o plasma bovino entre 24 e 48 de incubação (Figura 2), o mesmo ocorrendo com os *Staphylococcus* de origem canina (15,9%), quando foi utilizado o plasma humano (Figura 1).

A produção de coagulase é considerada por diferentes autores como importante fator de virulência para os *Staphylococcus*^{1,4,5}. Assim, esperava-se que o plasma obtido da espécie homóloga, da qual se obteve o isolado, apresentasse maior eficiência para o teste de coagulase, o que não se verificou em nosso estudo. Em geral, ocorreu exatamente o contrário para a maioria dos isolados testados, com o plasma homólogo apresentando os piores desempenhos (Figuras 1, 2 e 3). Uma possível explicação para este resultado é que, embora bem adaptados aos seus hospedeiros, existe uma diversidade muito grande nas populações de *S. aureus*^{8,15-17} e de *S. intermedius*^{10,11} que se pressupõe representar a maior parte dos isolados de SCP testados neste experimento. Esta heterogeneidade estende-se à enzima coagulase, com a existência de diferentes sorotipos de estafiloagulase e de variações nas sequências de nucleotídeos no sítio ativo da enzima^{3,18}. Pode-se também pressupor a presença, no plasma do animal doador, de anticorpos específicos contra a estafiloagulase produzida por certos clones de SCP comuns à espécie, inativando-a por ocasião da realização da prova, resultando na baixa eficiência do teste de coagulase. Tais fatos podem justificar as variações observadas na habilidade dos diferentes isolados testados em coagular os diferentes tipos de plasma.

É uma prática comum nos laboratórios de patologia utilizar plasma humano para a execução do teste de coagulase

em isolados obtidos de casos clínicos desta mesma espécie (informação pessoal). Este fato gera preocupação quando se nota, de acordo com os resultados do nosso estudo, que aproximadamente 22% das amostras de *Staphylococcus* coagulase-positiva de origem humana não foram corretamente identificadas quando se utilizou o plasma humano (Figura 2), o que pode gerar sérias implicações na abordagem epidemiológica e clínica dos pacientes.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nos permitem recomendar a utilização de plasma equino em substituição aos plasmas de coelho e humano para a realização dos testes de coagulase para identificação de *Staphylococcus* isolados a partir de cães, bovinos e seres humanos.

Por questões de bem-estar animal, nossos resultados também endossam a utilização de plasma equino, pois a obtenção do plasma de coelho é realizada por punção cardíaca, o que, na maioria das vezes, requer o sacrifício do animal. A obtenção do plasma equino pode ser realizada de forma menos traumática, por punção da jugular, preservando-se o doador.

REFERÊNCIAS

1. Koneman EW, Allen SD, Janda WD, Schreckenberger PC, Winn WC. Diagnóstico Microbiológico. 5^a ed. Rio de Janeiro: MEDSI; 2001.
2. Deleo FR, Chambers, H.F. Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era. *J Clin Invest*. 2009;119(9): 2464-74.
3. Watanabe S, Ito T, Takeuchi F, Endo M, Okuno E, Hiramatsu K. Structural comparison of ten serotypes of staphylocoagulases in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 2005;187 (11): 3698–707.
4. Shulz W. Infecções por estafilococos. In: BEER, J. Doenças infecciosas dos animais domésticos. São Paulo: Roca; 1988.
5. Quinn PJ, Carter MJ, Markey B, Carter GR. Clinical veterinary microbiology. London: Wolfe; 1994.
6. Holt JG, editor . *Bergey's: manual of determinative bacteriology*. 9a ed. Baltimore: Williams & Williams; 1994.
7. Martinez TCN, Laborda SS, Anunciação AVM, Almeida MGAA, Rocha CCM, Pinheiro DPM, et al. Caracterização de *Staphylococcus* sp. isolados de processos infecciosos de caninos utilizando plasmas de diferentes espécies animais. *Rev Bras Saúde Prod Anim*. 2001;1(2): 48-53.
8. Schlegelová JM, Dendis M, Benedík J, Babák V, Ry ánek D. *Staphylococcus aureus* isolates from dairy cows and humans on a farm differ in coagulase genotype. *Vet Microbiol*. 2003;92(4): 327–34.
9. Santos MV, Fonseca LFL. Estratégias para controle da mastite e melhoria da qualidade do leite. São Paulo: Manole Ltda; 2007.
10. Greence C E, Watson J. In: Greene, C. E. Infectious diseases of the dog and cat. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders; 1998.
11. May ER. Bacterial Skin Diseases: Current Thoughts on Pathogenesis and Management. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2006;36(1): 185-202.
12. Silva LHC, Monteiro AA, Beloti V, Barros MAF, Nero LA, Santana EHW, et al. Utilização de plasma de cavalo no teste de coagulase em Estafilococos isolados de leite cru. *Semina: Ciênc Agrár*. 2005;26(3): 381-6.
13. Betancourt OH, Méndes DR, Guerra BRS, Almeida YF, Hernández IC, Galdós MC. Plasma equino como sustituto del plasma humano en la identificación del *Staphylococcus aureus* en los laboratorios de microbiología. *Rev Cubana Invest Biomed*. 2005;24 (2): 1-12.
14. Adesyun AA, Shehu LM. Detection of staphylo-coagulase using plasmas from various animals. *Vet Microbiol*. 1985;10(4): 387-92.
15. Enright MC, Day NPJ, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. Multilocus Sequence Typing for Characterization of Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible Clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 2000;38: 1008–15.
16. Silva ER, Silva N. Coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis in southeastern Brazil. *Can J Vet Res*. 2005;69(4): 260-4.
17. Smith EM, Green LE, Medley GF, Bird HE, Fox LK, Schukken YH, et al. Multilocus sequence typing of intercontinental bovine *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol*. 2005;43: 4737–43.
18. Kanemitsu K, Yamamoto H, Takemura H, Kaku M, Shimada J. Relatedness between the coagulase gene 3'-end region and coagulase serotypes among *Staphylococcus aureus* strains. *Microbiol Immunol*. 2001;45(1): 23-7.

Avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* de extratos hidroetanólicos de plantas sobre *Staphylococcus aureus* MRSA e MSSA

Evaluation of *in vitro* antibacterial activity of hydro-ethanol from vegetable extracts against MRSA and MSSA *Staphylococcus aureus*

RIALA6/1417

Cristiano Sanches GARCIA*, Suely Mitoi Ykko UEDA, Lycia Mara Jenné MIMICA

*Endereço para correspondência: Laboratório de Microbiologia, Departamento de Ciências Patológicas, Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo (FCMSCSP), R. Dr. Cesário Mota Junior, 61, 11º andar, CEP 01221-020, São Paulo, SP, Brasil. Cel. (11) 8922-2241. E-mail: cristianofito@yahoo.com.br

Recebido: 03.04.2011 – Aceito para publicação: 20.11.2011

RESUMO

Este estudo avaliou a atividade antibacteriana de extratos de plantas contra as cepas de *Staphylococcus aureus* por meio de testes de Disco-Difusão e de Concentração Bactericida Mínima (CBM). Foi testada a susceptibilidade de 52 cepas de *S. aureus* aos extratos hidroetanólicos das plantas: (1) *Psidium guajava* var. *pomifera*; (2) *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*; (3) *Pothomorphe umbellata*; (5) *Bidens pilosa*, seguindo-se a metodologia baseada nas normas internacionais do CLSI. Na comparação dos resultados da ação dos extratos nas concentrações preparadas neste modelo experimental, foi observado que: *B. pilosa* apresentou menor ação; *P. guajava* var. *pomifera*, *P. umbellata*, com resultados muito próximos entre si, apresentaram ações medianas; *H. courbaril* var. *stilbocarpa* demonstrou ação muito superior aos outros extratos e ao controle com etanol. A ação *in vitro* dos extratos testados evidenciou a presença de princípios ativos antibacterianos. O estudo tornou evidente que os extratos hidroetanólicos das plantas 1, 2, 3 e 5 possuem ação antibacteriana *in vitro* contra *Staphylococcus aureus* MRSA e MSSA.

Palavras-chave. extratos vegetais, agentes antimicrobianos, *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina.

ABSTRACT

This study aimed at evaluating the antibacterial activity of vegetable extracts in the control of the *Staphylococcus aureus* strains, using Disk Diffusion and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) tests. The susceptibility of 52 *S. aureus* strains to the hydroethanolic extracts from the following plants: (1) *Psidium guajava* var. *pomifera*, (2) *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*, (3) *Pothomorphe umbellata*, (5) *Bidens pilosa*, was tested by the methodology based on the international standards of CLSI. By comparing the results from the action of extracts concentrations prepared in this experimental study, it was found that the *B. pilosa* showed a minor action; *P. guajava* var. *pomifera*, *P. umbellata*, presented results very close to each other and revealed median actions; *H. courbaril* var. *stilbocarpa* exhibited an action markedly higher than the other extracts and the control with ethanol. The *in vitro* effects of the extracts evidenced the presence of antibacterial active components. This study showed that hydroethanolic extracts from plants 1, 2, 3 and 5 hold *in vitro* antibacterial activity on *Staphylococcus aureus* MRSA and MSSA.

Keywords. vegetable extracts, antimicrobial agents, methicillin resistant *Staphylococcus aureus*.

INTRODUÇÃO

Doenças causadas por estirpes diferentes da espécie de bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* podem ser classificadas como superficiais, invasivas ou tóxicas. As infecções hospitalares causadas por cepas multirresistentes desse agente, membro da microbiota normal dos seres humanos, tem sido objeto de preocupação. Essas bactérias são consideradas o principal agente causador de infecções de feridas cirúrgicas que podem evoluir para bacteremia ou sepse, com mortalidade elevada; por exemplo, 17,6% das infecções nosocomiais na Santa Casa de São Paulo, em 1981, foram causadas por esse agente¹. Algumas amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes à maioria das cefalosporinas e penicilinas conhecidas, designadas *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes (sigla em inglês, MRSA), só podem ser tratadas com sucesso com o antibiótico vancomicina, e já há relatos do aparecimento de cepas com resistência intermediária a este último (conhecidas como VISA)². Entre 1981 e 1982 foi registrado um aumento de 46 % para 48,6 % de cepas resistentes à oxacilina (ORSA) na Santa Casa de São Paulo¹. O *Staphylococcus aureus* MRSA é um micro-organismo de grande interesse nos estudos de ação antibacteriana visando à descoberta de novos agentes devido às altas taxas de infecção hospitalar. A descoberta de plantas com ação antibacteriana é o primeiro passo para o desenvolvimento de novos princípios ativos (PA) antimicrobianos. Nas tradições populares encontramos diversas plantas utilizadas no tratamento das várias doenças, inclusive infecções. Esta tradição é passada oralmente de geração para geração e sua aplicabilidade clínica muitas vezes carece dos fundamentos científicos para a comprovação de sua eficácia³⁻¹⁵. A descoberta da presença dos PA antimicrobianos em plantas poderia ajudar no tratamento de vários pacientes.

Segundo Gutierrez et al., *Psidium guajava* (goiabeira), da família *Myrtaceae*, foi encontrada na literatura etnofarmacológica de diversos países, especialmente na América Central e África⁴. Extratos de plantas dessa espécie são utilizados em preparações tradicionais, principalmente em distúrbios gastrointestinais (diarréia, dores de estômago, gastroenterite, indigestão e disenteria) e condições dermatológicas (bolhas, infecções e úlceras na pele)⁴. Chah et al. relataram a ação antibacteriana de extratos de folha e de raiz de *P. guajava* contra agentes etiológicos de infecções intestinais: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*

mutans, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Bacillus cereus*, *Proteus* spp, *Shigella* spp e *Escherichia coli*³. Além desse estudo, diversos outros relataram a ação antibacteriana contra *S. aureus* utilizando extratos aquosos, extratos etanólicos, extratos hidroetanólicos, extrato metanólico, de folhas, casca do caule e raízes de *P. guajava*⁵. Betoni et al. utilizando extratos etanólicos de folhas de goiabeira sobre cepas de *S. aureus*, conseguiram diminuir sua concentração inibitória mínima utilizando associações desses extratos com antibióticos⁶.

Hymenaea L. (jatobá), da família *Caesalpinaceae*, foi considerado um gênero predominantemente neotropical com 16 espécies distribuídas desde o México até a América do Sul, segundo Dechoum⁷. Seu principal uso na medicina popular é contra afecções pulmonares de modo geral, dores e cólicas estomacais, como vermífugo e antidiarreico, antifúngico, antioxidante, diurético, expectorante, hepatoprotetor, carminativo, adstringente, estimulante e energético⁷⁻¹⁰. Segundo Lima et al. a seiva do jatobá apresenta as mesmas propriedades que o chá elaborado a partir da casca, que além de fortalecedor do sistema imunológico, é estimulante e utilizado pelos indígenas para melhorar o desempenho sexual⁸. Pereira et al. descreveram que o óleo essencial de *H. courbaril* apresentou atividade antimicrobiana contra as bactérias *Salmonella Thiphimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus haemolyticus*⁹. Outros estudos relataram atividade antimicrobiana de *H. courbaril* contra *S. aureus* utilizando extratos de casca ou folhas¹⁰.

Pothomorphe umbellata (pariparoba) pertence à família *Piperaceae* e sua distribuição geográfica vai da América Central até as Antilhas e América do Sul. Seu uso na medicina popular é difundido por todo o Brasil. São empregadas suas folhas, caule e raízes. É considerada diurética, antiepiléptica, utilizada no tratamento de doenças do fígado, contra febre e afecções das vias respiratórias, inchaços e inflamações nas pernas, contra erisipela e filariose^{11,12}. Na Amazônia, todas as partes da planta, principalmente as folhas, são utilizadas sob a forma de chá, suco ou emplastro, como antipaludária, vermífuga e no combate das inflamações internas e externas em machucados ou queimaduras¹¹. Sponchiado-Júnior¹¹, utilizando o teste de difusão em ágar, evidenciou que a fração acetato de etila, proveniente do extrato bruto de *P. umbellata* apresentou efeito antimicrobiano contra *Enterococcus faecalis*, ação comparável à atividade antimicrobiana do

hidróxido de cálcio. Isobe et al.¹² demonstraram que o alcalóide, N-benzoilmesalina, isolado das partes aéreas da pariparoba, apresentou atividade antibacteriana significativa contra o *Helicobacter pylori*.

O picão-preto (*Bidens pilosa* L.), da família *Asteraceae*, possui ampla dispersão nos trópicos e subtropicais, desde o nível do mar até cerca de 3000 m de altitude. Por onde ocorre é adotada como fitoterápico, sendo referido o uso das folhas ou da planta inteira, com exceção das raízes¹³⁻¹⁵. Seu principal uso é na solução de problemas hepáticos (hepatite e icterícia), além de laringites, dores de cabeça e distúrbios digestivos¹³⁻¹⁵. Segundo revisão de Taylor¹³, no Brasil, *Bidens pilosa* é usada tradicionalmente contra febre, malária, hepatite, diabetes, dor de garganta, tonsilite, obstruções ou outras distúrbios do fígado, infecções urinárias, corrimentos e infecções vaginais. Em infusões ou decocções para uso interno é usada para tonsilite e faringite¹³⁻¹⁵. Externamente é utilizada em feridas, infecções fúngicas, úlceras, picadas de insetos, hemorróidas e erupções da pele. Rabe e van Staden¹⁴ demonstraram sua atividade antibacteriana contra *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus* sp, *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas* spp, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp. Schuch¹⁵, em sua tese de doutorado, descreveu a ação bactericida de extratos hidroetanólicos de *Bidens pilosa* contra cepas de *Staphylococcus coagulase-positiva*.

Referências não foram encontradas nas bases de dados estudadas (LILACS, PUBMED, SCIELO e MEDLINE), nos últimos dez anos, sobre a ação das plantas citadas contra *S. aureus* MRSA, fato preocupante, considerando que estudos científicos poderiam contribuir para o conhecimento dos extratos com ação bactericida.

Este estudo teve como objetivo a avaliação da ação antibacteriana sobre cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes e sensíveis à metilina (MRSA e MSSA) utilizando extratos hidroetanólicos das plantas: *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* (jatobá), *Bidens pilosa* (picão-preto), *Psidium guajava* var. *pomifera* (goiabeira) e *Pothomorphe umbellata* (pariparoba). Como métodos, foram realizados os testes de disco-difusão em meio de cultura sólido e teste de Concentração Bactericida Mínima (CBM) em meio de cultura líquido, utilizando como referência as normas internacionais do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)¹⁶. Outro objetivo foi verificar se os métodos de extração simples, passíveis de serem utilizados na cultura popular, poderiam produzir extratos com ação *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo (FCMSCSP) e no Laboratório de Química do Centro Universitário "Padre Anchieta" (UniAnchieta) entre 2008 e 2009.

Os testes de sensibilidade antibacteriana foram realizados em 52 cepas (28 MRSA e 24 MSSA) de *S. aureus* coletadas da rotina laboratorial do Laboratório do Serviço de Controle de Infecções Hospitalares (SCIH) da Santa Casa de São Paulo e procedentes das Unidades de Pediatria. Essas cepas foram coletadas de 2004 a 2007 e mantidas no freezer a -18 °C.

O material testemunha herborizado foi depositado em acervo comprobatório do Herbário da Universidade Estadual de Campinas, SP (Unicamp) sob a seguinte numeração: *Bidens pilosa* registro nº150348, *Pothomorphe umbellata* registro nº 150349; *Psidium guajava* var. *pomifera* registro nº150350; e *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* registro nº150351.

Preparação dos extratos hidroetanólicos

O material vegetal foi coletado de espécimes de *Hymenaea courbaril* (jatobá: casca de galho), *Bidens pilosa* (picão-preto: planta toda), *Psidium guajava* (goiabeira: casca de galho), *Pothomorphe umbellata* (pariparoba: folhas) na época da florada e, ou frutificação, na região de Jundiá, 23° 11' 9" S, 46° 53' 2" W, estado de São Paulo, Brasil. As herbáceas foram coletadas em sacos plásticos escuros, tomando-se o cuidado de desprezar partes afetadas por doenças, parasitas e materiais estranhos, como partes de outras plantas^{17,18}.

Em até duas horas após as coletas, o material vegetal foi colocado para secar a 40 °C, com circulação de ar, em estufa, por sete dias. Após a secagem foi submetido à moagem e estabilização no Laboratório do Centro Universitário "Padre Anchieta" (UniAnchieta), sendo processado em liquidificador, pesado em balança digital de precisão eletrônica e colocado em frascos de vidro com etanol de cereais à 80% (v/v), numa proporção de 1 grama de planta para 4 mL de etanol (1g:4mL). Após o processamento da matéria vegetal, os frascos com extrato foram deixados em repouso por no mínimo oito dias à temperatura ambiente, dentro de uma caixa de papelão para evitar a degradação de princípios ativos (PA) pela luz^{17,18}.

Após a extração, a amostra foi filtrada em papel-filtro quantitativo de filtragem média, porosidade de 6,5 μm e mantida em frascos âmbar^{17,18}.

Testes preliminares: ação antibacteriana sobre cepa padrão

Este estudo foi realizado no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo (FCMSCSP). Utilizou-se a cepa padrão de *S. aureus* ATCC 25923 (MSSA) da coleção do Laboratório, conservada em freezer à $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. O teste de disco-difusão seguiu o método de Kirby-Bauer, segundo propõe o CLSI¹⁶. Esta etapa foi realizada com a finalidade de padronizar o método e os extratos que apresentaram ação antibacteriana nos testes (disco-difusão e diluição em caldo) e foram utilizados nos experimentos posteriores.

Teste de disco-difusão

Após a padronização dos testes de disco-difusão em cepa padrão de *S. aureus* ATCC 25923 com extratos a serem testados, procedeu-se aos testes com as 52 cepas hospitalares MSSA e MRSA. Os extratos hidroetanólicos tiveram sua sensibilidade comparada à sensibilidade dos antibióticos de referência vancomicina, oxacilina e cefalotina, por meio da medição de seus halos de inibição de crescimento.

Um inóculo foi preparado de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL de cepas, 0,5 da escala de MacFarland, para serem testados em Caldo de Infusão Cérebro e Coração (BHI) e semeados em placas de Agar Müeller-Hinton (MH). Discos estéreis de papel filtro impregnados com 10 μL de cada extrato foram colocados na superfície da placa de MH previamente semeada e foram distribuídos de maneira que a distância de centro a centro não excedesse 24 mm para evitar possíveis interações com outros extratos.

O experimento de disco-difusão foi controlado utilizando-se um disco impregnado com etanol 80% e discos contendo os antibióticos de referência: vancomicina (VAN) 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, oxacilina (OXA) 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e cefalotina (CFL) 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As placas foram invertidas e incubadas em estufa a $37 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 24 a 48 h. Após esse período mediram-se os diâmetros dos halos de inibição de crescimento bacteriano em milímetros. Estes experimentos foram feitos em duplicata para assegurar a veracidade dos dados, como sugere o CLSI¹⁶.

Foi considerado halo de inibição de crescimento bacteriano, o equivalente a área sem crescimento detectável a olho nu, com no mínimo 7 mm. Halos com formação

imperfeita, denominados aqui de halos vestigiais, foram considerados indicativos de possível ação antibacteriana. Todo teste que apresentou crescimento com possível margem de dúvidas foi repetido, como propõe o CLSI¹⁶.

Testes de Concentração Bactericida Mínima (CBM) - testes de diluição em caldo

O teste de concentração bactericida foi realizado somente com extratos que, no teste de disco-difusão, apresentaram halo vestigial ou de 7 mm.

Em 9 tubos de ensaio de 13 x 100 mm esterilizados, foram preparadas diluições seriadas de 1 até 1/256 de extratos em água salina a 8,0%, 1 mL em cada tubo. Suspensões bacterianas de colônias da cepa ATCC 25923 em caldo MH ou BHI (turbidez a 0,5 MacFarland) foram adicionadas aos tubos com diluições e posteriormente estes foram incubados em estufa a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, até 24 ou 48 h (em duplicatas). O experimento foi controlado por: séries de diluições dos extratos vegetais idênticas à citada e meio de cultura em caldo estéril; série de diluições de álcool de cereais com suspensões bacterianas idênticas à citada acima; controle negativo só com suspensões bacterianas em caldo. Todos os tubos, após 24 h de incubação (e também 48h em alguns casos), tiveram uma alíquota de 10 μL plaqueada em ágar MH para a determinação da CBM, procedimento sugerido por CLSI¹⁶. Hindler e Munro¹⁹ recomendaram o plaqueamento de alíquotas com até 10 μL .

Cada tubo ficou com uma diluição 1:2 de cada concentração de extrato e uma diluição 1:2 do inóculo, o que resultou em uma série final de diluições com 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256 e 1/512.

A CBM é a redução de 99,9% do crescimento bacteriano¹⁶. Nesse estudo, valores menores ou iguais a três colônias representam 99,9% de morte bacteriana, ou seja, as diluições de extrato com essa inibição apresentaram a CBM. Contudo, algumas poucas placas que apresentaram crescimento até cinco UFC, correspondente à inibição estimada de 99,84%, segundo a regra de proporcionalidade aplicada aos valores da Tabela de Pearson et al. adaptada por Hindler e Munro¹⁹, foram consideradas satisfatórias aos objetivos deste estudo. As diluições dos extratos em testes que resultaram em 5 UFC foram denominadas, não como CBM, mas sim, concentração antibacteriana.

Após a inoculação e incubação, o crescimento bacteriano que se apresentou confluyente foi denominado "incontável"; quando as colônias apresentaram-se individualizadas, mas com número muito grande, o crescimento foi denominado "maior que 100 Unidades

Tabela 1. Dados comparativos da Concentração Bactericida/antibacteriana Mínima (CBM); dos diâmetros de halo de inibição de crescimento; da concentração etanólica relativa, por diluição de CBM e do número de colônias desenvolvidas sob a diluição de 1/8 do extrato estoque (imediatamente abaixo da CBM). Testes com a cepa de *S. aureus* ATCC® 25923

Dados	Controle	Extratos			
	álcool	01 <i>Psidium</i> (goiabeira)	02 <i>Hymenaea</i> (jatobá)	03 <i>Pothomorphe</i> (pariparoba)	05 <i>Bidens</i> (picão-preto)
CBM (mg/ mL)	190,0	23,38	3,33	50	51,75
Halo (mm)	-----	11	13	*	*
[] etanol %	20	10	1,25	20	20
Nº de colônias diluição 1/8	incontável	0	0	>100	>100

[] = concentração; * = halo vestigial; ----- = sem halo

Formadoras de Colônia (UFC)”; o crescimento denominado “maior que 60 e menor que 150 UFC” foi aplicado quando foi possível fazer uma estimativa pelo método de contagem por quadrantes da placa. A comparação quanto ao tipo de crescimento, da forma como foi descrita, foi utilizada como critério relativo de avaliação do crescimento bacteriano, caso as CBM do extrato e do controle fossem a mesma.

Testes posteriores - Ação antibacteriana sobre cepas hospitalares de *S. aureus* resistentes e sensíveis

Seguindo o método dos testes de disco-difusão e de concentração bactericida mínima, citados nos testes preliminares descritos anteriormente, foram realizados os testes de sensibilidade antibacteriana em 52 cepas

Tabela 2. Coeficientes das Concentrações Bactericidas/antibacterianas Mínimas (CBM) de extratos hidroetanólicos de: *Psidium guajava* var. *pomifera* (1); *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* (2); *Pothomorphe umbellata* (3); *Bidens pilosa* (5); encontradas em testes com 52 cepas hospitalares de *S. aureus* MRSA e MSSA, coletadas na Santa Casa de São Paulo, SP no período de 2004 a 2007

Extrato vegetal	CBM (mg/mL)	% de cepas inibidas
<i>Psidium</i> (1) (goiabeira)	46,75	84,6
	23,38	26,9
<i>Hymenaea</i> (2) (jatobá)	53,25	98,1
	26,62	86,6
	13,31	53,9
	6,65	32,7
	3,33	9,6
<i>Pothomorphe</i> (3) (pariparoba)	50	88,6
	25	36,7
	12,5	3,8
<i>Bidens pilosa</i> (5) (picão-preto)	51,75	92,3
	25,87	11,5

(28 MRSA e 24 MSSA) de *S. aureus* coletadas da rotina laboratorial do Laboratório do Serviço de Controle de Infecções Hospitalares (SCIH) da Santa Casa de São Paulo e procedentes das Unidades de Pediatria. Essas cepas foram coletadas de 2004 a 2007 e mantidas em freezer a -18 °C.

Análise estatística

Os dados foram apresentados como variáveis qualitativas em termos de frequências absoluta e relativa. Na comparação dos grupos MRSA e MSSA para os dados de cada extrato, o Teste Qui-quadrado ou o Teste Exato de Fisher foi utilizado. A comparação da ação antibacteriana dos extratos em relação ao controle foi feita por meio de intervalos de confiança, utilizando-se nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Resultados dos testes preliminares - suscetibilidade da cepa ATCC® 25923 de *S. aureus* aos extratos vegetais

Diversos extratos foram testados, mas só os que constam na Tabela 1 apresentaram ação antibacteriana observável pelo diâmetro dos halos de inibição e pela CBM. A mesma Tabela apresenta também as concentrações etanólicas relativas a cada diluição da CBM. O termo CBM neste estudo indica a atividade antibacteriana e a bactericida, pois apenas em 12% dos testes houve inibição de 99,84% (antibacteriano no critério adotado).

Resultados dos testes posteriores – teste de concentração bactericida mínima (CBM) para as cepas hospitalares de *S. aureus* MRSA e MSSA

Os valores de CBM para cada extrato vegetal estão indicados na Tabela 2.

A Tabela 3 apresenta uma compilação dos resultados dos testes estatísticos.

A Figura 1 apresenta fotos de algumas amostras nos testes de Disco-difusão e CBM onde as ações antibacterianas das mesmas diluições dos extratos estoque (1/2, 1/4, 1/8 e 1/32) podem ser comparadas. Observou-se que o controle com etanol apresentou inibição até a diluição de 1/4. A inibição dos extratos a uma diluição de 1/8 ou menor foi considerada ação antibacteriana real do extrato e não do etanol.

A ação do controle foi de 0% a partir da diluição de 1/8 e, desse modo, não houve variabilidade de dados que viabilizasse um teste de associação comparando o extrato e o controle. Alternativamente, foram construídos intervalos de confiança de 95%, indicando a ação antibacteriana dos extratos, com o intuito de verificar se apresentavam ação similar à do controle. Esses resultados estão apresentados na Figura 2.

Resultados dos testes posteriores – teste de disco-difusão para as cepas *S. aureus* MRSA e MSSA

Foi detectada uma variação nos halos de inibição compreendida entre zero (cepas resistentes ao extrato) e 26 mm. Não houve diferença significativa entre os resultados de cepas MRSA e MSSA.

Os halos dos extratos 1, *Psidium guajava* var. *pomifera* (goiabeira), e extrato 2, *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* (jatobá), mediram, em sua maioria, entre 8 e 10 mm, com uma tendência dos halos do extrato 1

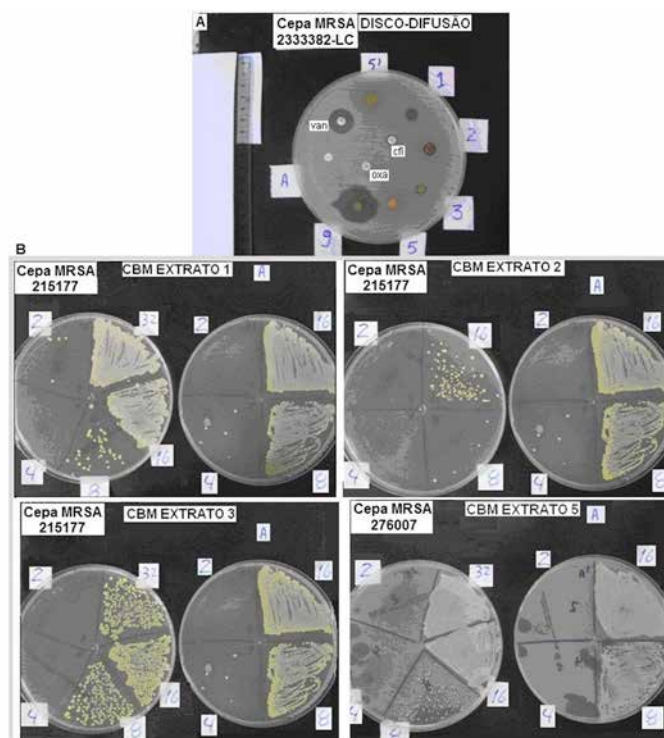


Figura 1. A) Resultados de uma amostra no teste Disco-difusão – Extratos testados: (1) *P. guajava* var. *pomifera*, (2) *H. courbaril* var. *stilbocarpa*; (3) *P. umbellata*; (5 e 5') *B. pilosa*; (9) planta não identificada; (A) etanol 80%; (van) vancomicina, (oxa) oxacilina, (cfl) cefalotina B) Resultados de amostras no teste CBM - A amostra da esquerda são extratos testados (1) *P. guajava* var. *pomifera*, (2) *H. courbaril* var. *stilbocarpa*, (3) *P. umbellata*, (5) *B. pilosa*; a amostra da direita é o controle etanol (A): diluições de extrato e etanol testadas: (2) representa a diluição 1/2, (4) representa 1/4, (8) representa 1/8, (16) representa 1/16, (32) representa 1/32

Tabela 3. Frequência absoluta de cepas MRSA e MSSA com Concentração Bactericida/antibacteriana Mínima (CBM) de extratos de plantas até a 4ª diluição e acima dela; resultados do Teste X2 (e graus de liberdade) e Teste Exato de Fisher (*) para comparação entre os dados das cepas MRSA e MSSA, com nível de significância $p < 0,05$

Extratos vegetais	Diluição	MRSA	MSSA	Total	P	Graus de liberdade	Conclusão MRSA e MSSA
<i>Psidium</i> (1) (goiabeira)	0-4 ^a	20	18	38	46,3	1	iguais
	8 ^a -64 ^a	9	5	14			
	Total	29	23	52			
<i>Hymenaea</i> (2) (jatobá)	0-4 ^a	4	3	7	99,9*	----	iguais
	8 ^a -64 ^a	25	20	45			
	Total	29	23	52			
<i>Pothomorphe</i> (3) (pariparoba)	0-4 ^a	17	16	33	41,6	1	iguais
	8 ^a -64 ^a	12	7	19			
	Total	29	23	52			
<i>Bidens</i> (5) (picão-preto)	0-4 ^a	27	19	46	38,7*	----	iguais
	8 ^a -64 ^a	2	4	6			
	Total	29	23	52			

----= não se aplica

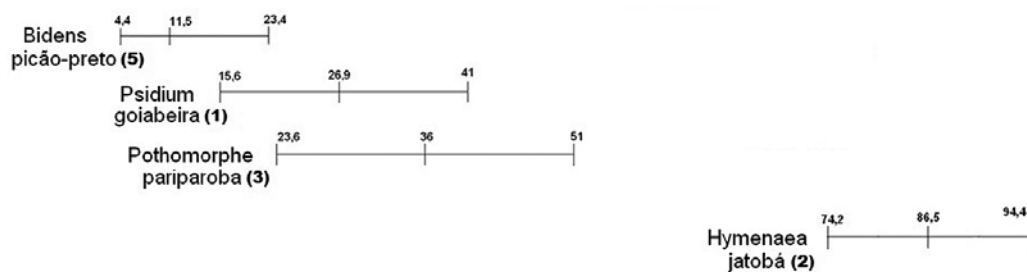


Figura 2. Diagrama dos intervalos de confiança (95%). Frequências relativas (em %) de cepas MRSA e MSSA, inibidas pelas diluições de extratos maiores que 1/4 (1/8 ou maior no teste CBM). Extratos testados: *Psidium guajava* (1); *Hymenaea coubaril* var. *stilbocarpa* (2); *Pothomorphe umbellata* (3); e *Bidens pilosa* (5)

(*P. guajava*) serem menores para as cepas MSSA; os halos dos extratos 3, *Pothomorphe umbellata* (pariparoba), e extrato 5, *Bidens pilosa* (picão-preto), mediram, em sua maioria, entre zero e 7 mm (considerando-se os halos vestigiais nesta categoria).

Os halos de inibição do crescimento bacteriano dos controles com antibióticos de referência (OXA, VAN, CFL), em todas as cepas testadas, tiveram seu tamanho entre as medidas esperadas para o padrão internacional do CLSI¹⁶, sem apresentar resistência ao antibiótico vancomicina. Todas as cepas apresentaram halos nulos ou vestigiais segundo indicou o controle com etanol.

DISCUSSÃO

Apesar das CBM de *P. umbellata* (pariparoba) (extrato 3) e *B. pilosa* (picão-preto) (extrato 5) terem apresentado a mesma concentração alcoólica do controle com etanol (A) (Tabela 1), o número de colônias que cresceram nas placas desse controle foi nitidamente maior nas diluições maiores (1/8 ou maior) em relação às referidas CBM dos extratos citados. Isso comprovou a ação antibacteriana não só do etanol, mas também dos extratos vegetais.

O extrato de *B. pilosa* (picão-preto) (extrato 5) foi o que menor ação antibacteriana apresentou. Em concentrações menores ou iguais à diluição de 1/4 desse extrato, o intervalo de confiança das frequências relativas de cepas inibidas apresentou valor muito próximo ao do controle, ou seja, 4,4% e 0% para o controle com etanol (A) (Figura 2).

A ausência de PA antibacteriano em *B. pilosa* (picão-preto), que poderia ser uma hipótese para a porcentagem pequena de cepas com inibição às diluições de extrato menores ou iguais que 1/4, estaria descartada pelos seguintes motivos: a) nesse experimento

foram observados 11,5 % de cepas com concentração bactericida menor do que o controle com etanol; b) foram observados halos vestigiais de inibição de crescimento bacteriano nos testes de disco-difusão; c) houve um crescimento diferencial menor de colônias, comparado com o controle com etanol, mesmo em diluições maiores (1/8 ou maior) do que a concentração bactericida ou antibacteriana menor.

Além desses motivos, estudos descreveram a ação antibacteriana de extratos hidroetanólicos de picão-preto sobre *Staphylococcus aureus* ou *Staphylococcus coagulase-positiva*¹⁵.

As CBM descritas para *B. pilosa* (picão-preto) (extrato 5) nesse estudo estão apresentadas na Tabela 2. Schuch¹⁵ relatou em seu estudo com *Staphylococcus coagulase-positiva* uma concentração de inativação (bactericida) de 30 mg/mL para extratos hidroetanólicos.

O motivo do número reduzido de cepas inibidas com concentração menor que a CBM (diluições maiores que 1/4) e da presença de halos de inibição vestigiais, depreende-se da concentração do extrato estoque utilizado nos experimentos ter sido muito pequena. Concentrações maiores poderiam ser obtidas por meio de métodos de extração mais precisos, como o utilizado por Valdes e Rego²⁰, que, fracionando o extrato, obtiveram 3 compostos bacteriostáticos (Ácido Linólico, Ácido α -linolênico e Esqualeno) e 3 compostos antibacterianos (Fenilheptatrina; n-alcanos; Estigmasterol, β -sitosterol, campesterol) obtidos de extrato de *B. pilosa* (picão-preto) com éter de petróleo.

Os extratos de casca de *P. guajava* (goiabeira) (extrato 1) e folhas de *P. umbellata* (pariparoba) (extrato 3) tiveram resultados muito próximos (26,9% e 36%, respectivamente), apresentando intervalos de confiança que se sobrepõem. Isso foi um indicativo de que seriam semelhantes em ação antibacteriana, apesar de não ser possível uma análise estatística.

As CBM descritas para a casca de *P. guajava* (goiabeira) (extrato 1) neste estudo estão descritas na Tabela 2. Gonçalves et al.⁵, para extratos de plantas dessa espécie, encontraram diâmetros de halos de inibição de crescimento bacteriano que variaram entre 8,25 e 9,25 mm, sob a concentração estimada de 96,87 mg/mL. Neste estudo, os halos de inibição de *P. guajava* (extrato 1) foram de 8-10 mm para a maioria das cepas testadas sob as referidas CBM. Porém, foram encontradas na literatura Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de 0,25 mg/mL para extratos hidroetanólicos de casca de *P. guajava* (goiabeira) no trabalho de Sanches et al.²¹ feito com microdiluição. A CIM pode ser feita a partir de microdiluições ou macrodiluições de antibacterianos¹⁶, porém Hindler e Munro¹⁹ afirmaram que a macrodiluição é preferível à microdiluição, pois possibilita um melhor controle das variáveis técnicas e teste de inóculos maiores. Os experimentos aqui apresentados foram modelados para macrodiluições e devido à turbidez dos inóculos (que sofreu interferência dos extratos testados), optou-se por um teste mais seguro, o de CBM, no qual é avaliado o crescimento real de cada tubo, mesmo aqueles com aparente ausência de crescimento, ou seja, sem turbidez.

Betoni et al.⁶ conseguiram diminuir a CIM de 0,52 para 0,13 mg/mL utilizando associações de extrato etanólico de folhas de *P. guajava* (goiabeira) com antibióticos. Burkill²² revelou a presença de 20-30% de taninos na casca da árvore de *P. guajava* (goiabeira), além de outros constituintes como flavonóides, óleos essenciais, álcoois sesquiterpenóides e ácidos triterpenóides, também referidos por Ilha et al.²³. Destes, poderiam ser antibacterianos alguns taninos, alguns flavonóides (como a quercetina) e certos óleos essenciais^{24,25}.

As CBM descritas para *P. umbellata* (pariparoba) (extrato 3) neste estudo estão apresentadas na Tabela 2.

Duarte et al.²⁶ descreveram para extratos de *P. marginatum* uma “forte inibição” com CIM de 0,2 mg/mL, a CIM de Piper aduncum contra *S. aureus* foi de 1,8 mg/mL.

Dos compostos químicos presentes em *P. umbellata* (pariparoba), aqueles classificados como óleos essenciais, taninos, xantonas, fenilpropanóides, flavononas, flavonóis e flavonas têm apresentado compostos da mesma classe com atividade antimicrobiana^{24,25}.

Os intervalos de confiança para *H. courbaril* (jatobá) (extrato 2) deixaram evidente a superioridade dessa espécie, em relação às outras, segundo o modelo experimental adotado neste trabalho.

As CBM do extrato hidroetanólico de *H. courbaril* (jatobá) (extrato 2) observadas neste experimento estão na Tabela 2. Souza et al.²⁷, para CIM de 2,5 mg/mL, encontraram 54,0 % de inibição de cepas de *Staphylococcus* sp por extratos de *H. courbaril* (jatobá). Fernandes et al.¹⁰ encontraram 63,3 % de inibição das espécies bactérias Gram-positivas com concentrações estimadas de 1,25 mg/mL, relatados para a mesma espécie. Neste estudo os halos de inibição de crescimento bacteriano do extrato 2 (*H. courbaril*) foram de 8-10 mm.

Os dados encontrados neste experimento estavam de acordo com os estudos referidos na literatura científica (a colocação das fontes daria maior confiabilidade à afirmação).

Segundo Fernandes et al.¹⁰, a *H. courbaril* possui componentes químicos como taninos e flavonóides, que, provavelmente estão associados à atividade antimicrobiana. Muitos trabalhos descreveram os efeitos farmacológicos dos flavonóides, principalmente, a atividade antimicrobiana²⁸.

CONCLUSÃO

Os extratos hidroetanólicos de *Bidens pilosa* (extrato 5) (picão-preto, planta toda), *Psidium guajava* var. *pomifera* (extrato 1) (goiabeira, casca da árvore), *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* (extrato 2) (jatobá, casca da árvore) e *Pothomorphe umbellata* (extrato 3) (pariparoba, folhas) possuem atividade antibacteriana ou bactericida contra cepas de *Staphylococcus aureus* MRSA e MSSA.

Comparando os extratos, para as concentrações preparadas no modelo experimental deste estudo, foi possível concluir que: *B. pilosa* apresentou menor ação; *P. guajava* var. *pomifera*, *P. umbellata*, obtiveram resultados muito próximos entre si, com ações de caráter mediano; e *H. courbaril* var. *stilbocarpa* mostrou ação muito superior aos outros extratos e ao controle com etanol.

A ação dos extratos dessas plantas nos experimentos descritos aqui seria uma evidência de que preparações simples de extratos hidroetanólicos, feitos a partir de plantas secas, podem apresentar ação antibacteriana detectável *in vitro*, contudo novos estudos devem ser realizados para avaliar a segurança dos extratos dessas espécies de plantas para uso, segundo as tradições populares, e detectar os princípios ativos responsáveis por tais ações nesses extratos. Portanto, as plantas das

espécies *Bidens pilosa*, *Psidium guajava* var. *pomifera*, *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* e *Pothomorphe umbellata* poderiam ser consideradas objeto de estudo, com ênfase sobre suas potencialidades como fornecedores de PA antibacterianos.

Este estudo constituiu um indicativo de que a preservação dos ecossistemas naturais e da biodiversidade brasileira é uma questão não só de qualidade ambiental, mas também de manutenção e busca da saúde, por meio da descoberta de princípios ativos ainda desconhecidos, mas que estariam presentes na natureza.

AGRADECIMENTOS

À Fundação CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de estudo, à FCMSCSP (Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo) pela oportunidade e apoio à pesquisa, à Probac do Brasil® pelas doações de material, e à UniAnchieta pelo apoio e permissão de uso do Laboratório de Química

REFERÊNCIAS

- Mimica LMJ, Gonçalves MJPR, Mimica I, Rodrigues A. Sensibilidade comparativa de *Staphylococcus aureus* intra-hospitalares a vários antimicrobianos (1981-1982). São Paulo (SP): AMH FCMSCSP; 1982, p. 44.
- Schlessinger D, Eisenstein BI. Bases Biológicas da Ação Antibacteriana. In: Schaechter M, Engleberg NC, Eisenstein BI, Medoff G (Editores). Microbiologia: mecanismos das doenças infecciosas. 3ª ed. Rio de Janeiro (RJ): Ed. Guanabara Koogan; 2002. p.642.
- Chah KF, Eze CA, Emuelosi CE, Esimone CO. Antibacterial and wound healing properties of methanolic extracts of some Nigerian medicinal plants. *J Ethnopharmacol*. 2006;104:164-7.
- Gutierrez RM, Mitchel S, Solis RV. *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *J Ethnopharmacol*. 2008;117:1-27.
- Gonçalves FA, Andrade Neto M, Bezerra JNS, Macrae A, Sousa OV, Fonteles-Filho AA, et al. Antibacterial activity of guava, *Psidium guajava* Linnaeus, Leaf Extracts on Diarrhea-Causing Enteric Bacteria Isolated from Seabob Shrimp. *Rev Inst Med Trop*. 2008;50 (1):11-5.
- Betoni JEC, Mantovani RP, Barbosa LN, Stasi LC, Fernandes JR A. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101(4):387-90.
- Dechoum MS. Crescimento Inicial, Alocação de Recursos e fotossíntese em Plântulas das Espécies Vicariantes *Hymenaea courbaril* var *stilbocarpa* (Hayne) Lee & Lang. (jatobá) e *Hymenaea stigonocarpa* Mart. (jatobá-do-cerrado) (*Leguminosae-Caesalpinioideae*) [tese de doutorado]. Campinas (SP): Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas; 2004.
- Lima AF, Azevedo KS, Campos CAS, Taveira US, Rocha AA. Manejo da seiva do jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) por famílias tradicionais na Reserva Extrativista Chico Mendes, Acre – Brasil. In: Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil; 2007; Caxambú, MG.
- Pereira CKB, Rodrigues FFG, Mota ML, Sousa EO. Composição química, atividade antimicrobiana e toxicidade do óleo essencial de *Hymenaea courbaril* (jatobá). 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química; 2007; Águas de Lindóia, SP. 10. Fernandes TT, Santos ATE, Pimenta FC. Atividade Antimicrobiana das Plantas *Plathymenia reticulata*, *Hymenaea courbaril* e *Guazuma ulmifolia*. *Rev Patol Trop*. 2005;34(2):113-22.
- Sponchiado Júnior EC. Atividade antibacteriana contra *Enterococcus faecalis* de uma medicação intracanal contendo ativos fitoterápicos de *Pothomorphe umbellata* [tese de doutorado]. Manaus (AM): Universidade Federal do Amazonas; 2006.
- Isobe T, Ohsaki A, Nagata K. Antibacterial constituents against *Helicobacter pylori* of brazilian medicinal plant, Pariparoba. *Yakugaku Zasshi*. 2002;122(4):291-4.
- Taylor L. The Healing Power of Rainforest Herbs: *Bidens pilosa*. Atualização em 2005. [acesso 2007 Fev 15]. Disponível em: [www.rain-tree.com].
- Rabe T, van Staden J. Antibacterial activity of South African plants used for medicinal purposes. *J Ethnopharmacol*. 1997;56:81-7.
- Schuch LFD. Plantas medicinais em atenção primária veterinária: atividade antimicrobiana frente a bactérias relacionadas com mastite bovina e com dermatófitos [tese de doutorado]. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2007.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twentieth Informational Supplement M100-S20, 30(1), Wayne, PA; 2011.
- Falkenberg MB, Santos RI, Simões CMO. Introdução à Análise Fitoquímica. In: Simões CMO, colocar o nome dos 6 primeiros autores et al., organizador. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre (RS) e Florianópolis (SC): Ed. UFRG/ UFSC; 2003. p.228 – 45.
- Schulz V, Hänsel R, Tyler VE. Fitoterapia Racional: Um Guia de Fitoterapia para as Ciências da Saúde. 4ª ed, Ed. Manole; 2002; p. 1-40
- Hindler JF, Munro S. Antimicrobial Susceptibility Testing. In: Isenberg HD. Clinical Microbiology Procedures Handbook [CD-ROM]. 2ª ed. ASM Press; 2004.
- Valdes HAL, Rego HPL. *Bidens pilosa* Linné. *Rev Cubana Plant Med*. 2001;1:28-33.
- Sanches NR, Cortez DAG, Schiavini MS, Nakamura CV, Dias-Filho BP. An Evaluation of Antibacterial Activities of *Psidium guajava* (L.). *Braz Arch Biol Technol*. 2005;48(3): 429-36.
- Burkill HM. The useful plants of West Tropical Africa. 2ª ed. Families M-R. Royal Botanic Gardens Kew. 1997;(4):89-93.
- Ilha SM, Migliato KF, Velloso JCR, Sacramento LVS, Pietro RCLR, Issac VBL, et al. Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocosmética. *Rev Bras Farmacogn*. 2008;18(3):387-93.
- Simões CMO, Spitzer V. Óleos voláteis, In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR, organizador. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre (RS) e Florianópolis (SC): Ed. UFRG/ UFSC; 2003. p.467-96.

24. Simões CMO, Schenkel, EP, Gosmann, G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR, organizador. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre (RS) e Florianópolis (SC): Ed. UFRG/UFSC; 2003. p.1102.
25. Duarte MCT, Figueira GM, Pereira B, Magalhães PM, Delarmelina C. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcolólicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. *Rev Bras Farmacogn*. 2004;14(1):6-8.
26. Souza GC, Haas AP, von Poser GL, Schapoval EE, Elisabetsky E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. *J Ethnopharmacol*. 2004;90:135-43.
27. Middleton EJR, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol Rev*. 2000;52:673-751. Occupational Safety and Health Administration. Toxic Metals, Occupational Safety and Health Administration. Washington, DC: US Depart of Labor; 2004. [acesso 2010 Mar 18]. Disponível em: [http://www.osha.gov].
28. Institute of Medicine of the National Academies. *Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc*. Washington, DC: The National Academy Press; 2001. p. 773.
29. Yusa V, Suelves T, Ruiz-Atienza L, Cervera ML, Benedito V, Pastor A. Monitoring programme on cadmium, lead, and mercury in fish and seafood from Valencia, Spain: levels and estimated weekly intake. *Food Addit Contam: Part B*. 2008;1(1): 22-31.
30. World Health Organization - WHO. Joint FAO/WHO Food Standards Programme CODEX Committee on Contaminants in Foods. Fifth Session. [acesso 2011 Out 27]. Disponível em: [http://www.cclac.org/documentos/CCCF/2011/3%20Documentos/Documentos%20Ingles/cf05_INF.pdf]
31. United States Environmental Protection Agency - US EPA. What you need to know about mercury in fish and shellfish. EPA-823-F-04-009, 2pp; 2004. [acesso 2010 Mar 18]. Disponível em: [http://www.epa.gov/waterscience/fish/MethylmercuryBrochure.pdf]
32. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. *Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009: análise do consumo alimentar pessoal no Brasil*. IBGE, Coordenação de Trabalho e rendimento. Rio de Janeiro: IBGE; 2011. p.150.

Detecção de sibutramina e metoclopramida em alimentos para atletas

Sibutramin and metoclopramid detection in foods for athlete

RIALA6/1418

Helena Miyoco YANO*, Rita Cristina Agostinho GUARDIA, Mariangela Tirico AURICCHIO

*Endereço para correspondência: Núcleo de Ensaios Físicos e Químicos em Medicamentos, Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo 355, São Paulo, SP, Brasil, CEP 01246-902. E-mail: heleyano@ial.sp.gov.br

Recebido: 14.10.2010 – Aceito para publicação: 07.11.2011

RESUMO

O uso de alimentos específicos para atletas, consumidos por frequentadores de academias e esportistas profissionais, tem se tornado muito difundido entre as pessoas que não praticam atividade física regularmente. No entanto, avaliações mais atentas desses produtos revelaram a presença de substâncias ativas não declaradas nos rótulos. Neste estudo foram analisadas 86 amostras provenientes da coleta e apreensão feitas pela autoridade sanitária e policial. O cloridrato de sibutramina foi detectado em uma das amostras e metoclopramida em duas. Os rótulos que apresentaram os dizeres na língua inglesa contrariaram a legislação específica. As análises de identificação foram realizadas por cromatografia em camada delgada e confirmadas por espectrometria de massa. Este estudo indica o consumo irracional de medicamentos, cujas consequências para a saúde dos usuários não foram avaliadas até o momento.

Palavras-chave. vigilância sanitária, fraude, suplemento alimentar, sibutramina, metoclopramida, saúde pública.

ABSTRACT

The specific foods for athletes, consumed by fitness centers customers and professional athletes have becoming very popular among non-athlete individuals. However, accurate evaluations on these products have shown the occurrence of active substances that were undeclared on the product label. In this study were analyzed 86 samples collected by both sanitary surveillance and police authorities. The sibutramin hydrochloride was detected in one sample and metoclopramid in other two samples. The labels that showed words in the English language were in disagreement with the specific legislation. The identification analyses were performed by thin-layer chromatography and confirmed by mass spectrometry. The present study indicates an unreasonable consumption of medicines, which might cause unpredictable consequence to the consumers health.

Keywords. health surveillance, fraud, alimentary supplement, sibutramin, metoclopramid, public health.

INTRODUÇÃO

Suplementos vitamínicos, minerais e alimentos para atletas têm sido consumidos com a finalidade de complementar a dieta cotidiana de pessoas saudáveis, no entanto, alguns tipos de substâncias ativas podem estar presentes nestes produtos. Alimentos contendo efedrina e cafeína, adição de hormônios anabolizantes e de outros fármacos como a sibutramina produzem efeitos farmacológicos¹⁻³.

Segundo Neto⁴, o indivíduo que pratica esporte sem o acompanhamento de um profissional especializado parece acreditar que o exercício só tem efeito, na melhoria de seu desempenho quando associado a algum recurso nutricional ou farmacológico. O consumo crescente de suplementos alimentares tem sido foco de preocupação, por ser apontado como único motivo da melhoria no rendimento das práticas esportivas. A comercialização irregular destes produtos tem contribuído para possíveis adulterações e para a falta de padronização no preparo^{2,5}. O consumo de suplementos nutricionais muitas vezes ocorre no próprio ambiente da prática de exercícios e conta com a participação de profissionais responsáveis pelas sessões de exercícios⁴, além disso, nem sempre o comércio ocorre de forma legalizada.

Jung et al.⁶ encontraram sibutramina, substância anorética, em preparados vegetais e Liang et al.⁷ descreveram substâncias adulterantes em formulações comercializadas como ervas medicinais e suplementos alimentares, como sildenafil (Viagra[®]), ibuprofeno e famotidina. A sibutramina (Figura 1) é um fármaco indicado para a redução de peso, exclusivamente no tratamento da obesidade, quando a orientação alimentar e atividade física não são suficientes para atingir o objetivo clínico². O uso de sibutramina aponta muitos fatores controversos, como o consumo abusivo para emagrecimento, muitas vezes sem indicação clínica, o questionamento da comunidade técnico-científica quanto à sua eficácia em longo prazo, bem como, os riscos associados em pacientes cardíacos e com diabetes tipo 2⁸. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aumentou o controle sobre a prescrição da sibutramina, substância sujeita ao controle especial, remanejando-a da lista C1 (Lista das Outras Substâncias Sujetas Controle Especial, Sujetas a Receita de Controle Especial em Duas Vias) para a lista B2 (Lista das Substâncias Psicotrópicas Anorexígenas, Sujetas a Notificação de Receita "B") da Portaria SVS/MS N^o 344/98, atualizada para o ano de 2010 por meio da resolução RDC

n^o 13/2010⁹, onde se estabelece o regulamento técnico sobre estes tipos de substâncias e definem-se as regras para sua prescrição e comercialização.

A metoclopramida¹⁰ (Figura 1) é um fármaco antiemético que atua no centro de vômito, no córtex cerebral e na zona desencadeadora do quimiorreceptor. Outro aspecto importante a se considerar na avaliação de alimentos para atletas é o rótulo do produto, pois de fato, este é a fonte de informação disponível para o consumidor, na intenção de orientar sua escolha. Desse modo, é muito importante que as informações ou alegações declaradas nos rótulos sejam claras e consistentes¹¹. Entretanto, esta fonte pode conter informações diferentes das permitidas na legislação ou incompletas sobre vários aspectos, como a caracterização da origem do produto, o nome e o endereço do fabricante e a composição, entre outras. É grave quando estas informações/alegações induzem o consumidor a acreditar na obtenção de benefícios que, provavelmente, não serão alcançados, ou quando o consumo, na verdade, pode levar ao surgimento de efeitos adversos à saúde.

Os alimentos para atletas podem ser facilmente adquiridos pela internet, em academias de ginástica, drogarias e em lojas destinadas especificamente à comercialização de suplementos alimentares. O objetivo deste estudo foi avaliar 86 amostras de produtos denominados "alimentos para atletas" recebidas pelo

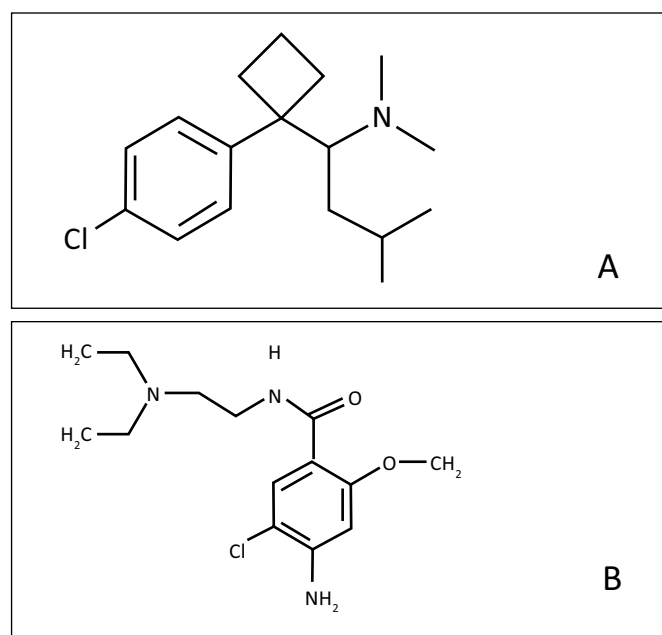


Figura 1. Estruturas químicas do cloridrato de sibutramina (A) e da metoclopramida (B)

Núcleo de Ensaio Físicos e Químicos em Medicamentos do Instituto Adolfo Lutz no período de 2008-2009, quanto à adequação da rotulagem em relação aos requisitos legais vigentes, e pesquisar a presença de substâncias ativas como benzodiazepínicos e anorexígenos. As amostras foram encaminhadas por autoridades sanitárias e policiais.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Das oitenta e seis amostras de produtos “alimentos para atletas” coletadas pela Vigilância Sanitária e pelo Departamento de Polícia do Estado de São Paulo, no período de 2008-2009, cinco delas apresentavam suspeita de conter substâncias farmacologicamente ativas, cujo consumo é controlado, como benzodiazepínicos e anorexígenos, além da metoclopramida. Em todas as amostras foi realizada a avaliação do rótulo, segundo a legislação pertinente.

Padrões

Os padrões de diazepam, bromazepam, clonazepam, lorazepam, clordiazepóxido, femproporex, mazindol, anfepramona, cloridrato de sibutramina e metoclopramida foram obtidos por meio dos fabricantes dos medicamentos e estavam acompanhados de certificado de análise. Os mesmos foram preparados na concentração de 1 % (p/v) em álcool etílico PA:

Cromatografia em camada delgada (CCD)

As amostras foram analisadas de acordo com a metodologia proposta por Auricchio et al.¹²

O material utilizado para a CCD foi composto por placas de sílica gel G60 (20x20 cm), 0,25 mm de espessura Merck®, cuba de vidro 22x22x10 cm, capilar de vidro e microseringa de 10 µL.

As fases móveis e os reveladores utilizados para pesquisa de sibutramina e metoclopramida foram: eluente 1: acetato de etila: metanol: hidróxido de amônio (85:15:10, v/v/v); eluente 2: ciclohexano: tolueno: dietilamina (75:15:10, v/v/v); eluente 3: ciclohexano: clorofórmio: dietilamina (70:20:10, v/v/v); e revelador: solução de iodoplatinado acidificado e/ou Dragendorff.

As soluções de amostras e os padrões foram aplicados na placa, cerca de 5 toques de cada, por meio de capilar de vidro. O desenvolvimento da placa foi ascendente, ao abrigo da luz, em triplicata, utilizando-se os eluentes 1, 2 e 3 respectivamente para cada placa.

A solução de iodoplatinado e Dragendorff foi utilizada como revelador, de acordo com a sugestão de Moffat¹³.

A verificação da presença ou não de metoclopramida, anorexígenos e benzodiazepínicos foi realizada comparando-se o Rf(s) e cor da(s) mancha(s) das amostras com as dos padrões testados.

Limite de detecção (LD) por CCD

O LD foi determinado para a sibutramina e metoclopramida, baseando-se na avaliação visual da mancha de concentração conhecida por cromatografia em camada delgada¹⁴.

Os padrões de sibutramina e de metoclopramida foram pesados e transferidos quantitativamente para cada balão volumétrico e diluídos em álcool etílico PA, obtendo-se soluções de concentração de 0,5 mg/mL. Estas, com auxílio de microseringa, foram aplicadas de 1 a 5 µL, em placas de sílica gel G 60, sendo desenvolvida em cuba de vidro, contendo como eluente acetato de etila: metanol: hidróxido de amônio (85:15:10, v/v/v), saturação prévia de 1 hora, desenvolvimento ascendente e percurso de 10 cm. Como Moffat¹³ propõe, após a evaporação do solvente, a placa foi revelada com solução de Dragendorff. O procedimento foi realizado em triplicata. O LD foi determinado pelo estabelecimento do menor nível de concentração, no qual a mancha foi visualizada com confiabilidade.

Determinação de cloridrato de sibutramina por espectrometria de massa.

O equipamento utilizado para a obtenção dos espectros de massa foi o LC/MS/MS Íon trap, modelo LCQ Deca XP (Thermo Scientific).

A amostra para a detecção da substância sibutramina foi preparada com 2 g de amostra triturada e extraída com 100 mL de metanol grau HPLC em ultrassom por 3 minutos. Após filtragem em filtro de seringa de 0,22 micra, a solução foi diluída para 1:10 em metanol.

A solução padrão foi preparada com 10 mg de cloridrato de sibutramina diluída em 100 ml de metanol, com a obtenção de uma solução com a concentração final de 0,1 mg de sibutramina/mL.

Análise de rótulos

Os dizeres dos rótulos foram analisados tendo como parâmetros legais o Código de Defesa do Consumidor¹¹, o Decreto-Lei nº 986 de 21 de outubro de 1969¹⁵ e a RDC nº 259 de 20/09/2002¹⁶.

Os parâmetros avaliados foram: i) identificação da origem do produto, do fabricante, local de fabricação, lote, data de fabricação e validade (informações dos fabricantes e seus endereços); ii) identificação da composição discriminada no produto; iii) idioma no qual está impresso o rótulo (em língua portuguesa ou estrangeira); iv) alegações de propriedade funcional e/ou saúde (indicando que o produto possui propriedades medicinais, terapêuticas ou o aconselhamento de seu consumo como estimulante, para a melhoria da saúde, para a prevenção de doenças ou com ação curativa).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cromatografia em camada delgada

A detecção de sibutramina baseou-se em cinco amostras analisadas. Uma das amostras revelou uma mancha semelhante ao Rf do padrão de cloridrato de sibutramina, nos três sistemas cromatográficos testados. A resolução do cloridrato de sibutramina não foi afetada pela presença dos outros componentes da formulação. O limite de detecção para o cloridrato de sibutramina no método foi de 0,23 µg/µL, utilizando-se o sistema cromatográfico composto por placas de sílica gel G 60, eluente acetato de etila: metanol: hidróxido de amônio (85:15:10, v/v), e revelador solução de Dragendorff.

Espectrometria de massas

A comparação dos espectros obtidos, por infusão direta da amostra, em que foi detectada a substância cloridrato de sibutramina e da solução padrão de cloridrato de sibutramina em sonda ESI, modo de íons positivos em *full Scan MS* e *full Scan MS/MS* comprovou o resultado obtido por CCD, para a identificação desta substância na amostra. A identificação espectral foi obtida com espectros *full Scan MS* e *full Scan MS/MS* para os íons m/z 280 e seus fragmentos m/z 125, 139 e 153, conforme apresentado na Figura 2.

De acordo com as principais legislações sobre alimentos, na composição de identidade e qualidade de suplementos alimentares, não podem estar contidas substâncias ativas de qualquer natureza, principalmente aquelas estimulantes do sistema nervoso central^{15,16}. O cloridrato de sibutramina é uma noradrenalina sintética que deve ser utilizada sob prescrição e supervisão médica⁹. Não foi possível quantificar o cloridrato de sibutramina na amostra em que a substância foi detectada, pois a normalização do método requer uma quantidade

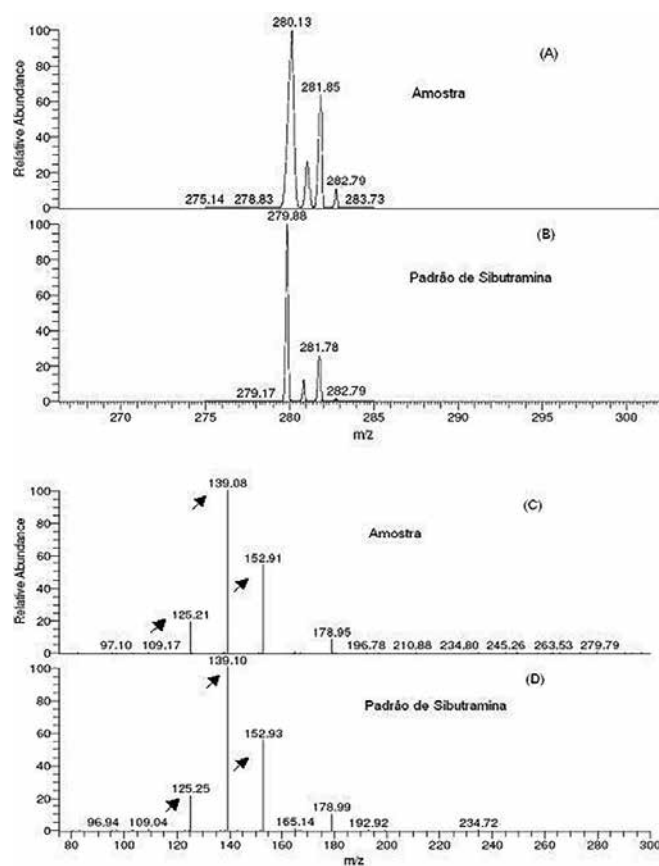


Figura 2. Espectros obtidos por infusão direta de solução metanólica da amostra e do padrão de sibutramina em sonda ESI, modo de íons positivos em Full Scan MS (A e B) e em Full Scan MS/MS (C e D) para os íons positivos em m/z 280 e seus fragmentos m/z 125, 138 e 153 (indicados por flechas) em LC/MS/MS Íon trap, Modelo LCQ Deca XP (Thermo Scientific)

determinada de amostra, não disponível para o presente estudo. Segundo assinala o Setor de Farmacovigilância do Centro de Vigilância de São Paulo¹⁷, os efeitos adversos relacionados ao consumo de sibutramina são a tontura, o aumento da pressão arterial, taquicardia e depressão, entre outros. Sucar e colaboradores¹⁸, em seus estudos, relataram uma possível interação medicamentosa da sibutramina com finasterida, levando ao surto psicótico. Jung e colaboradores⁶ descreveram muitas contraindicações da sibutramina, bem como seus efeitos colaterais.

Detecção de Metoclopramida por CCD:

Duas amostras revelaram a presença de metoclopramida por cromatografia em camada delgada, o limite de detecção para esta substância foi de 5,0 µg/µL. As manchas do padrão de metoclopramida e da amostra na placa foram raspadas e resuspensas em metanol p.a.,

e após analisadas, o perfil por espectrofotometria na região do ultravioleta foi o mesmo para ambos (padrão e amostra). Na rotulagem do produto, não havia menção da presença de metoclopramida.

Dizeres dos rótulos

De acordo com a Figura 3, das 86 amostras analisadas quanto aos dizeres do rótulo, 35 não declaravam informações ou endereço do fabricante, dificultando qualquer possibilidade de acesso por parte do consumidor em caso de dúvidas ou queixas sobre o produto, ademais, os rótulos de 68 amostras estavam com todo o texto no idioma inglês. Nos rótulos de 67 amostras constavam alegações funcionais e/ou de saúde, conforme apresentados na Tabela 1.

O tipo de mensagem de rótulo do produto é muito importante, porque é o primeiro contato com o consumidor, espera-se que traga todas as informações obrigatórias, com o objetivo de orientar o consumidor, evitando assim, a ocorrência de possíveis danos à sua saúde. O Código de Defesa do Consumidor¹¹ expressando esta preocupação estabelece em seu Artigo 31- Da Oferta, Seção II, Capítulo V Das Práticas Comerciais do Código de Defesa do

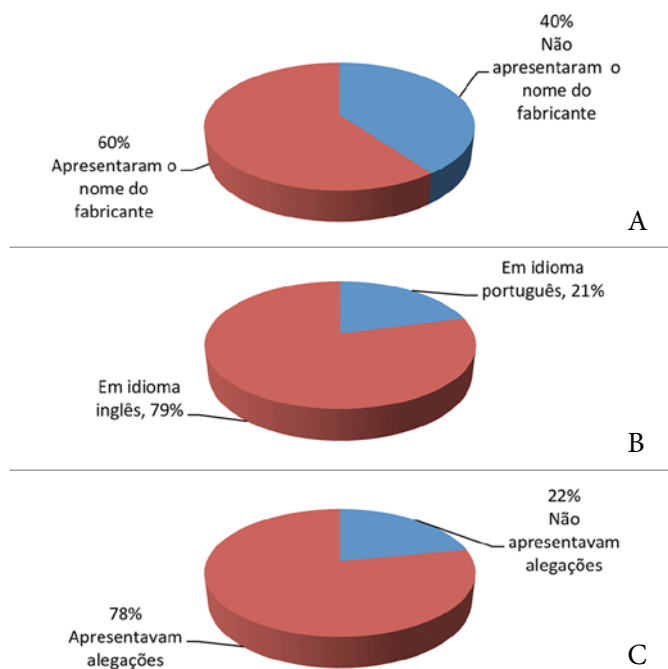


Figura 3. Distribuição em % de 86 amostras de rótulos de produtos comercializados como “alimentos para atletas”. A= rótulos sem declarar a origem do fabricante; B= rótulos com dizeres em idioma estrangeiro e C= rótulos constando alegações de propriedades funcionais e/ou saúde

Tabela 1. Alegações nos rótulos dos alimentos para atletas verificadas em 86 amostras

Alegações comumente verificadas	Quantidade de vezes das alegações
Nitrobombeamento, oxigenação, nutrição celular e recuperação física.	5
Mais saúde para os ossos, dentes e cartilagens.	3
Substitui os esteróides sintéticos, anabolizantes proporcionam aumento do volume muscular e aumento da força com resultados seguros, perda de peso, queima de gordura.	33
* Outros	26
Total	67

* São as alegações que não se repetiram

Consumidor: “A oferta e apresentação de produtos ou serviços devem assegurar informações corretas, claras, precisas, ostensivas e em língua portuguesa sobre suas características, qualidade, quantidade, composição, preço, garantia, prazos de validade e origem entre outros dados, bem como sobre os riscos que apresentam à saúde e segurança dos consumidores”.

Dados recentes levantados junto à população que consulta o serviço Disque-Saúde do Ministério da Saúde demonstraram que aproximadamente 70% das pessoas consultam os rótulos dos alimentos¹⁹. No caso de consumidores específicos que buscam “alimentos para atletas”, com uma finalidade determinada, mas que nem sempre são orientados por profissionais capacitados, as informações contidas no rótulo são utilizadas como base para a decisão de compra, o que às vezes, acarreta em gastos consideráveis com produtos inadequados.

Conforme apresentado na Tabela 1, as alegações nos rótulos das amostras analisadas deveriam estar registradas. Uma consulta feita à ANVISA, a respeito de uma parte das amostras, mostrou que, em relação às alegações dos rótulos, não havia conhecimento de permissão. Ressalta-se também, que os produtos com finalidade ou indicação medicamentosa e/ou terapêutica não são considerados alimentos, conforme determina o artigo 56 do Decreto-Lei nº 986/1969¹⁵.

Estes produtos, nacionais ou importados, não poderiam ser comercializados no país, uma vez que se encontram em desacordo com a legislação vigente. Ações de monitoramento da qualidade desses produtos são necessárias para assegurar que os mesmos não tragam riscos à saúde, principalmente quanto à adição de

“substâncias ativas/fármacos” que possam causar sérias reações adversas.

Quanto aos dizeres dos rótulos, independentemente do idioma, muitas amostras declaravam o termo “SUPLEMENTO ALIMENTAR” ou “DIETARY SUPPLEMENT”, entretanto segundo preconiza a RDC N° 27/2010²⁰, no Brasil não existe esta categoria de alimento, existem, somente, suplementos vitamínicos e/ou minerais; além disso, no Anexo II, está estabelecido que os alimentos com alegações de propriedades funcionais e/ou de saúde devem, obrigatoriamente, obter registro sanitário.

CONCLUSÃO

Estes resultados alertam sobre a possibilidade de utilização sem controle de substâncias farmacologicamente ativas, como a sibutramina e a metoclopramida, sem que estejam declaradas nos rótulos dos produtos comercializados. Muitos esforços precisam ser conduzidos nesta linha de investigação, pois há grande quantidade de fármacos que podem levar ao aumento de desempenho físico, o que é desejado pelos usuários deste tipo de alimento, cujas consequências para a saúde não são levadas em consideração.

Com base no estudo realizado, pode-se afirmar que não é dada à rotulagem a importância necessária, pois o rótulo tem por função esclarecer o consumidor acerca do produto, além de alertá-lo com a finalidade de minimizar os riscos do consumo inadequado. O rótulo no idioma inglês, além de desrespeitar a legislação, traz alegações e outras informações não traduzidas para o português, prejudicando a qualidade das informações.

O consumo destes produtos de forma irregular, com a adição de fármacos sibutramina e metoclopramida, com os dizeres dos rótulos em língua estrangeira e com alegações que podem confundir o consumidor quanto à verdadeira natureza do produto, bem como a sua indevida comercialização, gera uma séria preocupação com relação à saúde pública.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à empresa Medley pela doação do padrão de sibutramina, ao Sr. Felipe Lugão da empresa Analítica e à Profa. Dra. Marina Tavares do IQ-USP, por cederem o equipamento LC/MS/MS Íon trap, Modelo LCQ Deca XP (Thermo Scientific) para a realização deste ensaio.

REFERÊNCIAS

1. Van Thuyne W, Van Eenoo P, Delbeke FT Nutricional supplements: prevalence of use and contamination with doping agents. *Nutr Res Rev*. 2006;19:147-58.
2. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Informe Técnico nº. 32, de 14 de setembro de 2007- Ações fiscais adotadas face à adulteração de alimentos para praticantes de atividade física com sibutramina. [acesso 2010 Set 28]. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/32_140907.htm].
3. Carvalho T, Rodrigues T, Meyer F, Lancha Jr A, De Rose E, Nóbrega CL, et al. Modificações dietéticas, reposição hídrica, suplementos alimentares e drogas: comprovação de ação ergogênica e potenciais riscos para a saúde. *Rev Bras Med Esporte [Internet]*. 2009;15(3): 2-12. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-86922009000400001&lng=en. doi: 10.1590/S1517-86922009000400001].
4. Neto TLB A controvérsia dos agentes ergogênicos: estamos subestimando os efeitos naturais da atividade física? *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2001;45:121-2
5. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Assessoria de Imprensa. Suspenso comércio de dois suplementos alimentares. [acesso 2010 Set 27]. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2006/300806_1.htm].
6. Jung J, Hermanns-Clausen M, Weinmann W. Anorectic sibutramine detected in a Chinese herbal drug for eight loss. *Forensic Sci Int*. 2006;161:221-2.
7. Liang Q, Qu J, Luo G, Wang Y. Rapid and reliable determination of illegal adulterant in herbal medicines and dietary supplements by LC/MS/MS. *J Pharm Biomed Anal*. 2006;40:305-11.
8. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. SNGPC-Resultados 2009. [acesso 2011 Set 06]. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/hotsite/sngpc/relatorio_2009.pdf].
9. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 13, de 23 de março de 2010. Dispõe sobre a atualização do Anexo I, Listas de Substâncias Entorpecentes, Psicotrópicas, Precursoras e Outras sob Controle Especial, da Portaria SVS/MS N° 344, de 12 de maio de 1998 e dá outras providências. *Diário Oficial [da] União*. Brasília, DF, Seção 1, data da publicação no DOU p.115-8.
10. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of the therapeutics. 9a ed., editores Hardman, JG e Limbird, LE. New York: McGraw-Hill; 1996. p. 932-3.
11. Brasil. Subchefia para Assuntos Jurídicos. 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. v. 128, nº 176, supl., p. 1.
12. Auricchio MT, Bactistic MA, Markman BEO. Detecção de anorexígenos e benzodiazepínicos em formulações naturais empregadas em regimes de emagrecimento. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 1991;51:105-10.
13. Moffat AC. Clarke's isolation and identification of drugs. 2nd ed. London: The Pharmaceutical Press; 1986. p.1223.
14. United States Pharmacopeia, 32a ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention; 2009. p. 229- 30.
15. Brasil. Ministério da Marinha de Guerra, Ministério do Exército e Ministério da Aeronáutica Militar (ministérios do Governo Militar). Lei nº 986, de 21 de outubro de 1969. Institui Normas

- Básicas sobre Alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 21 out.1969, p. 8935 e com retificação no D.O.U. 11 de nov.1969 p. 9737.
16. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 259, de 20 de set. 2002 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova o Regulamento Técnico sobre Rotulagem de Alimentos Embalados. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 23 set. 2002.
 17. Centro de Vigilância Sanitária. Alerta Terapêutico nº 03/01 - Sibutramina Alerta CVS-SP nº 3, de março de 2002. [acesso 2010 Set 15]. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/farmacovigilancia/alerta/estadual/estadual_3.htm].
 18. Sucar DD, Sougey EB, Neto JB. Surto psicótico pela possível interação medicamentosa de sibutramina com finasterida. *Rev Bras Psiquiatr*. 2002;24:30-3.
 19. Agência Nacional de Vigilância Sanitária- ANVISA. Rotulagem Nutricional Obrigatória - Manual de Orientação aos Consumidores - Educação para o Consumo Saudável - Gerência Geral de Alimentos - 2001. [acesso 2010 Set 15]. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/alimentos/rotulos/manual_rotulagem.PDF].
 20. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução Nº 27, de 06 de agosto de 2010 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova sobre as Categorias de Alimentos e Embalagens Isentos e com Obrigatoriedade de Registro Sanitário. Diário Oficial [da] União, Brasília, DF, 09 ago. 2010. Seção 1, nº151. p.63.

Controle da qualidade de vacinas contra febre amarela utilizadas no Programa Nacional de Imunizações do Brasil

Quality control for yellow fever vaccines used in the Brazilian National Immunization Program

RIALA6/1419

Eduardo Jorge Rabelo NETTO^{1*}, Karen FRIEDRICH¹, Katia Christina LEANDRO², Isabella Fernandes DELGADO¹

*Endereço para correspondência: ¹Departamento de Imunologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, FIOCRUZ-RJ. Avenida Brasil, 4365 - CEP: 21.045-900, Mangueiras, Rio de Janeiro, Brasil. Telefone: (21) 3865-5130. e-mail: eduardo.netto@incqs.fiocruz.br

²Departamento de Química, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, FIOCRUZ-RJ
Recebido: 05.05.2011 - Aceito para publicação: 28.11.2011

RESUMO

Este trabalho teve como objetivos: (i) avaliar o processo de controle da qualidade de vacinas contra febre amarela, utilizadas pelo Programa Nacional de Imunizações do Ministério da Saúde no período de 2000 a 2008, pelo levantamento de dados provenientes do Sistema de Gerenciamento de Amostras do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz; e (ii) propor a utilização de gráficos de controle, como ferramentas úteis para a melhoria desse processo, pela análise da consistência de produção e detecção de tendências sistemáticas. A análise relativa ao controle da qualidade das vacinas contra febre amarela foi constituída dos seguintes parâmetros: ensaios de (i.) potência; (ii.) termoestabilidade; (iii.) determinação de ovalbumina residual; (iv.) esterilidade bacteriana e fúngica; (v.) teor de umidade residual; (vi.) endotoxina bacteriana; e (vii.) análise do protocolo resumido de produção e controle emitido pelo fabricante. No período estudado, ingressaram no INCQS 1031 lotes de vacinas contra febre amarela, produzidos por dois fabricantes distintos (97% - fabricante A e 3% - fabricante B), representando um total de 285 milhões de doses individuais. O presente estudo mostra que no INCQS o processo está sob controle estatístico, e as causas especiais de variação, caso ocorram, são adequadamente monitoradas.

Palavras-chave. vacina contra febre amarela (VCFA), Vigilância Sanitária, controle da qualidade, consistência de produção de produtos biológicos, gráfico de controle.

ABSTRACT

This study aimed: (i) at evaluating the process of quality control related to yellow fever vaccines used by the National Immunization Program (NIP) of the Brazilian Ministry of Health during the period from 2000 to 2008, by using survey data from the Sample Management System (SMS) of the National Institute for Quality Control in Health (INCQS) - Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz); and (ii) to propose the use of control charts, as useful tools for improving the processes of consistency of production and detection of systematic biases. The analysis to check the quality control of vaccines against yellow fever was comprised of the following parameters: (i) potency testing, (ii.) thermo stability, (iii.) residual ovalbumin contents (iv.) bacterial and fungal sterility assay, (v.) residual humidity contents, (vi.) bacterial endotoxin, and (vii.) vaccine production and respective quality control protocols stated by manufacturers. During the analyzed period, 1,031 yellow fever vaccine batches were analyzed by INCQS, which were produced by two manufacturers (97% by manufacturer A and 3% by manufacturer B), representing a total of 285 million individual doses. The present study indicates that at INCQS the process is under statistical control, and the specific causes of variation, if they eventually occur, are reasonably managed.

Keywords. yellow fever vaccine, Health Surveillance, quality control, production consistency of biological, chart control.

INTRODUÇÃO

A produção da vacina contra a febre amarela pelo Instituto Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro, iniciou-se em 1937, a partir do desenvolvimento da cepa 17D, por Theiler e Smith nos laboratórios da Fundação Rockefeller e, a constatação de sua capacidade imunogênica para o homem. Nesse mesmo ano a vacina foi utilizada pela primeira vez em maior escala no Brasil durante o surto epidêmico de febre amarela ocorrido no município de Varginha/MG. Posteriormente, foi utilizada em programas de vacinação em outros estados brasileiros, com grande sucesso e, a partir de então, passou a ser aplicada em áreas endêmicas, de forma sistemática, como a melhor alternativa para o controle da febre amarela no país¹.

Atualmente, todas as vacinas contra a febre amarela derivam da cepa 17D². Esta vacina de vírus atenuado é considerada altamente imunogênica, conferindo imunidade a 95-99% dos indivíduos vacinados; é bem tolerada e raramente associada a eventos adversos graves. Está indicada para indivíduos com mais de seis meses de idade, sendo ministrada em dose única e com reforço a cada dez anos. Dados recentes do Ministério da Saúde apontam a transmissão do vírus vacinal via leite materno, por esta razão a vacinação é contra indicada para mulheres em fase de amamentação, bem como para crianças menores de seis meses de idade, devido ao maior risco associado à encefalite pós-vacinal nesta faixa etária³.

A vacina contra febre amarela é rotineiramente usada pelo Programa Nacional de Imunizações (PNI) do Ministério da Saúde brasileiro nas zonas endêmicas, de transição e de risco potencial, sendo obrigatória a todas as pessoas que se deslocam à zona endêmica⁴. Assim como os demais imunobiológicos destinados ao PNI, a vacina contra febre amarela é encaminhada ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) e submetida à análise laboratorial e documental antes da liberação dos lotes para uso humano. Os ensaios laboratoriais realizados nos lotes de vacina contra febre amarela incluem desde a determinação do teor de umidade residual, até a avaliação da segurança e potência. A análise documental - *i.e.* análise do protocolo resumido de produção e controle - consiste da verificação dos procedimentos de produção e do controle da qualidade das diversas etapas de produção, lote final e das matérias-primas. Essa análise, além de ser um requisito para a liberação dos lotes, permite ao laboratório controlador avaliar a consistência de produção, através, por exemplo, do acompanhamento dos valores de potência utilizando gráficos de controle.

É neste contexto que o presente estudo pretende contribuir: inicialmente avaliando o perfil das vacinas contra febre amarela de diferentes fabricantes analisadas pelo INCQS nos últimos anos e realizando uma análise comparativa dos resultados obtidos; avaliando o desempenho e a detecção de tendências no processo de controle da qualidade no fabricante e no laboratório nacional de controle por meio do monitoramento dos valores de potência, como principal parâmetro associado à consistência de produção; reforçando a necessidade da utilização de gráficos de controle para orientar a melhoria dos processos de produção e de controle da qualidade das vacinas contra febre amarela utilizadas pelo PNI.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizando do Sistema de Gerenciamento de Amostras (SGA), que permite o acompanhamento de todas as análises efetuadas no INCQS, foram realizadas consultas referentes às amostras de vacina contra febre amarela entre o período de janeiro de 2000 a dezembro de 2008. Estes produtos, uma vez ingressados no INCQS, foram avaliados quanto ao protocolo resumido de produção e controle da qualidade, ensaio de potência e identidade (valor de referência: $\geq 10^3$ UFP/dose), teste de termoestabilidade (valor de referência: perda $\leq 1,0 \log 10$ e título $\geq 10^3$ UFP/dose), determinação de ovoalbumina residual (valor de referência: $\leq 5 \mu\text{g/dose}$), esterilidade bacteriana e fúngica (valor de referência: ausência de bactérias e fungos contaminantes), teor de umidade residual (valor de referência: $\leq 3,0\%$) e ensaio de endotoxina bacteriana (valor de referência: $\leq 10\text{UE/mL}$).

Todos os ensaios citados acima relativos ao controle da qualidade da vacina contra febre amarela foram realizados segundo a 4ª Edição da Farmacopeia Brasileira⁵, cujos valores de referência são idênticos aos aceitos internacionalmente. Por meio de consultas ao SGA, empregando a palavra-chave “febre amarela”, foi realizado o acompanhamento das análises, levantamento de dados históricos e aos demais relatórios gerenciais, permitindo uma avaliação detalhada das informações provenientes de cada lote de produto analisado pelo INCQS. Os dados das amostras de vacina contra febre amarela possibilitaram a realização de análises críticas dos parâmetros estudados, como: número de lotes recebidos, características de cada lote (*p.e.* tamanho do lote, número de doses e procedência); frequência de resultados satisfatórios e insatisfatórios; causas da insatisfatoriedade; concordância dos resultados analíticos entre INCQS e os

laboratórios produtores (por meio da análise dos dados presentes no protocolo resumido de produção e controle de qualidade); consistência de produção; entre outros.

Os dados, uma vez levantados no SGA, foram transferidos para planilhas de Microsoft Excel® e demonstrados em gráficos e tabelas, permitindo aferir a qualidade desta vacina, baseando-se no processo industrial e em conformidade com as Boas Práticas de Fabricação.

Além do levantamento de dados no SGA, foi realizada junto à equipe do Laboratório de Vacinas Virais do Departamento de Imunologia do INCQS uma consulta sobre os resultados obtidos pelos fabricantes para o ensaio de potência, por meio da análise do protocolo resumido de produção e controle da qualidade. Esses dados foram utilizados para avaliar criticamente a consistência de produção das vacinas contra febre amarela e ainda, comparar os valores resultantes do ensaio de potência com os valores obtidos no INCQS. Desde 2002, o INCQS atende ao PNI utilizando uma lógica de análise por aleatoriedade (*i.e.* para cada cinco lotes de vacina contra febre amarela, ingressados no Instituto, somente um é selecionado para realização dos ensaios laboratoriais). Assim, somente os lotes aleatoriamente selecionados foram usados para a confecção dos gráficos de controle.

Confecção de gráficos de controle

A confecção dos gráficos de controle foi realizada utilizando o programa SPC Explorer RT, versão 5.21 (Quality América Inc.). O acompanhamento do processo de controle da qualidade da vacina contra febre amarela foi realizado a partir da análise de dois gráficos diferentes: (i.) dos valores de potência fornecidos pelo fabricante no protocolo resumido de produção e controle, e (ii.) dos valores de potência obtidos nos testes realizados no INCQS.

A partir da coleta dos dados, os gráficos foram confeccionados como definido pela Organização Mundial de Saúde⁶. Os eixos dos gráficos foram formados pelo tempo (abscissa) e pelo resultado do teste de potência (ordenada). As linhas horizontais do gráfico consistiram da média e dos limites de controle superiores e inferiores, calculados a partir da média adicionada de 3 desvios-padrão (DP). As médias, os desvios-padrão e os limites foram calculados com os 20 primeiros valores mensurados a cada ano. Depois de adicionados aos gráficos, os valores foram imediatamente submetidos aos testes de desempenho (ou *performance*) no programa SPC RT Explorer. Os testes de desempenho verificaram a existência de valores além dos limites de controle e de seis valores consecutivos ascendentes ou descendentes.

Tabela 1. Quantitativo de lotes de vacinas contra febre amarela, analisados pelo INCQS (2000 - 2008) em relação ao seu fabricante e sua apresentação

Anos	Fabricante		Apresentação*		
	A N (%)	B N (%)	5 N (%)	10 N (%)	50 N (%)
2000	74 (95)	4 (5)	13 (17)	0 (0)	65 (83)
2001	26 (90)	3 (10)	3 (9)	0 (0)	26 (91)
2002	93 (98)	2 (2)	76 (80)	0 (0)	19 (20)
2003	161 (100)	0 (0)	161 (100)	0 (0)	0 (0)
2004	181 (97)	5 (3)	182 (98)	0 (0)	4 (2)
2005	144 (97)	4 (3)	148 (100)	0 (0)	0 (0)
2006	88 (97)	3 (3)	91 (100)	0 (0)	0 (0)
2007	121 (100)	0 (0)	116 (96)	5 (4)	0 (0)
2008	112 (92)	10 (8)	50 (41)	17 (14)	55 (45)
TOTAL	1.000 (97)	31 (3)	840 (82)	22 (2)	169 (16)

*Apresentações de vacinas comerciais contra febre amarela: 5, 10 ou 50 doses/frasco

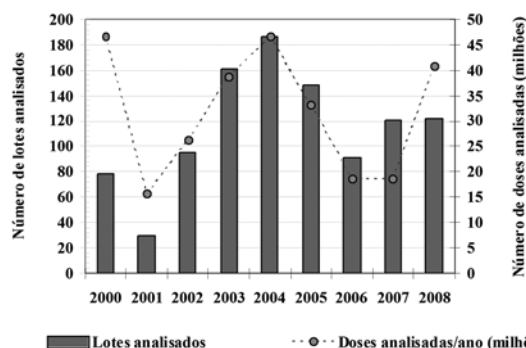


Figura 1. Quantidade de lotes e de doses de vacina contra febre amarela analisados pelo INCQS entre 2000 e 2008

RESULTADOS E DISCUSSÃO

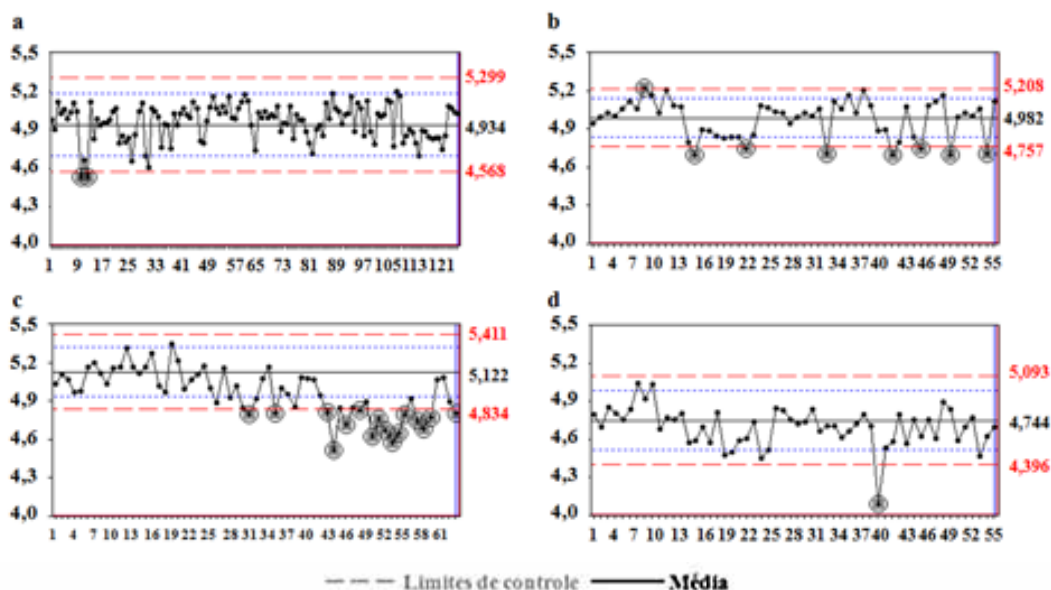
Conforme observamos na Tabela 1 e na Figura 1, no período compreendido entre o mês de janeiro de 2000 e dezembro de 2008, ingressaram no INCQS, 1031 lotes de vacinas contra febre amarela, correspondendo a aproximadamente 285 milhões de doses. Pode-se observar uma variação no número de lotes/doses por ano; enquanto mais de 150 lotes foram analisados por ano entre 2003 e 2005, nota-se que somente 29 lotes ingressaram para análise no ano de 2001. Esta variação no quantitativo de lotes/ano pode ser explicada por diferentes fatores, entre eles: a forma de apresentação do produto (5, 10 ou 50 doses/frasco); o tamanho do lote, que por sua vez depende da capacidade de produção de cada fabricante; e por fim, pelas estratégias políticas relacionadas a ações preventivas por parte do Ministério da Saúde no Brasil.

Neste sentido, cabe ressaltar que nos anos de 2003, 2004 e 2005, houve um plano de intensificação de ações

Tabela 2. Resultados insatisfatórios de lotes de vacinas, contra febre amarela, analisadas pelo INCQS (2000 - 2008)

Ano (nº de lotes)	Apresentação	Motivo da insatisfatoriedade	Identificação do microorganismo	Fabricante
2000 (2 lotes)	50 doses/ca. 901.000 doses	Teor de umidade residual	-----	A
2002 (1 lote)	5 doses/ca. 204.000 doses	Esterilidade bacteriana e fúngica	Enterobactercloacae	A
2006 (1 lote)	5 doses/ca. 209.000 doses	Esterilidade bacteriana e fúngica	<i>Sphingomonas</i> sp.*	A
2008 (1 lote)	5 doses/ca. 208.000 doses	Esterilidade bacteriana e fúngica	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	A

**Sphingomonas* sp.: isoladas e caracterizadas por metodologia fenotípica e genotípica.



a) Lote de vacina de 2005; b) Lote de vacina de 2006; c) Lote de vacina de 2007; d) Lote de vacina de 2008.

Figura 2. Resultados dos ensaios de potência de lotes de vacina contra febre amarela produzidos e analisados pelo fabricante A (2005 - 2008)

preventivas e de vigilância da febre amarela. No final de 2007, quando houve campanhas de vacinação da população brasileira, parte dos lotes inicialmente destinada à exportação foi utilizada em nível nacional, devido à escassez do produto e à doação desta vacina para alguns países da América do Sul.

As proporções entre os lotes recebidos pelo INCQS no período entre 2000 e 2008, em relação às diferentes apresentações da vacina contra febre amarela (5, 10 ou 50 doses/frasco), assim como suas procedências, estão demonstradas na Tabela 1. Observa-se que nos primeiros anos de estudo havia uma predominância pela apresentação de 50 doses. Este quadro se alterou nos anos de 2002 a 2007, quando o PNI passou a empregar predominantemente vacinas de 5 doses/frasco,

tendo inclusive nos anos de 2003, 2005 e 2006 usado exclusivamente vacinas com esta apresentação.

A apresentação de 50 doses/frasco da vacina contra febre amarela pode levar ao desperdício, uma vez que, depois de aberto, se mantidas as condições preconizadas, o produto tem validade de somente 4 horas⁷. A utilização de frascos de 50 doses mostra-se vantajosa durante a imunização de grandes grupos de indivíduos, principalmente em situações de surtos epidêmicos. Em 2008, observa-se um novo aumento da utilização de vacinas com 50 doses/frasco. O emprego de vacinas contra febre amarela com apresentação de 10 doses/frasco ocorreu em menor escala (2% do total de lotes analisados), e unicamente nos anos de 2007 e 2008. Observando-se ainda a Tabela 1, verificamos que

97% dos lotes analisados pelo INCQS foram produzidos pelo fabricante A e apenas 3% pelo fabricante B. Assim, o fabricante A assume em todos os anos o fornecimento da vacina contra febre amarela, atendendo à demanda gerada pelo quadro epidemiológico do país. Pode-se notar que somente nos anos 2003 e 2007, o PNI não utilizou a vacina contra febre amarela do fabricante B, diferente dos demais anos, quando foi necessária a sua utilização para atendimento das necessidades epidemiológicas nacionais, principalmente no ano de 2008.

Insatisfatoriedade dos lotes de vacina contra febre amarela

Nos anos de 2000, 2002, 2006 e 2008, foram encontrados resultados insatisfatórios durante o controle da qualidade da vacina contra febre amarela pelo INCQS, conforme demonstrado na Tabela 2. Somando-se esses anos, foram detectados desvios de qualidade e conformidade em 5 lotes (2 lotes em 2000 e 1 lote por ano em 2002, 2006 e 2008) de vacinas provenientes do fabricante A (i.e. 0,5% do total de lotes produzidos por este laboratório produtor). Nos anos de 2000 e 2002 este fabricante apresentou insatisfatoriedade de 1 lote/ano, devido ao resultado obtido com o ensaio de teor de umidade residual e nos anos de 2000, 2006 e 2008, lotes insatisfatórios (1 lote/ano) no ensaio de esterilidade bacteriana e fúngica. Dentre os lotes reprovados pelo INCQS, 4 eram de apresentação de 5 doses/frasco e apenas 1 de 50 doses/frasco. Ao todo, aproximadamente 1.730.000 doses de vacinas contra febre amarela foram reprovadas no período estudado, sendo consequentemente descartadas pelo próprio laboratório produtor após emissão de laudo de análise insatisfatório pelo INCQS. Não foram encontrados resultados insatisfatórios dentre os 31 lotes provenientes do fabricante B.

Vale ressaltar que o resultado insatisfatório de um lote pressupõe sua análise crítica com a finalidade de se buscar as causas e ações corretivas a serem implementadas. Assim, como parte do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, o INCQS avalia cada caso de resultado insatisfatório, definindo medidas pertinentes no sentido da prevenção de novas não conformidades.

A consistência de produção das vacinas contra febre amarela do fabricante A

O princípio da consistência é fundamental na produção de vacinas e baseia-se no fato de que os lotes produzidos são semelhantes a outros comprovadamente seguros e eficazes na espécie-alvo⁸ e está relacionada à implementação de um sistema de garantia da qualidade e do

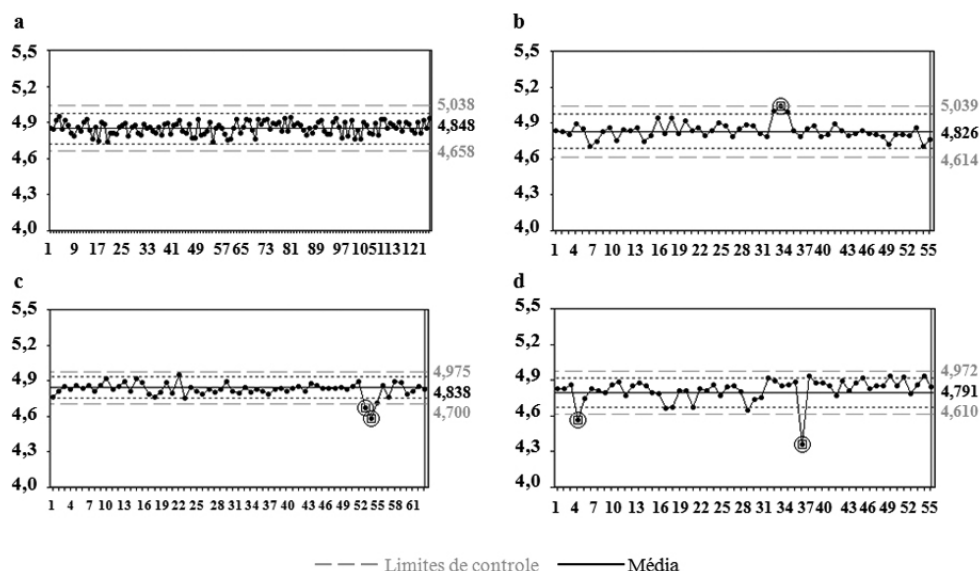
seguimento de Boas Práticas de Fabricação. A consistência dos lotes de vacinas pode ser averiguada por meio do monitoramento de parâmetros, que sejam diretamente influenciados pelas etapas do processo produtivo, como a cultura celular, a origem dos ovos embrionados e pelos componentes das vacinas – e.g. adjuvantes, antígenos e conservantes – e que, preferencialmente, estejam relacionados à aplicação do produto. Nesse contexto, a potência foi o parâmetro escolhido para a avaliação da consistência de produção da vacina contra febre amarela no presente estudo.

Os dados mostrados nos gráficos de controle correspondem aos resultados obtidos nos ensaios de potência, somente dos lotes produzidos pelo fabricante A, que foram submetidos à análise laboratorial entre os anos de 2005 e 2008, tanto no laboratório fabricante (Figura 2) como no INCQS (Figura 3).

A confecção de gráficos de controle é uma ferramenta utilizada para avaliar a consistência de produção e permite identificar causas especiais de variação num determinado processo, como o de produção e de controle de qualidade de um imunobiológico.

Nos gráficos apresentados nas Figuras 2 e 3, é possível observar variações naturais do processo, também denominadas causas comuns de variação, que estarão presentes mesmo que todas as operações sejam executadas com métodos padronizados. Quando ocorrem somente causas comuns de variação, todos os valores se encontram dentro dos limites de controle. Neste caso, diz-se que apesar da variabilidade, o processo está sob controle estatístico. Nos casos em que um valor se encontra fora dos limites de controle (pontos evidenciados pelo círculo), é possível dizer que causas especiais de variação podem estar interferindo no processo.

Em 2005, 2 valores de potência fornecidos pelo fabricante, dentre os 127 lotes analisados neste ano encontravam-se abaixo do limite inferior de controle (Figura 2a), representando um percentual de 1,57%. Na Figura 3a, que mostra os valores de potência obtidos pelo INCQS para os mesmos lotes descritos na Figura 2a, não foram encontrados valores fora dos limites de controle. Nos gráficos das Figuras 2 e 3 ainda é possível observar que a diferença entre o limite superior de controle (LSC) e o limite inferior de controle (LIC) foi de 0,731 para o fabricante A (Figura 2a). Já na Figura 3a foi possível observar que essa mesma diferença entre os limites foi aproximadamente a metade (0,380) para os valores obtidos pelo INCQS. Tais resultados sugerem que o ensaio de potência da vacina contra febre amarela no INCQS



a) Lote de vacina de 2005; b) Lote de vacina de 2006; c) Lote de vacina de 2007; d) Lote de vacina de 2008

Figura 3. Resultados dos ensaios de potência de lotes de vacina contra febre amarela do fabricante A analisados pelo INCQS (2005 - 2008)

apresentou menor variação em relação ao ensaio realizado no laboratório de controle da qualidade do fabricante.

Em 2006, foram analisados 57 lotes de vacina contra febre amarela. Dentre eles, 8 valores de potência (14,04%) encontram-se além dos limites de controle nos gráficos que representam os valores fornecidos pelo fabricante (Figura 2b). Na Figura 3b apenas 1 valor encontra-se além dos limites de controle, o que representa um percentual de 1,75%. A diferença entre os LSC e o LIC foi de 0,451 no gráfico relacionado aos dados do fabricante A (Figura 2b); valor este muito próximo ao valor obtido no gráfico do INCQS, que foi de 0,425 (Figura 3b). O percentual de valores além dos limites de controle foi maior que o encontrado no ano anterior.

No ano de 2007, 16 valores de potência (25,81%) fornecidos pelo fabricante, dentre os 62 lotes analisados, encontravam-se abaixo do limite inferior de controle, limites maiores que os limites encontrados nos anos de 2005 e 2006, de acordo com o demonstrado na Figura 2c. Diferentemente, com relação aos valores de potência do INCQS (Figura 3c), apenas dois valores estavam abaixo do LIC, representando um percentual de apenas 3,22%. A diferença entre o LSC e o LIC do gráfico que mostra os valores de potência do fabricante é 0,577, aproximadamente o dobro da encontrada pelo INCQS (0,275).

Pode-se observar ainda, que os valores além dos limites encontram-se concentrados na segunda metade do gráfico. Nesse período houve maior necessidade de imunização da população com vacinas contra febre

amarela pelo PNI, devido ao aumento do número de casos da doença no Brasil e em alguns países da América do Sul. Essa necessidade de maior agilidade na produção e liberação dos lotes pode ter levado a alterações no processo, que representaram causas especiais de variação. Entretanto, no INCQS poucos valores se encontravam fora dos limites, sugerindo que a necessidade de liberação de lotes em menor tempo não interferiu no processo da mesma maneira.

No ano de 2008, somente um dentre os 57 valores (1,75%) de potência fornecidos pelo fabricante encontrava-se abaixo do limite inferior de controle (Figura 2d). Já no INCQS (Figura 3d) é possível observar que 2 valores encontravam-se abaixo do limite inferior de controle (3,51%). A diferença entre os LSC e LIC do gráfico de controle do fabricante foi de 0,697, aproximadamente o dobro do encontrado pelo INCQS (0,362).

Vale ressaltar que a aplicação dos gráficos de controle utilizados neste estudo para demonstração do desempenho do processo de produção e controle da qualidade mostrou-se uma ferramenta útil, auxiliando no monitoramento dos parâmetros de análise crítica e oferecendo maior confiabilidade em relação aos resultados dos ensaios laboratoriais relativos ao controle da qualidade de produtos biológicos. Dessa maneira, pode-se concluir que no INCQS o processo está sob controle estatístico e as causas especiais de variação, caso ocorram, estão sendo controladas. Esse controle pode ser realizado também pela confecção de gráficos de controle para os resultados obtidos com os materiais de referência que

são utilizados nos laboratórios de controle nos ensaios para determinação da potência da vacina contra febre amarela, como recomendado pela OMS.

Deve-se enfatizar que o processo de controle da qualidade tem como objetivo avaliar as especificações definidas em normas oficiais e/ou no registro sanitário, e as ferramentas aqui apresentadas podem subsidiar o laboratório nacional de controle da qualidade com dados relevantes no que diz respeito ao monitoramento da consistência de produção, eventuais mudanças de processos e até auxiliar na percepção de necessidade e/ou na condução de auditorias em laboratórios produtores; tal como no exemplo apresentado, quando, por meio da análise dos gráficos de controle, foi possível observar um número significativo de resultados do ensaio de potência do fabricante A abaixo do limite inferior de controle, coincidindo com o período em que houve maior demanda pela vacina contra febre amarela no ano de 2007.

No entanto, cabe destacar que os ensaios preconizados nos compêndios oficiais e, portanto conduzidos mundialmente nos laboratórios oficiais de controle da qualidade para fins de liberação de lote de produtos biológicos, não apresentam potencial preditivo para detecção de todo tipo de evento adverso⁹. Alguns destes eventos, aparentemente, estão associados à predisposição genética dos indivíduos imunizados e só serão detectados em campo, quando o produto em questão é aplicado em larga escala, como por exemplo, a doença viscerotrópica aguda. Embora rara, esta enfermidade é, via de regra, muito grave, levando à estimativa de risco aproximada de 1 óbito a cada 450.000 doses aplicadas.¹⁰⁻¹⁴

Assim sendo, ressaltamos a necessidade da estreita relação entre as esferas de atuação responsáveis pelo controle da qualidade e as ações de Farmacovigilância. Quanto mais eficientes forem tais ações de controle da qualidade pré-vacinal e de Farmacovigilância, mais ágeis serão as decisões regulatórias e consequentemente as intervenções resultantes desse processo, fortalecendo por fim o Programa Nacional de Imunização.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é parte da dissertação de mestrado de E.J.R.N. apresentada ao Programa de Mestrado Profissional em Vigilância Sanitária do INCQS/FIOCRUZ. I.F.D. é bolsista pesquisadora do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (DT-II/CNPq). Os autores agradecem à equipe do Departamento de Imunologia do INCQS pelo apoio no levantamento de dados para o presente estudo.

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Manual de Vigilância Epidemiológica de Febre Amarela. Brasília (DF); 2004. p.69.
2. Barnett ED. Yellow Fever: Epidemiology and Prevention. *Clin Infect Dis*. 2007;44: 850-6.
3. Centers for Disease Control and Prevention - CDC. Transmission of Yellow Fever Vaccine Virus through breast-feeding – Brazil 2009. *MMWR*. 2010;12: 130-2.
4. Figueiredo LT. Emergent arboviruses in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007;40: 224-9.
5. Farmacopeia Brasileira. 4ª ed, pt 2, fasc. 3. São Paulo: Editora Atheneu; 2001. p.124.
6. World Health Organization - WHO. Manual of laboratory methods for testing of vaccines used in the WHO Expanded Programme on Immunization. 1997. p.15-17.
7. Brasil. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância Epidemiológica de Eventos Adversos Pós-Vacinação, Série Manual e Normas Técnicas em Saúde. 2ª ed. Brasília (DF); 2008. p.74-80.
8. Hendriksen C, Arciniega JL, Bruckner L, Chevalier M, Coppens E, Descamps J, et al. The consistency approach for the quality control of vaccines. *Biologicals*. 2008;36:73-7.
9. Netto EJR, Leal EC, Delgado IF, Leandro KC. Avaliação do controle da qualidade realizado nos produtos vacinais para sarampo, caxumba e rubéola utilizados no PNI do Brasil no período de 1999 a 2007. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2010;69(3):408-15.
10. Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Manual de vigilância epidemiológica dos eventos adversos pós-vacinação. 2ª ed. Brasília (DF); 2008.
11. Hayes EB. Acute viscerotropic disease following vaccination against yellow fever. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2007;101(10):967-71.
12. Martins RM, Maia MLS, Santos EM, Cruz RLS, Santos PRG, Carvalho SMD, et al. Yellow Fever Vaccine Post-marketing Surveillance in Brazil. *Procedia in Vaccinology*. 2010;2(2):178-83.
13. Vasconcelos PFC, Luna EJ, Galler R, Silva LJ, Coimbra TL, Barros VLRS, et al. Brazilian Yellow and Fever Vaccine Evaluation Group. Serious adverse events associated with yellow fever 17DD vaccine in Brazil: a report of two cases. *The Lancet*. 2001;358 (9276):91-7.
14. Silva ML, Espírito-Santo LR, Martins MA, Silveira-Lemos D, Peruhype-Magalhães V, Caminha RC, et al. Clinical and Immunological Insights on Severe, Adverse Neurotropic and Viscerotropic Disease following 17D Yellow Fever Vaccination. *Clin Vac Immunol*. 2010;17(1):118-26.

Aplicação do conceito do erro total na validação do ensaio de potência da vacina oral contra a poliomielite

Use of the total error approach for validating the potency assay for oral poliomyelitis vaccine

RIALA6/1420

Jarbas Emílio dos SANTOS¹, Michele Cardoso do NASCIMENTO¹, Patrícia Alves dos SANTOS¹, Ana Cristina de Almeida NOGUEIRA^{2,3}, Wlamir Corrêa de MOURA^{1*}

*Endereço para correspondência: ¹Laboratório de Vacinas Virais, Departamento de Imunologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, FIOCRUZ-RJ; Telefone: (21) 3865-5130, e-mail: wlamir.moura@incqs.fiocruz.br

²Coordenação de Pós-Graduação, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, FIOCRUZ- RJ.

³Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia de Infecções Virais, FIOCRUZ- RJ.

Recebido: 16.08.2011 - Aceito para publicação: 11.11.2011

RESUMO

Esta pesquisa foi realizada utilizando-se uma abordagem alternativa na validação do ensaio de potência da vacina oral contra a poliomielite para traçar o perfil deste ensaio, levando-se em conta a grande variabilidade de ensaios biológicos. Foram adotadas duas abordagens para a validação do ensaio: a abordagem Clássica da "International Conference on Harmonization" aplicada aos ensaios biológicos e a abordagem do Conceito do Erro Total. As principais características avaliadas no estudo de validação, por se tratar de um ensaio quantitativo, foram a veracidade, a precisão e a exatidão. Foram ainda avaliadas: a adequação do ensaio aos critérios de aceitação preconizados pelo *Food and Drug Administration* (EUA) para validação, adotando-se a variação máxima aceita de 20%, a reprodutibilidade do ensaio em uma abordagem prática, com o uso das variâncias entre os resultados de potência de 39 lotes da vacina (do mesmo produtor) obtidos no INCQS e no laboratório produtor, por amostra, para calcular o Coeficiente de Variação geométrico geral. Foi também determinada a Incerteza de Medição do Teste. O ensaio apresentou veracidade e precisão satisfatórias, o que demonstrou sua Exatidão satisfatória para a intenção de uso nas duas abordagens de validação.

Palavras-chave. vacinas, poliomielite, validação, bioensaios, controle da qualidade, erro.

ABSTRACT

The present study was carried out using an alternative approach for validating the potency assay of Oral Polio Vaccine. Owing to the high variability of biological assays, two approaches were utilized to validate the test: the "International Conference on Harmonization" classical approach and the Total Error approach. The main parameters evaluated for the validation study were the trueness, precision and accuracy, seeing that it is a quantitative assay. Also, additional parameters were assessed: the assay adequacy to the acceptance criteria for validation described by the Food and Drug Administration (USA) by determining 20% as the maximum variability, the test reproducibility in a practical approach, using the variance among the potency results of 39 vaccine lots (from the same producer) obtained from the producer laboratory and from the National Control Laboratory, per sample, to calculate the overall geometric coefficient of variation. The Uncertainty of Measurement of Test was also determined. The potency assay has presented good trueness and precision what demonstrated suitable accuracy for the intended use in the two validation approaches.

Keywords. poliomyelitis, validation, bioassay, quality control, bias.

INTRODUÇÃO

Os bioensaios normalmente usados para estimar a potência de drogas distinguem-se de testes químicos por serem realizados em substratos biológicos (e.g. animais, células vivas ou complexos funcionais de receptores-alvo). Devido a múltiplos fatores operacionais e biológicos oriundos da base biológica, eles tipicamente exibem maior variabilidade em relação aos testes baseados em química¹.

Na indústria farmacêutica, validações analíticas são realizadas de acordo com o guia da “*International Conference on Harmonization*” (ICH)². Entretanto, na introdução deste guia part II, é afirmado que “devido à sua natureza complexa, procedimentos analíticos para produtos biológicos e biotecnológicos, em alguns casos, podem ser abordados diferentemente deste documento”³. Partindo desta premissa, uma comissão da “*Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques*” (SFSTP)⁴ desenvolveu um guia prático específico para a validação de ensaios biológicos aplicando a abordagem clássica da ICH².

A ANVISA⁵ considera metodologias analíticas descritas em farmacopéias ou formulários oficiais, devidamente reconhecidos por este órgão, como validadas, e para métodos não validados, determina que a validação garanta, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados.

A ICH² recomenda que para estudos de validação de ensaio de natureza quantitativa, as duas características mais relevantes a serem avaliadas são a exatidão (grau de concordância entre um valor medido e um valor verdadeiro de um mensurando⁶) e a precisão (grau de concordância entre indicações ou valores medidos, obtidos por medições repetidas, no mesmo objeto ou em objetos similares, sob condições especificadas⁶). No entanto, a interpretação deste guia é confusa, misturando a avaliação do Erro Sistemático, representada pelo critério de veracidade, com a avaliação do Erro Total representada pelo critério da Exatidão³. A Norma ISO 5725⁷ provê uma definição adequada para a determinação da exatidão de métodos quantitativos, definido como a soma da veracidade e da precisão. Esta abordagem para validação e transferência de métodos analíticos, também chamada de “Conceito do Erro Total”, desde sua publicação inicial em 1997⁸, tem sido difundida pela comissão SFSTP⁹, e já sofreu algumas modificações e recebeu propostas visando um processo contínuo de melhorias como descrito por Hubert et al.⁹.

Este conceito se baseia na utilização de um intervalo de conteúdo- β de tolerância, inicialmente proposto por Mee¹⁰ que define um intervalo, combinando a veracidade e a precisão calculadas, contendo uma proporção esperada β de futuros resultados; seguindo a notação clássica em estatística, β representa a probabilidade de ocorrência do Erro tipo II – a probabilidade de aceitar-se a hipótese nula quando ela está errada, que neste contexto corresponderá ao erro de concluir que um resultado esteja satisfatório quando ele estiver insatisfatório¹¹. Esta abordagem global considera um procedimento satisfatório se a probabilidade de que a diferença entre cada medida de uma amostra e seu “valor verdadeiro” esteja dentro de limites de aceitação predefinidos pelo analista. O valor dos limites deve ser escolhido de acordo com o objetivo de uso dos resultados. O objetivo é ligado às normas utilizadas para o ensaio (e.g. 15% em amostras clínicas, 30% para ensaios de ligação como Radio Imuno Ensaio e ELISA etc.)¹².

Os critérios de aceitação para a validação de ensaios do “*Food and Drug Administration*” (FDA)¹, preconizam que pelo menos 67% (4 em 6 resultados) das amostras de controle da qualidade devem estar entre 15% do seu valor nominal, porém, em certas circunstâncias, critérios de aceitação mais amplos podem ser justificáveis. Este critério ficou conhecido como a regra 4-6-15¹³.

A incerteza de Medição é um parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um mensurando (grandeza submetida à medição), com base nas informações utilizadas⁶ e segundo a EURACHEM¹⁴, é a indicação quantitativa da qualidade dos resultados de medição, sem a qual os mesmos não poderiam ser comparados entre si, com os valores de referência especificados ou com um padrão. Uma vez que o valor verdadeiro do resultado de uma medição é desconhecido qualquer resultado de uma medição será somente uma aproximação ou estimativa do valor do mensurando em questão. Sendo assim, a representação completa de tal mensurando deverá incluir a dúvida deste resultado, a qual é traduzida pela sua incerteza de medição¹⁵.

O Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), no país, é o Laboratório Nacional de Controle (LNC) e realiza o controle da qualidade de todas as vacinas que compõem o calendário de rotina formulado pelo Programa Nacional de Imunização (PNI), como por exemplo, a vacina tríplice viral contra sarampo, caxumba e rubéola (“*Measles, Mumps and Rubella*” – MMR), vacina contra febre amarela e a vacina Oral Contra Poliomielite (“*Oral Poliomyelitis Vaccine*” - OPV).

Sistemas de garantia da qualidade como as Boas Práticas de Fabricação correntes (BPFc, criadas pelo FDA na década de 1960) e a Norma ISO/IEC 17.025¹⁶ requerem o uso de procedimentos analíticos propriamente validados. Embora a ANVISA⁵ considere que métodos farmacopeicos não requeiram revalidação, para a liberação de lotes de produtos, certos procedimentos devem ser realizados para garantir que os métodos são aplicáveis na sua utilização e pode ser necessário confirmar a precisão do método ou a sua confiabilidade em atingir os níveis de detecção do método validado.

A poliomielite (do grego *pólios*, cinzento, e *myelos*, medula espinhal) é uma doença infecto-contagiosa de origem viral aguda causada por poliovírus. Dois tipos de vacina contra a poliomielite estão disponíveis atualmente: uma em que o vírus está inativo que é a vacina contra a pólio inativada (IPV), originalmente desenvolvida em 1955 por Jonas Salk, e uma vacina oral de vírus vivo atenuado (OPV), desenvolvida por Albert Sabin, em 1961. Ambas as vacinas são muito eficazes contra os três sorotipos de poliovírus¹⁷.

No ensaio de potência da OPV, trivalente atenuada, o tipo utilizado no Brasil, tanto o conteúdo de vírus total, quanto os sorotipos, separadamente, são determinados em um ensaio *in vitro*, utilizando células da linhagem Hep2C, sendo o título viral expresso em \log_{10} CCID₅₀ (*Cell Culture Infectious Dose 50%* em logaritmo base 10) por dose. As titulações individuais dos sorotipos, utilizando misturas de soros tipo-específicos, devem ser realizadas pelo fabricante e pelo LNC para a liberação de lotes da vacina. Para cada ensaio de OPV deve-se incluir um frasco com uma preparação de referência de trabalho, cujo título tenha sido adequadamente estabelecido, para controlar a precisão e a reprodutibilidade do sistema de ensaios¹⁷. Segundo a OMS (Organização Mundial da Saúde)¹⁸, as vacinas de referência e teste devem apresentar variação máxima de título de $\pm 0,5 \log_{10}$; e o título esperado será baseado na média geométrica dos títulos de todos ensaios válidos da vacina de referência realizados antes do estudo de validação e os títulos encontrados para esta vacina devem estar dentro dos limites de confiança pré-estabelecidos para o teste.

A proposta desta pesquisa é avaliar novas abordagens para validação de métodos analíticos no ensaio de potência da vacina oral contra Poliomielite, levando em conta a maior variabilidade de ensaios biológicos, com a finalidade de demonstrar que o ensaio apresenta exatidão e precisão satisfatórias para a quantificação da potência de vacinas na liberação de lotes.

MATERIAL E MÉTODOS

Revisão de dados

O presente estudo foi dividido em duas fases de análise retrospectiva de dados, utilizando os dados brutos de um total de 17 ensaios de potência para cada um dos componentes de poliovírus da vacina (sorotipo 1, 2 e 3 e trivalente) realizados no período de 2008 e 2009 que utilizaram a vacina de referência em uso, lote 24-A.

A Fase 1 consistiu um pré-estudo, que utilizou os resultados de quatro ensaios e visou padronizar os títulos da vacina de referência de trabalho de OPV lote 24-A que, posteriormente, foram utilizados para avaliação da veracidade do ensaio na Fase 2, que consistiu no estudo de validação do ensaio de potência da OPV utilizando os resultados dos demais 13 ensaios de potência de rotina, visando à avaliação da veracidade, da precisão e da exatidão do ensaio utilizando as abordagens, tradicional e do Conceito do Erro Total. Os títulos originalmente calculados manualmente pelo método de Spearman e Karber^{19,20}, foram recalculados pelo método de probitos utilizando o *software* CombiStats²¹ para obtenção da CCID₅₀/dose em logaritmo base 10 (\log_{10} CCID₅₀), visando reproduzir uma estimativa de Spearman e Karber uma vez que a OMS recomenda este método estatístico para os cálculos da potência de OPV¹⁷, a utilização do CombiStats, produzido e validado pelo “*European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care*” (EDQM) para análise de dados estatísticos de ensaios biológicos de diluição ou de potência, de acordo com os métodos de cálculos descritos no capítulo 5.3 da Farmacopeia Europeia²², permitiu obter critérios de validade dos ensaios como inclinação e linearidade da curva dose resposta e intervalos de confiança de 95% das determinações de potência.

Os ensaios utilizados no estudo foram realizados seguindo os critérios da Norma ABNT ISO/IEC 17.025¹⁶, como qualificação de equipamentos e treinamento dos analistas e atenderam aos critérios para ensaios válidos descritos na Farmacopeia Brasileira²³.

Fase 1 - Padronização do título da vacina de referência lote 24-A

Para que fosse possível o cálculo da veracidade (bias) foi realizada a padronização do título da vacina de referência lote 24-A em \log_{10} CCID₅₀/dose, avaliada frente ao padrão internacional do NIBSC, para cada sorotipo viral, em 5 replicatas (n=5) em 4 sessões (k=4), obtendo-se um total de 20 resultados para cada tipo viral, os resultados em \log_{10} CCID₅₀ obtidos para cada tipo viral

nos diferentes ensaios foram combinados para obtenção de uma média ponderada²⁰ considerada o título padronizado, após a avaliação da homogeneidade dos resultados pelo teste C de Cochran^{24, 25} para possível existência de valores aberrantes. Os valores aberrantes seriam excluídos dos cálculos finais de título, caso ocorressem.

Fase 2 - Validação do Ensaio de Potência

Foram adotadas duas abordagens para a validação do ensaio: a abordagem Clássica ICH², aplicada aos ensaios biológicos de acordo com as recomendações descritas pela comissão da SFSTP⁴; e a abordagem do Conceito do Erro Total seguindo as recomendações também da SFSTP⁸, aplicadas como descrito por Hoffman e Kringle¹³ e Boulanger et al.¹².

Veracidade

Para avaliar a veracidade, inicialmente foi estabelecido o título em \log_{10} CCID₅₀/dose do lote de vacina de referência 24-A para cada componente viral. As médias ponderadas obtidas para cada componente viral, no estudo de estabelecimento da referência 24-A, foram utilizadas como valores esperados para o ensaio. O *bias*% (diferença percentual entre a média dos títulos observados expressa em \log_{10} CCID₅₀/dose e o título esperado expresso em \log_{10} CCID₅₀/dose) foi calculado para cada componente viral da vacina e o teste-t de Student foi usado para comparar as médias.

Os Critérios de aceitação da veracidade foram: a) na abordagem clássica ICH² o *bias* não poderia ser estatisticamente significativo no teste-t de Student ($\alpha = 0,05$)⁴; e b) na abordagem do conceito do Erro Total o *bias* não poderia ser maior que $\pm 20\%$.

Precisão

A precisão foi avaliada com os resultados de potência em \log_{10} CCID₅₀/dose, obtidos em 13 sessões de ensaios de rotina ($k = 13$) com duas replicatas por ensaio ($n = 2$) utilizando a vacina de referência lote 24-A. Os resultados foram submetidos ao teste C de Cochran, para avaliar se havia diferença significativa entre as variâncias e, posteriormente, à análise de variância de delineamento inteiramente casualizado (“one-way” ANOVA), sendo que os quadrados médios intra e entre-ensaios foram usados para obter estimativas das variâncias intra-ensaios, entre-ensaios e total (variância intra-ensaios + variância entre-ensaios), para determinar a repetitividade, a precisão enter-ensaios e a precisão intermediária, respectivamente. A ANOVA

serviu ainda para verificar se houve diferença significativa entre os resultados obtidos entre as replicatas (n) e as sessões de ensaio (k) e o Intervalo de confiança de 95% da precisão intermediária foi calculado, como recomendado pela SFSTP⁴, com duas replicatas ($n=2$) em uma repetição de ensaio ($k=1$), as mesmas condições de uso em rotina.

Os critérios de aceitação para a precisão foram definidos como: a) na abordagem clássica ICH, o limite de 95% de confiança para Precisão Intermediária não poderia ser maior que $\pm 0,5 \log_{10}$ CCID₅₀/dose, como preconizado para titulação de suspensões virais²⁶; e b) na abordagem do conceito do Erro Total o gCV% da Precisão Intermediária não poderia ser maior do que 20%.

Exatidão

Na abordagem do Conceito do Erro Total, segundo Hoffman e Kringle¹³, foi construído um Intervalo de conteúdo- β (Limite Inferior - LI, Limite Superior - LS) de 95%, com nível de confiança γ de 95%. O intervalo (LI, LS), que é calculado utilizando o *bias* e a precisão intermediária e demonstra a exatidão do método, foi comparado com os limites de aceitação adotados de $\pm 20\%$ (A, B), quando o intervalo (LI, LS) se apresentou completamente entre os limites de aceitação (A, B), o método foi aceito como exato; quando não, o método não foi aceito.

Critério de aceitação 4-6-20%

Foi avaliada a proporção de resultados de potência obtidos no estudo de validação pela vacina de referência 24-A, para cada componente viral que apresentou dentro do intervalo esperado para exatidão de $\pm 20\%$ para (A, B) visando determinar se o ensaio obedece ao critério de aceitação 4-6-15%, como descrito pelo FDA¹, adotando a variação máxima aceita de 20% (4-6-20). Este critério preconiza que pelo menos 4 (66,7%) em 6 ensaios apresentem resultados dentro da faixa de $\pm 20\%$.

Determinação da reprodutibilidade do ensaio

Uma vez que não foi realizado um estudo colaborativo convencional onde as mesmas amostras seriam analisadas em uma matriz de ensaios, nos dois laboratórios, como uma etapa adicional na validação do método, foi adotada uma abordagem prática na avaliação da reprodutibilidade (precisão entre laboratórios²), quando os resultados de potência de 39 lotes obtidos por um mesmo Laboratório Produtor e pelo INCQS foram comparados por meio da determinação da variação média entre os resultados dos dois laboratórios e para diferentes amostras

testadas. Isto foi realizado calculando a média das variâncias entre os resultados obtidos no INCQS e pelo produtor para determinação do Coeficiente de Variação geométrico²⁷. O mesmo critério de aceitação de 20% de variação máxima entre os resultados dos dois laboratórios foi usado, como na avaliação da precisão no Conceito do Erro Total.

Cálculo da Incerteza de Medição

Foi realizada uma avaliação do Tipo A da Incerteza Padrão Combinada (u_c) e da Incerteza Expandida (U) para o ensaio como descrito pela EURACHEM¹⁵. A Incerteza Expandida provê um intervalo que deve incluir o valor mensurando com um alto nível de confiança, sendo obtida por meio da multiplicação da u_c pelo fator de abrangência (K). Foi utilizado $K = 2$ para 26 amostras ($gl = 25$) garantindo 95% de nível de segurança.

RESULTADOS

Os resultados finais obtidos na padronização dos títulos dos componentes da vacina de referência lote 24-A podem ser observados na tabela 1. Não ocorreram valores aberrantes.

Abordagem clássica ICH

Veracidade

A Tabela 2 apresenta os resultados da avaliação da veracidade do método para os quatro componentes virais. Foi realizada uma comparação direta entre a média dos títulos em \log_{10} CCID₅₀/dose obtida para cada componente viral da vacina de referência 24-A com o título esperado para cada componente, determinado durante o estudo de padronização daquela vacina de referência (tabela 1). O teste-t de Student foi aplicado para verificar se houve diferença estatisticamente significativa entre as médias ($\alpha=0,05$, $gl=25$).

Tabela 1. Resultados obtidos nos ensaios de padronização do título da vacina de referência contra poliomielite oral lote 24-A para os quatro Componentes Virais

Componente Viral	Trivalente	Sorotipo I	Sorotipo II	Sorotipo III
Média Ponderada*	6,91	6,93	5,96	6,66
DP geral	0,053	0,581	0,064	0,059
gCV% intra (3 gl)	11,26	11,44	11,67	11,43
gCV% entre (16 gl)	10,29	10,19	10,56	10,31
P.I. (19 gl)	11,30%	11,46%	11,78%	11,47%

DP = desvio padrão; gl = graus de liberdade; gCV = coeficiente de variação geométrico; * \log_{10} CCID₅₀ = Cell Culture Infectious Dose 50%; P.I. = Precisão Intermediária

Tabela 2. Avaliação da Veracidade – Bias percentual e Teste-t de Student bi-caudal

	Trivalente	Sorotipo I	Sorotipo II	Sorotipo III
Média obtida	6,91	6,94	5,96	6,67
Título esp.	6,91	6,93	5,96	6,66
dp	0,069	0,053	0,050	0,054
Bias %	0,002	0,201	0,068	0,225
T _{calc}	0,01	1,35	0,41	1,43
N	26	26	26	26
gl	25	25	25	25
Conclusão	Satisf.	Satisf.	Satisf.	Satisf.

T_{crítico} = -2,06 a 2,06; $\alpha = 0,05$; $t = 0,975$; Título esp. =

Título esperado; dp = desvio padrão; gl = graus de liberdade;

T_{calc} = T calculado; N = número de ensaios; Satisf. = Satisfatória

Precisão

Os resultados obtidos nos ensaios para cada componente viral foram avaliados e considerados homogêneos pelo teste de Cochran com $p=0,05$, o que permitiu a realização da análise de variância, que demonstrou que não houve variação significativa entre as replicatas (n) e dentro as sessões (k) de ensaios. Assim, usando os dados da precisão, foram calculadas a repetitividade (gCV% intra) e precisão entre ensaios (gCV% entre), para os quatro componentes virais, que puderam ser combinadas para obtenção da precisão intermediária e um intervalo de confiança de 95% foi construído, com base no número de sessões (k) e de replicatas (n) por sessão, para o desenho de ensaio de rotina com uma sessão (k) e duas replicatas (n) e comparado com o intervalo esperado de $\pm 0,5 \log_{10}$ CCID₅₀/dose como recomendado em ICH Q5A R1²⁴. A tabela 3 apresenta as médias gerais, a precisão intra e entre-ensaios, a precisão intermediária e os intervalos de confiança, calculados para $n=2$ e $k=1$, para cada componente viral da vacina.

Conceito do Erro Total

Veracidade

A tabela 4 apresenta os resultados da avaliação da veracidade do método para os quatro componentes virais utilizando a abordagem do Erro Total. Foi realizada uma comparação direta entre a média dos títulos em \log_{10} CCID₅₀/dose obtida para cada componente viral da vacina de referência 24-A com o título esperado para cada componente, determinado durante o estudo de padronização daquela vacina de referência. Os resultados obtidos não poderiam ser menores do que o limite de aceitação de $\pm 20\%$ para o bias.

Tabela 3. Análise estatística dos resultados do ensaio de potência da OPV para os quatro componentes virais na avaliação da Precisão

Componente Viral	Trivalente	Sorotipo I	Sorotipo II	Sorotipo III
Média Geral (log ₁₀ CCID ₅₀ /dose)	6,91	6,94	5,96	6,67
DP geral	0,07	0,05	0,05	0,05
gCV% intra (12 gl)	11,97	11,27	11,02	11,19
gCV% entre (13 gl)	11,82	10,47	11,36	11,09
P.I. (25 gl)	12,78	11,36	11,74	11,65
IC 95% P.I. (n=2 e k = 1) log ₁₀ CCID ₅₀	±0,19	±0,09	±0,13	±0,12
Limite de aceitação log ₁₀ CCID ₅₀	±0,5			

CCID₅₀ = Cell culture infectious dose 50%; n = n° de replicatas por ensaio; k = n° de sessões (corridas) de ensaios; DP = desvio padrão; gl = graus de liberdade; gCV = coeficiente de variação geométrico; P.I. = precisão intermediária; IC95% = intervalo de confiança de 95%

Tabela 4. Avaliação da veracidade (bias%), da precisão e da exatidão para o ensaio de potência da OPV para os quatro componentes virais utilizando o conceito do Erro Total com nível de conteúdo β de 95% e Nível de confiança γ de 95% para 26 resultados

	Trivalente	Sorotipo I	Sorotipo II	Sorotipo III
Média	6,91	6,94	5,96	6,67
Título esp.	6,91	6,93	5,96	6,66
dp	0,0695	0,0527	0,0501	0,0536
Intervalo β abs	6,72 - 7,10	6,79 - 7,09	5,81 - 6,12	6,52 - 6,83
Intervalo β %	-2,8 a 2,8	-2,0 a 2,4	-2,5 a 2,6	-2,2 a 2,6
GL	25	25	25	25
Lim. Aceit. (A, B)	±20%	±20%	±20%	±20%
Bias %	0,002	0,201	0,068	0,225
gCV% P.I.	18,88	14,60	14,29	15,22
Conclusão	Exato	Exato	Exato	Exato

Título Esp. = Título Esperado; dp = desvio padrão; gCV% = Coeficiente de Variação geométrico %; Intervalo β = intervalo de conteúdo β; abs = valores absolutos; GL = graus de liberdade; Lim. Aceit. = Limites de aceitação; P.I. = Precisão Intermediária

Tabela 5. Análise estatística das diferenças entre os resultados de potência do Laboratório Produtor e do INCQS para 39 lotes de OPV

Componente	Trivalente	Sorotipo I	Sorotipo II	Sorotipo III
Diferença média	0,170	0,044	0,061	0,339
LSC _{95%}	0,302	0,106	0,168	0,548
LIC _{95%}	0,038	-0,019	-0,047	0,130
KS	0,367	0,619	0,347	0,100
N	39	39	39	39
DP	0,0726	0,0413	0,0581	0,1391
gCV%	13,62	11,13	11,44	17,89

gCV% = Coeficiente de Variação geométrico; KS = Teste de Kolmogorov Smirnov para distribuição normal (α>0,05); DP = Desvio padrão; LIC, LSC = limites inferior e superior de confiança 95%; N = número de ensaios

Precisão

A tabela 4 apresenta os resultados da avaliação da precisão do método para os quatro componentes virais. Os resultados foram obtidos em 13 sessões de ensaios de rotina (k =13), com duas replicatas por ensaio (n = 2) e utilizando a vacina de referência lote 24-A. O Coeficiente de Variação geométrico da Precisão Intermediária não poderia ser maior do que 20%.

Exatidão

O intervalo de conteúdo-β calculado foi comparado com os limites esperados (A, B) de ±20%, devendo situar-se dentro estes limites.

Critério de aceitação 4-6-20%

Foi avaliada a porcentagem de resultados dentro do intervalo esperado (A, B) para exatidão de ±20% para cada um dos componentes virais. A proporção foi superior aos 66,7% preconizados em todos os resultados (100% Trivalente, 100% Tipo I, 100% Tipo II e 95,83% Tipo III).

Reprodutibilidade

Foi calculada utilizando a média das variâncias entre os resultados de potência obtidos pelo INCQS e pelo Laboratório Produtor. A tabela 5 demonstra a análise estatística das diferenças absolutas entre os resultados obtidos pelo INCQS e pelo laboratório Produtor para a potência em log₁₀ CCID₅₀/dose de 39 lotes da OPV de todos os quatro componentes virais. O Coeficiente Geométrico de variação entre os resultados destes dois laboratórios, para o componente trivalente, foi 13,62%, a diferença média 0,170 (IC95% 0,038 a 0,302) e o desvio padrão 0,0726.

Incerteza de Medição

A Incerteza Padrão Combinada (u_c) e a Incerteza Expandida (U) para os diferentes componentes virais foram: Trivalente ($u_c = 0,0113$; $U = \pm 2,26\%$); Tipo I ($u_c = 0,0074$; $U = \pm 1,49\%$); Tipo II ($u_c = 0,0070$; $U = \pm 1,41\%$); e Tipo III ($u_c = 0,0073$; $U = \pm 1,47\%$).

DISCUSSÃO

Este estudo foi realizado para a validação do ensaio de potência de OPV. As principais características avaliadas no estudo de validação, por se tratar de um ensaio quantitativo, foram a veracidade, precisão e a exatidão, avaliadas pela abordagem clássica ICH² e pela aplicação do conceito do Erro Total⁸; foram ainda avaliadas a adequação ao critério de aceitação da exatidão 4-6-15 descrito pelo FDA¹, adotando a variação máxima aceita como 20% (4-6-20) e em uma abordagem prática, a média das variâncias entre os resultados obtidos no INCQS e no laboratório produtor (por amostra), foi utilizada para calcular o gCV% geral para determinar a reprodutibilidade do ensaio.

A interpretação do guia ICH² é confusa, misturando a avaliação do erro sistemático, representada pelo critério de veracidade, com a avaliação do Erro Total representada pelo critério da Exatidão³. A Norma ISO 5725⁷ provê uma definição adequada para a determinação da exatidão de métodos quantitativos, definido como a soma da veracidade e da precisão. Esta abordagem para validação e transferência de métodos analíticos é chamada de “Conceito do Erro Total”.

A avaliação da veracidade com a abordagem do conceito tradicional ICH² demonstrou que não houve diferença significativa entre as médias dos títulos obtidos no ensaio de validação e o valor esperado em nenhum dos quatro componentes virais (bias apresentada: Trivalente = 0,002%; Tipo I = 0,201%; Tipo II = 0,068%; Tipo III = 0,225%) quando testados com o teste t de Student como recomendado pela SFSTP⁴. Desse modo, nosso estudo demonstrou que o ensaio de potencia para OPV apresentou veracidade satisfatória. Embora os ensaios para todos os componentes tenham apresentado bias satisfatório, a faixa de aceitação deste parâmetro pelo teste t de Student é muito estreita e aceitou diferenças apenas da ordem de $\pm 0,02 \log_{10}$ CCID₅₀/dose, nas condições obtidas no estudo, corresponderam a um bias% de 0,34%. Gibelin et al.³ adotaram como critério de aceitação $\pm 0,2 \log_{10}$ CCID₅₀/dose para avaliação da

exatidão, seguindo a abordagem clássica da ICH. Embora os autores não tenham escalarecido no trabalho publicado o porquê da adoção deste valor, ele correspondeu a um bias de $\pm 2x$ desvio padrão da Precisão Intermediária, que é uma abordagem alternativa, mais coerente resultando em menor reprovação de ensaios satisfatórios. Também com esta finalidade, a OMS¹⁸ estabelece que uma variação de $\pm 0,5 \log_{10}$ é satisfatória entre titulações de vacinas contra pólio oral.

Apesar de na abordagem convencional ICH² os critérios de aceitação pré-estudo para métodos bioanalíticos requererem, dentro da avaliação da exatidão, que a média observada esteja entre $\pm 15\%$ do valor nominal⁸.

Nossos resultados mostram que, quando aplicado o conceito do Erro Total para o cálculo da Exatidão, os ensaios de potencia para os quatro componentes virais foram considerados exatos por apresentarem intervalos de confiança (Trivalente, -2,8 a 2,8%; Tipo I, -2,0 a 2,4%; Tipo II, -2,5 a 2,6%; Tipo III, -2,2 a 2,6%) menores que os limites esperados (A, B) de $\pm 20\%$.

Boulanger et al.⁹, descrevem que estes limites esperados devem ser ligados às normas utilizadas para o ensaio e descrevem os valores utilizados na rotina de 1% ou 2% no granel, 5% em especialidades farmacêuticas, 15% em amostras clínicas, 30% para ensaios de ligação como Radio Imuno Ensaio e ELISA etc. No entanto, a OMS²⁸ descreveu que ensaios de ligação têm, em geral, uma variabilidade de 5 a 20%, enquanto ensaios em animais ou células podem ter uma variabilidade maior do que 50%.

Aplicando o conceito do Erro Total Gibelin et al.³, adotaram os limites de aceitação de $\pm 30\%$ do valor de referência para os valores de concentração das amostras expressos em \log_{10} CCID₅₀/ml para um ensaio de titulação viral em cultivo celular, porém do tipo ensaio de ligação.

O ICH Q5A R1²⁴, para avaliação de segurança de produtos biotecnológicos que utilizam vírus, estabelece que para a aceitação da precisão de métodos, o limite de 95% de confiança para precisão intermediária deve ser menor ou igual a $\pm 0,5 \log_{10}$ CCID₅₀/dose. Com o intuito de avaliar a Precisão Intermediária foram calculados, para cada componente viral, os intervalos de confiança para uma sessão de ensaio ($k=1$) com duas replicatas ($n=2$) e com o desenho usado na rotina. Os resultados obtidos foram $\pm 0,19 \log_{10}$ CCID₅₀/dose para o componente Trivalente, $\pm 0,09 \log_{10}$ CCID₅₀/dose para o componente Tipo I, $\pm 0,13 \log_{10}$ CCID₅₀/dose para o componente Tipo II e $\pm 0,12 \log_{10}$ CCID₅₀/dose para o componente Tipo III. É possível

notar, por meio da análise de variância, que não houve diferença significativa entre os resultados de replicatas (n) e de sessões (k) para o ensaio de potencia de nenhum dos componentes virais. Em caso de necessidade de repetições para obtenção de maior precisão, tanto poderia ser aumentado o número de replicatas por ensaio, quanto o número de repetições de ensaios.

Os resultados demonstraram que todos os intervalos de confiança de 95%, calculados para a Precisão Intermediária dos quatro componentes virais, foram inferiores a $\pm 0,5 \log_{10}$ CCID₅₀/dose, critério recomendado pela ICH Q5A R1²⁴ como satisfatória para titulações *in vitro* de vírus. Portanto, a precisão do ensaio pode ser considerada satisfatória para a intenção de uso (determinação da potência de vacinas contra Poliomielite por meio da determinação do título viral em \log_{10} CCID₅₀/dose).

A utilização da abordagem do Erro Total, para validação, requer que se escolham os níveis apropriados de conteúdo (β), nível de confiança (γ) e os limites de aceitação; normalmente são usados para ensaios bioanalíticos, 66,7% de conteúdo, 90% de confiança e $\pm 15\%$ de limites de aceitação, que se baseiam nas recomendações do FDA¹. Porém, Boulanger et al.¹² consideram a utilização de níveis de conteúdo de 66,7% inapropriados e para garantir que 90% das corridas sejam aceitas, quando o processo de medida continua válido, os níveis de conteúdo devem ser de no mínimo 80%, tornando as normas de decisão mais consistentes.

No presente estudo, foram adotados os níveis de conteúdo e de confiança de 95%, mais comumente utilizados em estudos biológicos e os mesmos usados por Gibelin et al.³ para a validação de um ensaio de detecção de atividade viral em células, porém com um limite de aceitação A e B de 20%, enquanto os autores escolheram 30%, como sugerido para o sistema de detecção de ensaios de ligação de antígenos, ensaio utilizado no referido estudo. Os resultados demonstraram uma variabilidade menor no ensaio de potência para OPV quando comparados aos encontrados por Gibelin et al.³ para a detecção do Vírus da Leucose Aviária durante o processo de produção de vacina contra este vírus.

Os coeficientes de variação calculados para a Precisão Intermediária de 18,88% (Trivalente), 14,60% (Sorotipo I), 14,29% (Sorotipo II) e 15,22% (Sorotipo III) foram menores que os limites de aceitação de $\pm 20\%$. Desse modo, os ensaios para os quatro componentes virais podem ser considerados com precisão satisfatória

para a intenção de uso, determinação da Potência de Vacina Oral contra Póliomielite.

A Incerteza Expandida (U) dos resultados foi calculada utilizando um fator $K = 2^{15}$, que representa um intervalo que envolve os resultados no qual o valor verdadeiro desconhecido deve estar compreendido com uma confiança de 95%. A maior Incerteza encontrada nos ensaios foi a determinação do título Trivalente, $\pm 2,26\%$. Então, quando o ensaio for realizado na rotina para este componente, a Incerteza dos resultados será, de no máximo, $\pm 2,26\%$.

A avaliação da reprodutibilidade, utilizando a variância entre os resultados obtidos por um mesmo laboratório produtor e pelo INCQS para a potência dos quatro componentes virais em \log_{10} CCID₅₀/dose para 39 lotes de OPV, apresentou Coeficiente de Variação geométrico inferior ao limite de aceitação de 20% para os quatro componentes virais, assim como a média das diferenças entre os títulos, que também se apresentou sempre inferior à $\pm 0,5 \log_{10}$, o que constitui uma variação entre resultados de ensaios aceita pela OMS¹⁸.

CONCLUSÃO

Os critérios de aceitação da *Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques* (SFSTP)⁴ para o conceito do Erro Total para validação de métodos apresentam vantagens sobre os critérios baseados na estimação de pontos para avaliar a veracidade e precisão e demonstrar a exatidão, principalmente na validação de ensaios biológicos. A abordagem do intervalo de confiança provê maior controle dos riscos associados em aceitar um procedimento inadequado e rejeitar um método satisfatório.

O ensaio de potência para OPV apresentou os critérios de veracidade, repetitividade, precisão entre-ensaios, precisão intermediária e reprodutibilidade satisfatórios, ou seja, é um método exato, confiável e conveniente para avaliar a potência destas vacinas.

REFERÊNCIAS

1. US Department of Health and Human Services. US Food and Drug Administration - FDA. Center for Biologics Evaluation and Research - CBER. Guidance for industry: bioanalytical method validation. Rockville; 2001.
2. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for registration of Pharmaceuticals for Human Use, Topic Q2 (R1): Validation of analytical procedures: text and methodology. Geneva; 2005.

3. Gibelin N, Dupont D, Imbert S, Rozet E. Use of Total Error concept in the validation of viral activity in cell cultures. *J Chromatogr B*. 2009;877:2407-11.
4. Societé Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques – SFSTP. Commission report. Raymond B, Gaillandre A, Gibelin N, Maignan N, Michalski C, Nabet P, et al. Guideline for the validation of biological assay methods. *STP Pharma Pratiques*. 2005;15(5):364-83.
5. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 2 jun. 2003.
6. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - INMETRO (Rio de Janeiro, Brasil). Vocabulário Internacional de Metrologia: Conceitos Fundamentais e Gerais e Termos Associados (VIM 2008), Tradução autorizada - JCGM 200:2008. Rio de Janeiro; 2008.
7. ISO 5725, Application of the statistics-accuracy (trueness and precision) of the results and methods of measurement-Part 4, Basic methods for the determination of the trueness of a standard measurement method, International Organization for Standardization (ISO). Geneva; 1994.
8. Chapuzet E, Mercier N, Bervoas-Martin S, Boulanger B, Chevalier P, Chiap P, et al. Méthodes chromatographiques de dosage dans les milieux biologiques: Stratégie de validation Rapport d'une commission SFSTP. *STP Pharma Pratiques*. 1997;7:169-94.
9. Hubert Ph, Nguyen-Huu JJ, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures A SFSTP proposal: part I. *J Pharm Biomed Anal*. 2004;36:579-86.
10. Mee RW. β -Expectation and β -Content Tolerance Limits for Balanced One-Way ANOVA Random Model. *Technometrics*. 1984;26(3):251-4.
11. Feinberg M, Boulanger B, Dewe W, Hubert P. New advances in method validation and measurement uncertainty aimed at improving the quality of chemical data. *Anal Bioanal Chem*. 2004;380:502-14.
12. Boulanger B, Dewé W, Gilbert A, Govaerts B, Maumy M. Risk management for analytical methods: conciliating objectives of validation phase and routine decision rules. *Chem Intell Lab Sys*. 2007;86:198-207.
13. Hoffman D, Kringle R. A Total Error Approach for the Validation of Quantitative Analytical Methods. *Pharm Res*. 2007;24(6):1157-63.
14. Eurachem. CITAC Guide CG4: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, English edition, 2^a ed. Prague; 2000.
15. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - INMETRO (Rio de Janeiro, Brasil). A estimativa da incerteza de medição pelos métodos do ISO GUM 95 e de simulação de Monte Carlo, DIMEC, nt-02/2008. Rio de Janeiro; 2008.
16. Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT (Rio de Janeiro - Brasil) NBR ISO/IEC 17.025:2005: Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro; 2005.
17. World Health Organization - WHO. Polio Laboratory Manual, 4^a ed. Geneva; 2004.
18. World Health Organization - WHO. Manual of Laboratory Methods for testing of vaccines used in the WHO Expanded Programme on Immunization, Live Oral Polio Vaccine. Geneva; 1997. p.59-64. (WHO/VSQ/97.04).
19. Spearman C. The method of “right and wrong” cases (Constant Stimuli) without Gauss's Formulae. *Br J Psychol*. 1908;2:227-42.
20. Karber G. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Archiv fur Experimentelle Pathologie und Pharmakologie*. 1931;162:480-7.
21. CombiStats v4.0 [homepage na internet], EDQM: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare – Council of Europe. Disponível em: www.combistats.eu
22. Council of Europe. Chapter 5.3 - Statistical analysis of results of biological assays and tests. In: *The European Pharmacopoeia*. 6^a ed. Strasbourg; 2008. p.571-600.
23. Farmacopéia Brasileira, 4^a ed. fasc. 5, São Paulo: Atheneu, 2003.
24. Cochran WG. The distribution of the largest of a set of estimated variances as a fraction of their total. *Ann Eugen (London)*. 1941;11:47-52.
25. Cochran WG. Testing a linear relation among variances. *Biometrics* 1951;7:17-32.
26. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for registration of Pharmaceuticals for Human Use, Topic Q5A (R1): viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin. Geneva; 1999.
27. Kirkwood TBL. Geometric mean and measures of dispersion. *Biometrics*. 1975;35:908-9.
28. World Health Organization - WHO. Validation. Chp. 15, Validation of analytical assays. In: *WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements*. Part 2. Geneva; 1997.p.65-73.

Isolamento de micobactérias provenientes de amostras clínicas da região de Rio Claro: análise da frequência

Mycobacterial isolates from patients clinical samples from Rio Claro region: frequency analysis

RIALA6/1421

Ariane Christine Degasperi BERTOLETTI¹, Kaizer José Ferreira ALVES¹, Erica CHIMARA^{2*}, Dalva Cristina Girello AILY¹

*Endereço para correspondência: ²Núcleo de Tuberculose e Micobacterioses, Centro de Bacteriologia, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 351, 9º andar, Cerqueira Cesar, São Paulo/SP, CEP 01246-902. Fone: (11) 3068-2895. e-mail: echimara@ial.sp.gov.br

¹Centro de Laboratório Regional de Rio Claro VII, Instituto Adolfo Lutz

Recebido: 03.06.2011 - Aceito para publicação: 22.12.2011

RESUMO

Os agentes etiológicos da tuberculose pertencem ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MT), porém outras espécies do gênero e de importância médica, denominadas micobactérias não causadoras de tuberculose (MNT), são frequentemente isoladas. A identificação correta e rápida das MNT é obrigatória para o diagnóstico, auxiliando o clínico na conduta terapêutica. A frequência da MT e MNT foi avaliada no período de 2003 a 2009, analisando-se 6.460 amostras clínicas, sendo 5.696 (88,2%) culturas negativas para micobactéria, 715 (11,1%) culturas positivas e 49 (0,7%) não avaliadas. Os isolados mais frequentes foram MT 78,6% (562). Dentre as MNT, a espécie mais isolada foi *M. gordonae* em 3,09% (22) das amostras, seguida por *M. fortuitum* em 2,39% (17), Complexo *M. avium* (MAC) em 2,25% (16), *M. kansasii* em 1,97% (14) e *M. abscessus* em 1,83% (13). Quando relacionado ao número de pacientes, o complexo MAC foi o mais isolado (19,4%). Foi observado um declínio na frequência de isolamento de MT no período estudado, enquanto a frequência de MNT teve um aumento de 22,8%. A alta frequência de MT nas amostras é uma constante preocupação para a saúde pública, mas o aumento de doentes com MNT salienta a importância da notificação e do monitoramento epidemiológico desses pacientes.

Palavras-chave. *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculose, micobactérias não causadoras de tuberculose, micobacterioses.

ABSTRACT

The etiologic agents of tuberculosis belong to *Mycobacterium tuberculosis* Complex (MT), but other pathogenic species of the same genus known as Nontuberculous Mycobacteria (NTM) are often isolated. The rapid and accurate identification of these organisms is mandatory for diagnosing, and supporting the clinician for accurate treatment. Aiming to evaluate the frequency of MT and NTM, during 2003 to 2009, 6,460 samples were analyzed, being 5,696 (88.2%) negative for mycobacteria, 715 (11.1%) positive and 49 (0.7%) no identification was done. The MT isolates were most frequent, 78.6% (562). Among the NTM, the most isolated specie was the *M. gordonae* 3.09% (22), followed by *M. fortuitum* 2.39% (17), *M. avium* Complex (MAC) 2.25% (16), *M. kansasii* 1.97% (14) and *M. abscessus* 1.83% (13). However, the MAC was the mostly isolated (19.4%) when they were associated with the number of patients. A decline in the frequency of MT isolation was observed for the studied period, while the frequency of NTM has increased by 22.8%. The high frequency of MT isolation from clinical samples is a steady concern of public health, but the increase of the number of patients with MNT emphasizes the relevance of the notification and the epidemiological monitoring of these patients.

Keywords. *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculosis, nontuberculous mycobacteria, mycobacterium infections.

INTRODUÇÃO

Apesar do crescimento e do investimento nos programas de saúde pública, o aumento de casos de tuberculose (TB) e, principalmente, de micobacterioses tem surpreendido pesquisadores e profissionais da área da saúde. Nas últimas décadas, a incidência da tuberculose nos países desenvolvidos e em desenvolvimento tem aumentado devido à deterioração dos serviços públicos de saúde, pobreza e migração. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS)¹, cerca de oito milhões de pessoas contraem a doença a cada ano e três milhões morrem em decorrência dela e 95% dos casos ocorrem nos países em desenvolvimento. No Brasil, em 2009, houve 71.640 casos novos notificados, sendo que o Estado de São Paulo foi responsável por cerca de 15.600 notificações naquele ano, o maior contingente de casos no Brasil em números absolutos. O Estado de São Paulo possui cerca de 18.000 casos novos de tuberculose por ano, com incidência de 30/100.000 casos/habitante no interior do estado, região onde se localizam os municípios que compõem a Divisão Regional de Saúde X de Piracicaba². No Brasil, a tuberculose é a quarta causa de mortalidade por doenças infecciosas e a primeira entre os pacientes com AIDS³ e no Estado de São Paulo 75% dos casos de tuberculose pulmonar são de pacientes HIV positivos². A doença é causada pelas espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis* – MT (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. caprae*, *M. microti* e *M. pinipedii*)⁴.

Assim como as espécies de MT, outras micobactérias de importância médica estão sendo frequentemente isoladas, como as denominadas micobactérias não causadoras de tuberculose – MNT, agentes de micobacterioses⁵. Dentre as espécies de MNT clinicamente importantes estão as do Complexo *Mycobacterium avium* – MAC (*M. avium*, *M. avium* subespécie *paratuberculosis*, *M. intracellulare* e *M. scrofulaceum*), *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium chelonae* e *Mycobacterium abscessus*⁶. No Brasil, nos últimos seis anos, muitos surtos causados por MNT de crescimento rápido foram descritos⁷. Estes organismos podem contaminar equipamentos médicos, causando infecções nosocomiais e surtos, os quais apontam como causas instrumentos cirúrgicos contaminados, soluções, próteses e instrumentos de limpeza⁸. Atualmente, existem mais de 160 espécies e subespécies de micobactérias oficialmente aceitas, que ocorrem naturalmente em diversos reservatórios ambientais⁹. Uma vez que o tratamento e a epidemiologia

das micobacterioses diferem significativamente da tuberculose, a identificação da espécie é importante para o estabelecimento da correlação clínico-laboratorial, que possibilitará o correto diagnóstico das micobacterioses, especialmente em populações com alta prevalência de tuberculose e co-infecção tuberculose e HIV¹⁰⁻¹².

Critérios internacionais, como os recomendados pela *American Thoracic Society* (ATS), estabelecem o diagnóstico destas infecções, enfatizando o isolamento da mesma espécie de micobactéria em repetidas amostras biológicas, obtidas de sítios não estéreis, ou a obtenção de cultivo puro de amostras de sítios estéreis¹³. A diversidade de espécies de MNT isoladas mostra que o diagnóstico da doença por MNT exige muita cautela, pois o seu isolamento de espécimes clínicos não estéreis pode significar colonização transitória ou contaminação¹².

A capacidade das MNT em produzir doença está claramente documentada na literatura e sua importância vem aumentando progressivamente. Até 1980, a maioria dos casos descritos sobre infecções causadas por MNT eram doenças pulmonares, principalmente por *M. kansasii* e MAC, e outras doenças cutâneas. Após 1980, houve um aumento nas taxas de isolamento das MNT, com grande contribuição da pandemia de AIDS¹⁴. Porém os dados sobre a frequência das espécies e a prevalência da doença não são conhecidos, uma vez que as micobacterioses não são de notificação compulsória¹⁵. A partir de 2009, apenas os casos de micobactérias de crescimento rápido começaram a ser notificados, por efeito da Resolução da ANVISA RDC nº 08, de 27 de fevereiro de 2009¹⁶. Mas estes dados são insuficientes para mostrar o panorama das micobacterioses no Brasil.

Desse modo, muitos estudos em diferentes países estão sendo realizados no intuito de mostrar que as micobacterioses estão se tornando um grave problema de saúde pública. Na Coreia do Sul, um estudo de 14 anos mostrou que houve um aumento das infecções pulmonares causadas por MNT, principalmente em pacientes imunocompetentes, sendo *M. avium* a espécie mais frequente¹⁷. Na Índia, foi realizada uma pesquisa de quatro anos em uma região endêmica de tuberculose caracterizando isolados tanto de espécimes pulmonares, quanto de extrapulmonares. De 133 isolados, 46% preencheram os critérios clínicos, radiológicos e microbiológicos para serem considerados casos de micobacterioses. Os demais isolados eram prováveis agentes de infecção ou somente colonização do material biológico¹⁸. Em Portugal, um levantamento de três

anos na cidade de Lisboa buscou identificar as espécies de MNT por meio de técnicas moleculares em cepas isoladas de 12 hospitais, evidenciando a importância do rápido diagnóstico destas micobactérias para a escolha da terapia adequada¹⁹. Arend e colaboradores²⁰ fizeram um levantamento de diversos estudos quanto ao diagnóstico e tratamento das micobacterioses pulmonares e destacaram que as infecções por MNT estão cada vez mais crescentes e que em alguns países podem superar os índices de prevalência da tuberculose.

A identificação da variabilidade de espécies de MNT, responsáveis por doenças pulmonares, está aumentando devido ao avanço no uso das técnicas moleculares²⁰. Arend e colaboradores²⁰ apontam a importância destas técnicas para regiões como a África, que apesar da elevada incidência de tuberculose, possui grande frequência de isolamento de MNT. A baciloscopia é o principal método diagnóstico utilizado e, em países que não possuem técnicas adequadas de identificação, as micobacterioses podem ser confundidas com a tuberculose²⁰. De acordo com Chung e colaboradores²¹, a história de tratamento prévio para tuberculose é mais frequente em pacientes com MNT ou tuberculose multidroga resistente, uma vez que a terapia é baseada na baciloscopia.

Frente a este cenário, o objetivo deste estudo foi identificar a frequência de isolamento de MT e MNT, avaliando a variabilidade de espécies isoladas de amostras clínicas de pacientes atendidos pelo Centro de Laboratório Regional de Rio Claro VII do Instituto Adolfo Lutz (CLRRC VII), no período entre janeiro de 2003 a dezembro de 2009.

MATERIAL E MÉTODOS

Os dados foram obtidos por meio de um estudo retrospectivo dos registros dos resultados de exames laboratoriais de pacientes sintomáticos respiratórios ou com micobacteriose extrapulmonar. As amostras foram enviadas ao Centro de Laboratório Regional de Rio Claro VII (CLRRC VII) do Instituto Adolfo Lutz (IAL), no período de janeiro de 2003 a dezembro de 2009, pelos municípios pertencentes à Divisão Regional de Saúde-X de Piracicaba (DRS-X) abrangendo 26 municípios, divididos em quatro colegiados gestores: Piracicaba; Rio Claro; Araras; e Limeira. Nos colegiados de Rio Claro e Piracicaba estão inclusos dados de duas Penitenciárias e um Centro de Ressocialização e um Centro de Detenção Provisório e um Centro de Ressocialização, respectivamente.

Os dados dos pacientes, assim como os resultados obtidos dos testes de identificação, foram transportados e armazenados no banco de dados do programa *Microsoft Access* e analisados pelo programa R²² por análise estatística descritiva.

No estudo foram verificados: número de amostras analisadas; idade e sexo dos pacientes; sítio de isolamento; número de culturas positivas para MT e MNT e resultado da identificação das espécies. Foi considerado somente o resultado de diagnóstico do paciente. Para pacientes com mais de um isolado analisado num período de 12 meses, foi considerado para o presente estudo somente o resultado do primeiro isolado.

As amostras clínicas analisadas foram: escarro; lavado brônquico; aspirado de abscesso; hemocultura; líquidos cefalorraquidiano e pleural e urina.

Os testes laboratoriais foram realizados pelas técnicas padronizadas de acordo com o Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias¹⁵: cultura das amostras submetidas à descontaminação pelo método de Petroff com cultivo em meio de Löweinstein Jensen (LJ) e pelo método MGIT-BD Manual (Becton Dickinson).

As culturas positivas foram enviadas ao Núcleo de Tuberculose e Micobacterioses do Instituto Adolfo Lutz Central (São Paulo) para identificação por meio de provas fenotípicas tradicionais e teste molecular pelo método *Polymerase Chain Reaction e Restriction Enzyme Analysis (PRA-hsp65)*²³.

Em atenção aos aspectos éticos e legais da pesquisa envolvendo seres humanos, preconizados pela resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz/SP, segundo o protocolo nº LR 2810/2010-IAL.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número total de pacientes sintomáticos respiratórios, cujas amostras foram consideradas com diagnóstico e que foram analisadas no período estudado, foi 6.460. A Tabela 1 mostra o número de amostras obtidas nos anos de 2003 a 2009, das quais 5.696 (88,2%) apresentaram resultado negativo para micobactéria na cultura e 715 (11,1%) resultado positivo. As culturas positivas foram encaminhadas ao IAL Central para realizar o teste de identificação e de sensibilidade. Destas,

49 (0,7%) não foram identificadas, pois 39 estavam contaminadas e 10 não apresentaram crescimento após novo cultivo para o teste de identificação. A contaminação pode ocorrer pelas condições de transporte das amostras clínicas e pela presença de organismos da microbiota normal humana que não foram eliminados pelos métodos de descontaminação. A ausência de crescimento pode ser explicada pelo isolamento de micobactérias fastidiosas, que necessitam de condições especiais para o crescimento e o subcultivo em meios comuns não permite seu crescimento. Por isso, estas amostras não foram consideradas para os cálculos de frequência.

Das culturas positivas, 562 (78,6%) foram identificadas como pertencentes ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MT) e 153 (21,4%) identificadas como MNT. Na Figura 1 pode ser observado o aumento da frequência do isolamento de MNT, que em 2003 era de oito isolados (9,1%) chegando em 2009 a 53 isolados (31,9%), um aumento de 22,8% em seis anos. Já os isolados de MT em 2003 eram 76 (86,4%) e em 2009 foram para 101 (60,8%), com uma diminuição proporcional no período estudado. Usando métodos moleculares para a identificação de MNT em amostras clínicas, no período de 2005 a 2009, em Lisboa (Portugal), Couto e colaboradores¹⁹ confirmaram o isolamento de 87,4% de MT e 12,6% de MNT, nas quais se obteve um aumento de 8,7% em 2005 para 15,2% em 2009, sendo o isolado mais frequente o *M. avium* (24,8%), seguido por *M. gordonae* (15,4%).

A frequência de todas as espécies isoladas está demonstrada na Tabela 2, sendo que as culturas que apresentaram resultado de identificação para as espécies *M. avium*, *M. avium* subespécie *paratuberculosis*, *M. intracellulare* e *M. scrofulaceum* foram agrupadas no Complexo *M. avium* (MAC) para fins de contagem²⁴. De todas as culturas positivas com resultado de identificação, a cultura de MT foi a mais frequente (78,6%). Dentre as espécies de MNT, a mais isolada foi *M. gordonae* (3,09%). Esse resultado difere das espécies de MNT que mais comumente causam infecções^{6,25,26} pois a *M. gordonae* é considerada saprófita e raramente patogênica, mas pode causar infecções pulmonares e cutâneas, principalmente em pacientes imunocomprometidos. O estudo realizado em um hospital pelo Departamento do Laboratório de Medicina, da Universidade Inje, na Coreia, destaca os crescentes casos de infecção nosocomial oportunistas por MNT. Um levantamento das espécies de MNT presentes na área hospitalar foi realizado e verificou-

Tabela 1. Resultados dos exames de cultura das amostras de pacientes sintomáticos respiratórios para diagnóstico de tuberculose e micobacteriose no período entre 2003 e 2009, Divisão Regional de Saúde X de Piracicaba

Resultado da cultura	Ano							Total (%)
	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	
Negativo	698	888	676	773	875	882	904	5696 (88,2)
Positivo	84	81	85	75	94	142	154	715 (11,1)
NR	4	2	3	6	12	10	12	49 (0,7)
Total	786	971	764	854	981	1034	1070	6460 (100)

NR= Culturas positivas em que não foi realizado teste de identificação

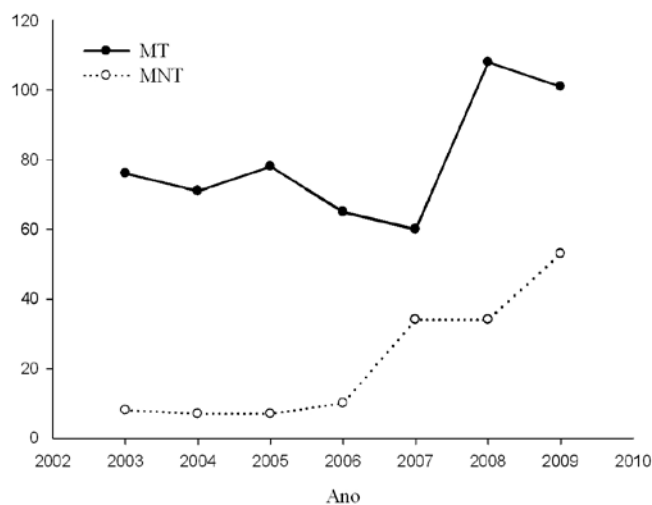


Figura 1. Frequência de isolados identificados como Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MT) e Micobactérias Não Tuberculosas (MNT) da Divisão Regional de Saúde X de Piracicaba no período de 2003 a 2009

se que, dentre as espécies saprófitas, a mais isolada foi *M. gordonae* (73,3%) e a *M. mucogenicum* (16,7%), entre as potencialmente patogênicas²⁷.

De acordo com Piersimoni e Scarparo²⁸ ainda não está claro se o aumento das MNT é devido a sua crescente prevalência no decorrer do tempo ou ao aprimoramento das técnicas de detecção e identificação. No IAL Rio Claro, a cultura líquida foi implantada a partir de 2007 e os dados obtidos na frequência de MNT mostram o aumento não somente na quantidade, como também na diversidade de espécies isoladas (Tabela 2). Nos anos de 2003 a 2006 a média de isolamento de MNT foi de 4,87%, chegando a 26,85% no período de 2007 a 2009. Isso mostra que, na região estudada, um dos motivos do aumento da frequência de MNT foi a implantação da cultura líquida no diagnóstico, uma vez que o método de identificação utilizado (PRA-*hsp65*) era o mesmo nos dois períodos estudados.

Tabela 2. Distribuição anual da frequência das espécies de micobactérias isoladas da Divisão Regional de Saúde X de Piracicaba, período de 2003 a 2009

Espécie	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	Total	%
CLA	0	0	0	1	0	0	0	1	0,14
<i>M. arupense</i>	0	0	0	0	0	0	1	1	0,14
<i>M. chelonae</i>	0	0	0	0	0	0	1	1	0,14
<i>M. flavescens</i>	0	0	0	0	1	0	0	1	0,14
<i>M. malmoense</i>	0	0	1	0	0	0	0	1	0,14
<i>M. mucogenicum</i>	0	0	0	0	1	0	0	1	0,14
<i>M. rhodesiae</i>	0	0	0	0	1	0	0	1	0,14
<i>M. shimoidi</i>	0	0	0	0	0	1	0	1	0,14
<i>M. smegmatis</i>	0	0	0	0	1	0	0	1	0,14
<i>M. smegmatis</i> , <i>M. mageritense</i> , <i>M. goodii</i> **	0	0	0	0	0	1	0	1	0,14
<i>M. terrae</i>	0	0	0	0	0	1	0	1	0,14
<i>M. chitae</i> , <i>M. mucogenicum</i> , <i>M. nonchromogenicum</i> **	0	0	0	0	0	1	1	2	0,28
<i>M. farcinogenes</i>	0	0	0	0	1	1	0	2	0,28
<i>M. gordonae</i> , <i>M. mageritense</i> , <i>M. smegmatis</i> **	0	0	0	0	0	0	2	2	0,28
<i>M. lentiflavum</i>	0	0	0	1	0	1	0	2	0,28
Presuntivo MNT	2	0	0	0	0	0	0	2	0,28
<i>M. intracellulare</i> , <i>M. chimaera</i> **	0	0	0	0	0	1	2	3	0,42
<i>M. szulgai</i>	1	0	0	0	1	1	0	3	0,42
<i>M. peregrinum</i>	0	1	0	0	2	0	1	4	0,56
Cultura mista*	0	2	0	0	0	2	2	6	0,84
<i>M. nonchromogenicum</i>	0	0	1	1	1	1	2	6	0,84
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	0	0	0	0	0	2	5	7	0,98
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	0	1	1	0	2	2	7	13	1,83
<i>M. kansasii</i>	3	1	0	0	3	4	3	14	1,97
MAC	2	1	1	1	5	1	5	16	2,25
CRA	0	0	0	0	5	2	10	17	2,39
<i>M. fortuitum</i>	0	1	1	1	5	4	5	17	2,39
<i>M. gordonae</i>	0	0	2	2	5	8	5	22	3,09
MT	76	71	78	65	60	111	101	562	78,51
Total	84	78	85	72	94	142	153	708	100,0

CLA= micobactéria de crescimento lento acromógena; CRA= micobactéria de crescimento rápido acromógena; CLE= micobactéria de crescimento lento escotocromógena; MT= Complexo *Mycobacterium tuberculosis*; MAC= Complexo *Mycobacterium avium*; MNT= micobactéria não causadora de tuberculose.

*Cultura mista com duas ou mais espécies de micobactéria.

**O método molecular chegou a um perfil comum a várias espécies.

Dentre as espécies mais frequentes estão a *M. fortuitum* (2,39%), o Complexo *M. avium* (2,25%), a *M. kansasii* (1,97%) e a *M. abscessus* (1,83%); todas classificadas como potencialmente patogênicas, de acordo com a literatura¹⁵. Porém, quando analisada a frequência de isolados relacionados ao número de casos¹³, obteve-se o total de 31 casos de micobacterioses: 6 (19,4%) MAC; 4 (12,9%) *M. kansasii*; 3 (9,7%) *M. fortuitum*; 3 (9,7%) *M. abscessus*; 2 (6,5%) *M. peregrinum*;

1 (3,2%) *M. nonchromogenicum*; 5 (16,1%) Micobactérias de Crescimento Rápido Acromógena (MCR); e 7 (22,6%) *M. abscessus* subsp. *bolletii*.

Pedro e colaboradores¹² fizeram um estudo das espécies de MNT isoladas da região de São José do Rio Preto no período de 1996 a 2005 e verificaram que as espécies mais frequentes foram as do Complexo *M. avium* (57,4%), seguidas por *M. gordonae* (10,4%) e *M. fortuitum* (7,9%). Na região da Baixada Santista, no período de 2000 a

2005, Zamarioli e colaboradores¹¹ identificaram com maior frequência 65 (33,6%) cepas de *M. kansasii*, 33 (17%) do Complexo *M. avium* e 26 (13,4%) de *M. fortuitum*. No levantamento da diversidade de MNT no Estado de São Paulo, as três espécies mais significativas identificadas foram as do Complexo *M. avium* (64,9%), *M. kansasii* (12,2%) e *M. gordonae* (10,2%)¹⁴. No estudo do Laboratório Central de Saúde Pública de Mato Grosso do Sul, Moraes e colaboradores²⁹ analisaram, nos anos 2003 e 2004, 15 MNT que foram identificadas como *M. avium* (8) e *M. fortuitum* (3), utilizando o método molecular PRA-*hsp65*. Todos estes estudos mostram que as espécies mais frequentes nos isolados foram *M. avium* e *M. kansasii*. Considerando a frequência das espécies de todos os isolados obtidos neste estudo (Tabela 2), o resultado dos estudos anteriores^{11,12,14,29} não foi observado no presente estudo, que detectou *M. gordonae* e *M. fortuitum* como as mais frequentes, padrão também observado em outros países.

Em um estudo realizado em uma região endêmica de tuberculose em Mumbai (Índia), Shenai e colaboradores¹⁸ analisaram 133 amostras, onde 127 foram confirmadas como MNT, sendo 81% de amostras pulmonares e 19% de amostras extrapulmonares. Entre as MNT de crescimento rápido, *M. fortuitum* (41%) e *M. abscessus* (59%) foram predominantes e entre as de crescimento lento, *M. intracellulare* (40%), *M. simiae* (35%), *M. kansasii* (6%), *M. gordonae* (4%), *M. szulgai* (2%) e *M. avium* (1%).

Salicio e colaboradores³⁰ isolaram 116 cepas de MNT e, seguindo os padrões internacionais para definição de micobacterioses, obtiveram repetidamente 46 episódios de isolamento de 42 pacientes. Diferente do que comumente é isolado, o agente mais frequente foi *M. xenopi* (16 casos), seguido por *M. avium* (12), *M. kansasii* (7), *M. fortuitum* (5), *M. malmoense* (2) e outras espécies com apenas um caso cada. Esses dados mostram que, além da grande variabilidade de espécies que são identificadas, existe uma predominância de espécies dependendo da região geográfica. Desse modo, no presente estudo, levantamos a hipótese de que a região possui um habitat mais favorável para as espécies de *M. gordonae* e *M. fortuitum*.

A frequência das amostras enviadas pelos municípios da DRSX ao CLRRCCVII, durante todo período de estudo, foi analisada e, para melhor interpretação, foram agrupados nos respectivos Colegiados Gestores e distribuídos anualmente. A Figura 2 representa a distribuição anual dos resultados de cultura, quantificando

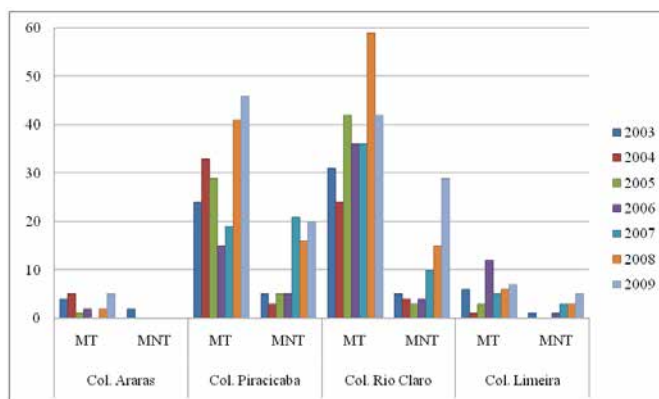


Figura 2. Frequência de isolados identificados como Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MT) e Micobactérias Não Tuberculosas (MNT) nos respectivos Colegiados Gestores da Divisão Regional de Saúde X de Piracicaba no período de 2003 a 2009

Tabela 3. Número de casos positivos de MT e MNT de detentos dos Centros de Ressocialização de Rio Claro e Piracicaba, Centro de Detenção Provisória de Piracicaba e Penitenciárias I e II de Itirapina, da Divisão Regional de Saúde X de Piracicaba, no período de 2003 a 2009

Município	Ano							Total
	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	
Piracicaba	1	8	2	4	7	11	21	54
Itirapina	19	10	16	17	15	28	30	135
Rio Claro	0	1	2	2	0	0	0	5
Total	20	19	20	23	22	39	51	194

MT= *Mycobacterium tuberculosis*; MNT= micobactéria não causadora de tuberculose

as amostras que foram positivas para MT e positivas para MNT provenientes de cada um dos Colegiados Gestores da DRS X. Além dos municípios desta região, foram consideradas oito análises provenientes do município de Tietê (SP), que estavam nos registros avaliados do CLRRCC VII, todas positivas para MT. Também foram consideradas mais oito amostras positivas para MT, cujo município não foi informado. Apesar do Colegiado de Piracicaba possuir o maior número de cidades da região (11 cidades), o Colegiado de Rio Claro (seis cidades) apresentou a maior frequência de isolamentos, representando 47,7% do total.

Na Tabela 3 estão apresentadas as amostras positivas para MT e MNT isoladas de pacientes sintomáticos respiratórios que vivem em confinamento. As amostras vieram dos Centros de Ressocialização de Rio Claro e Piracicaba, do Centro de Detenção Provisória de Piracicaba e das Penitenciárias I e II de Itirapina. A condição de vida desta população eleva o risco de infecção, devido à presença de pacientes

bacilíferos, como já demonstrado em literatura^{31,32}, por isso ocorre alta frequência de MT e/ou MNT neste grupo, considerando-se que o total de amostras positivas para tuberculose e micobacterioses foi de 715 e este grupo representa 27,13% das amostras positivas.

O sítio com maior frequência de isolamento foi o pulmonar, com 706 espécimes, sendo o escarro o material de maior isolamento com 501 (70,9%) MT e 126 (20,2%) MNT, totalizando 627 isolados, 87,7% do total. O outro material pulmonar foi o lavado brônquico, com 54 (68,4%) isolados de MT e 25 (31,6%) de MNT, totalizando 79 (11,0%) isolados. Os demais materiais analisados eram extrapulmonares (líquido pleural, líquido cefalorraquidiano, sangue, urina e aspirado de abscesso) correspondendo a 1,3% do total das amostras. Ueki e colaboradores¹⁴ e Pedro e colaboradores¹² também observaram que a maioria dos isolamentos foi de origem pulmonar.

Quanto à idade e gênero dos pacientes acometidos por tuberculose e micobacterioses, foram consideradas somente as amostras que apresentaram positividade para MT e/ou MNT, ou seja, 715 registros. A faixa etária mais frequente foi de 21 a 30 anos (26,1%), mas considerando também a faixa etária dos 31 aos 40 anos, os isolados totalizaram 47,6%. Estes grupos correspondem aos indivíduos que se encontram em sua fase economicamente mais produtiva, concorrendo para o incremento do ônus que a doença representa para os cofres públicos e para a sociedade^{33,34}. A idade máxima foi de 88 anos e mínima de 13 anos. Porém, a idade ou data de nascimento não informado nos registros de 87 pacientes, representou 12,2% do total de casos estudados. Esses dados poderiam mudar a faixa etária mais frequente se fossem contabilizadas as outras idades. Esse achado reforça a importância da informação correta de todos os dados do paciente para um levantamento epidemiológico mais preciso. Quanto ao gênero, 195 (27,3%) pertenciam ao gênero feminino e 520 (72,7%) ao gênero masculino. Analisando o gênero com relação ao grupo identificado, 60,0% dos pacientes masculinos tiveram isolamento de MT e 12,7% MNT. Dentre os pacientes femininos, 18,6% tiveram isolamento de MT e 8,7% MNT. Nogueira e colaboradores³² em João Pessoa (PB) e Zocche e Silva³³ no município de Tubarão (SC) também observaram dados semelhantes aos obtidos neste estudo. Vale ressaltar que dentre essas amostras estão agrupadas também as dos detentos, na grande maioria homens, o que pode gerar uma tendência para uma maior frequência do gênero masculino. Este fato pode explicar a maior frequência de homens com

MNT, dado que difere da literatura, que mostra uma maior frequência de mulheres com micobacterioses^{35,36}. Na Coréia do Sul, a idade média de pacientes acometidos por micobacterioses foi de 63 anos, sendo que dentre esses pacientes 43,8% eram homens e 56,2% mulheres¹⁷. Na Índia, dos 127 isolados estudados, 47% pertenciam ao gênero feminino e 53% ao masculino e 64% dos pacientes estudados apresentaram idade superior a 40 anos¹⁸.

CONCLUSÃO

A frequência de espécies do Complexo *M. tuberculosis* ainda é mais alta na região estudada do que a MNT. Porém, com o crescente número de indivíduos suscetíveis às infecções por micobactérias, como os indivíduos em tratamento de neoplasias, AIDS, transplantados e outros imunossuprimidos, a frequência dos casos de micobacterioses também aumenta ano a ano na região. O estudo observou um declínio na frequência de isolamento de MT no período estudado, enquanto a frequência de MNT teve um aumento de 22,8%. Neste estudo o sítio com maior frequência de isolamento foi o pulmonar, sendo o escarro o material de maior isolamento.

O presente estudo também demonstrou a predominância da tuberculose e micobacteriose em homens na faixa etária entre 21 e 40 anos, fase economicamente produtiva, que leva a um custo para a região, por perder mão de obra e gerar gastos com tratamento. Os dados também mostraram elevada frequência de MT e MNT isoladas de pacientes sintomáticos respiratórios que vivem em confinamento, pois só este grupo representou 27,13% de positividade.

Quanto à frequência das espécies de micobactérias, o maior número de isolados foi de *M. gordonae*, raramente patogênica ao homem. Apesar da indicação, por parte do presente estudo, de que a região analisada possui um habitat mais favorável para as espécies *M. gordonae* e *M. fortuitum*, ainda são necessários outros estudos para verificar esta hipótese. Ao verificar o número de casos em relação aos isolados obteve-se maior frequência das espécies do Complexo *M. avium*. Assim, com a dificuldade de se estabelecer o critério de doença para os isolados únicos de uma infecção respiratória por MNT, é necessário estar atento aos critérios internacionais, como os recomendados pela *American Thoracic Society* (ATS) para a classificação de uma micobacteriose pulmonar, indicando o tratamento específico aos pacientes, além da importância da notificação e monitoramento epidemiológico desses casos.

REFERÊNCIAS

1. Organização Mundial da Saúde - OMS. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. Geneva; 2006. [acesso 2010 Out 21]. Disponível em: [http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/index.html].
2. Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo - CVE. TB em números. Tuberculose em São Paulo. [acesso 2011 Set 26]. Disponível em: [http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/cve_tb.html].
3. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em Saúde. Série histórica da Taxa de Incidência de Tuberculose. Brasil, Regiões e Unidades Federadas de residência por ano de diagnóstico (1990-2009). [acesso 2010 Set 3]. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/incidencia_tabela2.pdf].
4. Almeida, EA. Sensibilidade de bactérias do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* as drogas antituberculosas avaliadas por duas metodologias em centro terciário de referência ambulatorial [tese de doutorado]. São Paulo (SP): Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2009.
5. Campos, HS. Manejo da doença micobacteriana não tuberculosa. *Bolet Pneumo Sanit*. 2000;8(2):07-14.
6. Seiscento M, Bombarda S, Castro A, Campos JRM, Teixeira L. Derrame pleural por micobactéria não tuberculosa. *J Bras Pneumol*. 2005;31(5):459-63.
7. Leão SC, Viana-Niero C, Matsumoto CK, Lima KV, 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.
8. Blossom DB, Alelis KA, Chang DC, Flores AH, Gill J, Beall D, et al. Pseudo-outbreak of *Mycobacterium abscessus* Infection Caused by Laboratory Contamination. *Infect Control Hosp Epidemio*. 2008;29(1): 57-62.
9. Euzéby JP. List of prokaryotic names with standing in nomenclature - LPSN. Formerly List of Bacterial names with Standing in Nomenclature. [acesso 2011 Set 9]. Disponível em: [http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html].
10. Coelho AGV, Zamarioli LA, Reis CMPV, Nascimento ACC, Rodrigues JS. Estudo comparativo entre um sistema de sonda genética e métodos clássicos na identificação das micobactérias. *J Bras Pneumol*. 2008;34(11):922-6.
11. Zamarioli LA, Coelho AGV, Pereira CM, Nascimento ACC, Ueki SYM, Chimara E. Estudo descritivo da frequência de micobactérias não causadoras de tuberculosas na Baixada Santista (SP). *J Bras Pneumol*. 2008;34(8):590-4.
12. Pedro HSP, Pereira MIF, Goloni MRA, Ueki SYM, Chimara E. Isolamento de micobactérias não tuberculosas em São José do Rio Preto entre 1996 e 2005. *J Bras Pneumol*. 2008;34(11):950-5.
13. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, et al. Mycobacterial Diseases Subcommittee; American Thoracic Society (ATS); Infectious Disease Society of America. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175:367-416.
14. Ueki SYM, Martins MC, Telles MAS, Virgilio MC, Giampaglia, CMS, Chimara E, et al. Micobactérias não tuberculosas: diversidade das espécies no estado de São Paulo. *J Bras Patol Med Lab*. 2005;41(1):1-8.
15. Ministério da Saúde (Brasília - Brasil). Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias. Brasília (DF): MS; 2008.
16. RESOLUÇÃO ANVISA - RDC nº 8, de 27 de fevereiro de 2009. LEGISLAÇÃO ANVISA - MS D.O.U. - Poder Executivo, de 02 de março de 2009.
17. Ryoo SW, Shin S, Shim M-S, Park Y-S, Lew WJ, Park S-N, et al. Spread of Nontuberculous Mycobacteria From 1993 to 2006 in Koreans. *J Clin Lab Anal*. 2008;22:415-20.
18. Shenai S, Rodrigues C, Mehta A. Time to identify and define non-tuberculous mycobacteria in a tuberculosis-endemic region. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2010;14(8):1001-8.
19. Couto I, Machado D, Viveiros M, Rodrigues L, Amaral L. Identification of nontuberculous mycobacteria in clinical samples using molecular methods: a 3-year study. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16(8):1161-1164.
20. Arend SM, Soolingen D, Ottenhoff THM. Diagnosis and treatment of lung infection with nontuberculous mycobacteria. *Infect Dis*. 2009;15:201-8.
21. Chung MJ, Lee KS, Koh WJ, Kim TS, Kang EY, Kim SM, et al. Drug-sensitive tuberculosis, multidrug-resistant tuberculosis, and nontuberculous mycobacterial pulmonary disease in nonAIDS adults: comparisons of thin-section CT findings. *Eur Radiol*. 2006;16:1934-41.
22. R Development Core Team (2009). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. [acesso 2011 Set 3] Disponível em: [http://www.R-project.org].
23. Chimara E, Ferrazoli L, Ueki SY, Martins MC, Durham AM, Arbeit RD, et al. Reliable identification of mycobacterial species by PCR-restriction enzyme analysis (PRA)-hsp65 in a reference laboratory and elaboration of a sequence-based extended algorithm of PRA-hsp65 patterns. *BMC Microbiol*. 2008;20:8:48.
24. Scheinfeld NS, Tomar S, Kress DW, Restauri N, Allan JM. *Mycobacterium Avium*-Intracellulare Infection. 2010. Medscape Reference: Drugs, Diseases e Procedures. [acesso 2010 Nov 02]. Disponível em: [http://emedicine.medscape.com/article/1105447-overview].
25. Ferrazoli L, Silva EAM, Martins MC, Ichikawa T, Palaci M. Micobactérias outras que não o *Mycobacterium tuberculosis*. Análise da ocorrência e de aspectos relevantes ao diagnóstico da infecção. *Hansen Int*. 1992;17(1/2):15-20.
26. Barreto AMW, Campos CED. Micobactérias "não tuberculosas" no Brasil. *Bol Pneumo Sanit*. 2000;8(1):23-32.
27. Shin JH, Lee EJ, Lee HR, Ryu SM, Kim HR, Chang CL, et al. Prevalence of non-tuberculous mycobacteria in a hospital environment. *J Hosp Inf*. 2007;65:143-8.
28. Piersimoni C, Scarparo C. Pulmonary infections associated with non-tuberculous mycobacteria in immunocompetent patients. *Lancet*. 2008;8:323-34.
29. Moraes PRS, Chimara E, Telles MAS, Ueki SYM, Cunha EAT, Honer MR, et al. Identification of non-tuberculous mycobacteria from the central public health laboratory from Mato Grosso do Sul and analysis of clinical relevance. *Braz J Microbiol*. 2008;39:268-72.

30. Salicio Y, Álvaro AI, Bermejo AI, Navascués A, Ojer M, Ruz A, et al. Relevancia clínica de los aislamientos de micobacterias no tuberculosas. *An Sist Sanit Navar*. 2008;31(1):33-42.
31. Nogueira PA, Abrahão RMCM, Malucelli MIC. Análise dos resultados de exames de escarro, provenientes de unidade de saúde, hospitais e presídios do município de São Paulo, para o diagnóstico da tuberculose. *Informe Epidem SUS*. 2000;9(4):263-71.
32. Ministério da Saúde (Rio de Janeiro – Brasil). Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço. 5a ed. Rio de Janeiro (RJ): Fundação Nacional de Saúde; 2002.
33. Nogueira JA, Marques RRC, Silva TR, França UM, Villa TCS, Palha PF. Caracterização clínico-epidemiológica dos pacientes com diagnóstico de tuberculose resistente às drogas em João Pessoa, PB. *Rev Eletr Enf*. 2008;10(4):979-89.
34. Zocche TL, Silva RM. Tuberculose no município de Tubarão nos anos 2000-2006. *Pulmão*. 2009;18(2):70-6.
35. Billinger ME, Olivier KN, Viboud C, Montes de Oca R, Steiner C, Holland SM, et al. Nontuberculous mycobacteria associated lung disease in hospitalized persons, United States, 1998-2005. *Emerg Infect Dis* 2009;15(10):1562-9.
36. Prevots DR, Shaw PA, Strickland D, Jackson LA, Raebel MA, Blosky MA, et al. Nontuberculous mycobacterial lung disease prevalence at four integrated health care delivery systems. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;182(7):970-6.

Detecção de *Salmonella* spp. em mexilhões *Perna perna* dos bancos naturais de baía densamente urbanizada

Salmonella spp. detection in brown mussels *Perna perna* from natural sea beds of a densely urbanized bay

RIALA6/1422

Estevão de Camargo PASSOS^{1*}, Ana Ruth Pereira de MELLO¹, Cícero Vagner de SOUSA¹, Maria Aparecida de OLIVEIRA², Luiz Miguel CASARINI³, Nathalia de Sousa MOTTA³, Marcelo Barbosa HENRIQUES³, Ingrid Cabral MACHADO³, Veridiana Vera DE ROSSO⁴, Irma Nelly Gutierrez RIVERA⁵

*Endereço para correspondência: ¹ Centro de Laboratório Regional de Santos, Instituto Adolfo Lutz, Rua Silva Jardim, 90, Santos/SP, CEP 11015-020, tel (013) 3232-5112, estevaopqc@yahoo.com.br

² Centro de Laboratório Regional de Ribeirão Preto, Instituto Adolfo Lutz.

³ Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio do Pescado Marinho, Instituto de Pesca.

⁴ Departamento de Biociências, Universidade Federal de São Paulo – Campus Baixada Santista.

⁵ Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

Recebido: 01.09.2011 Aceito para publicação: 22.12.2011

RESUMO

O objetivo deste estudo foi detectar a presença de *Salmonella* spp. em amostras de mexilhão *Perna perna* (L.) de bancos naturais da Ilha das Palmas, Baía de Santos, São Paulo, Brasil. No período de agosto de 2010 a julho de 2011 foram realizadas dez coletas de mexilhões *Perna perna* de três pontos distintos, no total de 29 amostras. Estas foram processadas segundo a metodologia descrita no *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. A *Salmonella* spp. foi isolada em 20,7% das amostras analisadas. As cepas de *Salmonella* spp. apresentaram quatro diferentes sorotipos dentre os seis isolados. O sorotipo dominante foi o *S. Livingstone*, detectado em três (50%) amostras, e os demais (*S. Infantis*, *S. enterica* subsp. *salamae* e *S. Albany*) foram isolados de uma amostra (16,6%). Salienta-se que em cada um dos pontos de coleta foram isoladas duas cepas distintas de *Salmonella* spp.; no ponto 1 *S. Livingstone* e *S. Albany*, ponto 2 *S. Infantis* e *S. Livingstone*, e ponto 3 *S. enterica* subsp. *salamae* e *S. Livingstone*. A *S. Livingstone* foi isolada em amostras de três pontos, duas no mês de janeiro de 2011 e uma no mês de junho de 2011.

Palavras-chave. *Salmonella* spp, mexilhões *Perna perna*, saúde pública.

ABSTRACT

This study aimed at isolating *Salmonella* spp. from mussel *Perna perna* (L.) samples collected from natural sea beds of Palmas Island, Santos Bay, São Paulo, Brazil. During the period from August 2010 to July 2011, 10 sampling of mussels collections were performed at three distinct points. A total of 29 samples were collected, which were analyzed by methodology described in the *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. *Salmonella* spp. was isolated from 20.7% of samples. The *Salmonella* spp. strains revealed four different serotypes among the six isolates. The dominant serotype was *S. Livingstone* which was detected in three isolates (50%), and the other isolated serotypes were identified as *S. Infantis*, *S. enterica* subsp. *salamae* and *S. Albany* from one sample (16.6%). Two different types of *Salmonella* spp. strains were isolated from samples collected at each distinct point. At the point 1 *S. Livingstone* and *S. Albany*, point 2 *S. Infantis* and *S. Livingstone*, point 3 *S. enterica* subsp. *salamae* and *S. Livingstone*. *S. Livingstone* was detected in samples from the three points, being two strains in January 2011 and one in June 2011.

Keywords. *Salmonella* spp, mussels *Perna perna*, public health.

INTRODUÇÃO

As espécies de mexilhões mais abundantes nos bancos naturais do litoral do Estado de São Paulo são *Perna perna*, encontrado nos costões rochosos, e *Mytella falcata* e *Mytella guyanensis* nos estuários. O bivalve *Perna perna* adulto tem um comprimento total variando de 50 a 80 mm, é um dos maiores mitilídeos que ocorrem no Brasil, podendo atingir até 140 mm de comprimento¹. Segundo Casarini e Henriques², no litoral do Estado de São Paulo, muitos bancos naturais de *P. perna* são de fácil acesso pelos extratores, ocasionando intensa exploração desse recurso que é comumente empregado em larga escala na alimentação humana, representando fonte de proteína animal de baixo custo e de alto valor nutricional.

Esses bivalves marinhos habitam corpos d'água ou ecossistemas aquáticos impactados com lançamento de esgoto *in natura*, são de interesse em Saúde Pública pois, por serem organismos filtradores e bioacumuladores de bactérias, vírus, fitoplâncton e metais pesados, podem representar sérios riscos à saúde pelo consumo de frutos do mar *in natura* ou que foram processados apenas por cocção^{3,4}.

Segundo a Organização Mundial da Saúde⁵, a *Salmonella* spp. constitui sério problema de Saúde Pública na maioria dos países, como uma das mais problemáticas doenças transmitidas por alimentos (DTA), sendo responsável por grande impacto na economia mundial por graves consequências econômicas relacionada aos gastos com atenção médica e medicamentos, hospitalizações e perda de produtividade.

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae*, são bacilos Gram negativos, não produtores de esporos, anaeróbios facultativos, que produzem gás a partir da glicose (exceto *S. Typhi*), capazes de utilizar o citrato como única fonte de carbono e são, em sua maioria, móveis com flagelos peritríquios, sua multiplicação ocorre em pH ótimo próximo a 7,0, sendo a temperatura ideal entre 35 e 43 °C, porém, se adapta em uma ampla faixa de temperatura, desde 5-7 até 46 °C⁶.

A presença de *Salmonella* spp. em frutos do mar (ostras, mariscos, mexilhões) é um fator potencial de risco à saúde, pois geralmente, esses alimentos são consumidos sem cocção ou insuficientemente cozidos, o que têm sido objeto de estudos, como os realizados por Vieira et al⁷, que pesquisaram a presença de *Vibrio* spp. e *Salmonella* spp. em caranguejos comercializados em Fortaleza/CE no período entre fevereiro e maio de 2003, identificaram sete cepas

de *Salmonella* spp. provenientes de quatro coletas: cinco foram identificadas como sorovar *S. Senftenberg*; e duas como *S. Poona*. Os autores recomendaram que a cocção dos crustáceos deverá ser completa em tempo necessário para destruir as bactérias, além disso, o emprego de Programas de Boas Práticas de Fabricação devem ser adotados durante os procedimentos de cozimento nos estabelecimentos a fim de se evitar problemas para os consumidores⁷.

Ristori et al.⁸ pesquisaram, no período de junho de 1998 a março de 1999, bactérias patogênicas em ostras e na água da região do estuário de Cananéia/SP e observaram nas águas analisadas a presença de *Salmonella*, *Aeromonas*, *Vibrio vulnificus* e coliformes fecais em 30%, 20%, 10% e 60% respectivamente; nas amostras de ostras, sem tratamento, foram isoladas *V. vulnificus*, *Aeromonas* e *Salmonella* em 80%, 70% e 10% das amostras respectivamente. Foram identificados quatro sorotipos de *Salmonella* Sandiego no mês de setembro, *S. Rubislaw* no mês de dezembro e *S. I 6.8:z10:-* no mês de janeiro, para as amostras de água e *S. houtenae* 16:z4,z23:-, em uma amostra de ostra coletada no mês de fevereiro.

Casarini et al.⁴ realizaram uma avaliação química e bacteriológica em mexilhões da baía de Santos/SP, no período de dezembro de 2006 a abril de 2008, observando a presença de metais pesados e microrganismos em valores acima do permitido pela legislação.

Rakesh et al.⁹ analisaram 443 amostras de frutos do mar (peixes, camarão, mariscos, caranguejo, mexilhão, ostra, lagosta, lula, polvo) e observaram que 108 estavam contaminadas com *Salmonella*. Setti et al.¹⁰ no Marrocos, observaram *Salmonella* em 10% (28) dos mexilhões das 279 amostras analisadas no período de julho de 2004 a maio de 2008.

No Brasil, dados do Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) da Secretaria de Estado da Saúde do Estado de São Paulo revelaram, no período de 1999 – 2008, que 210 (43%) dos surtos de toxinfecção alimentar foram ocasionados pela presença de *Salmonella* no alimento.

A importância da avaliação do estado sanitário dos bivalves marinhos deve-se ao fato de que a Baixada Santista ainda abriga um importante banco natural do mexilhão *Perna perna* no Estado de São Paulo^{2,11}. Grande parte dos pescadores artesanais dessa região tem na extração de mariscos uma atividade complementar à pesca, compondo a base de seu sustento familiar, principalmente nos períodos de defeso¹². No entanto, esses mariscos são

comercializados clandestinamente em restaurantes e peixarias da região, não sofrem processo de depuração e tampouco têm o registro em qualquer dos serviços de inspeção de produtos de origem animal (Serviço de Inspeção Federal, Serviço de Inspeção Estadual, Serviço de Inspeção Municipal); portanto, não possuem controle de qualidade, são agentes potencialmente perigosos, oferecendo riscos à saúde.

Segundo Silva et al.¹², para que o mexilhão *Perna perna* atenda aos padrões de segurança alimentar e seja competitivo no mercado, políticas públicas que considerem a realidade socioeconômica e ambiental da Baía de Santos devem ser elaboradas e implementadas.

Em função da possível ocorrência de salmonelose por meio do consumo de alimentos oriundos do ambiente marinho e dos riscos que essa bactéria representa para a Saúde Pública, este estudo objetivou pesquisar a detecção da *Salmonella* spp. em amostras de mexilhão *Perna perna* (L.) provenientes de bancos naturais, coletadas em três pontos distintos da Ilha das Palmas, Baía de Santos, São Paulo, durante o período de agosto de 2010 a julho 2011.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Durante o período de agosto de 2010 a julho de 2011 foram coletadas mensalmente, em três locais fixos na baixamar de sizígia, amostras de mexilhões *Perna perna*, nos bancos naturais do mediolitoral da ilha das Palmas, situada na baía de Santos (Figura 1). Os critérios de seleção dos locais de coleta consideraram a acessibilidade aos bancos, as maiores densidades regulares de *P. perna*, a ocorrência ao longo de todo ano e com distanciamento mínimo entre os bancos de 100 m. Dessa forma, foram definidos três locais de coletas que proporcionaram suficiência amostral para a condução deste estudo. Assim, o ponto 1 fica localizado na Latitude Sul (24.009260°), Longitude Oeste (46.325065°) e direção SSE; ponto 2 na Latitude Sul (24.008681°), Longitude Oeste (46.3225319°) e direção O; e ponto 3 na Latitude Sul (24.008034°), Longitude Oeste (46.324865°) e direção NNO.

Os mexilhões foram removidos vivos dos costões rochosos com o auxílio de raspadeira metálica e rapidamente acondicionado em embalagem plástica asséptica. Cada amostra foi composta por aproximadamente 200 gramas de peso vivo, equivalente a 50 animais adultos vivos com comprimento variável (> 40 mm). As amostras foram transportadas para laboratório em caixas isotérmicas

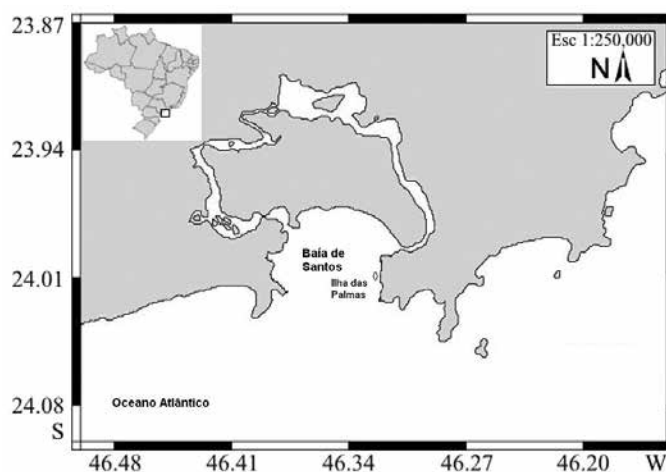


Figura 1. Mapa da baía de Santos com a localização da Ilha das Palmas. Coodenadas geográficas, latitude (S) e longitude (O) graus decimais. (Fonte: NOAA/NGDC Marine Geology and Geophysics Division). A letra W também deve ser substituída pela letra O na figura

mantidas a temperatura ambiente, já que os mexilhões são sensíveis à refrigeração, por um período máximo de 2 horas, até o início das análises.

Análise das amostras

O processamento das amostras de mexilhão e a pesquisa de *Salmonella* spp. foram realizados de acordo com os métodos recomendados por Andrews et al.⁶ e os resultados foram apresentados como Presença ou Ausência em 25 gramas da amostra. As amostras de *Salmonella* spp. isoladas foram identificadas, por meio da soroglutinação positiva com antissoros polivalentes somático (O) e flagelar (H) específicos, e encaminhadas ao Núcleo de Doenças Entéricas e Infecções por Patógenos Especiais do Instituto Adolfo Lutz para identificação e sorotipagem.

Análise dos dados

A regressão logística binária foi utilizada para determinar uma variável binária, ou seja, dois valores possíveis, nesse caso, presença ou ausência da *Salmonella* spp. O modelo testado possui dois preditores (Sazonalidade e Pontos de coleta) ajustados pelo método iterativo dos mínimos quadrados, ponderado para obter a máxima verossimilhança das estimativas dos parâmetros¹³.

RESULTADOS

A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos para *Salmonella* spp. que foi isolada em 20,7% do total de amostras avaliadas, o resultado positivo foi obtido para as

amostras A 8, A 9, A 10, A 12, A 25 e A 27. As cepas de *Salmonella* spp. revelaram quatro diferentes sorotipos entre os seis isolados. O sorotipo dominante foi *S. Livingstone*, que ocorreu em três (50%) amostras, sendo que os outros sorotipos caracterizados como *S. Infantis*, *S. enterica* subsp. *salamae* e *S. Albany* ocorreram em uma (16,6%) amostra cada. Cabe salientar que em cada um dos pontos de coleta foram isoladas duas cepas distintas de *Salmonella* spp, no ponto 1 *S. Livingstone* e *S. Albany*, no ponto 2 *S. Infantis* e *S. Livingstone*, e no ponto 3 *S. enterica* subsp. *salamae* e *S. Livingstone*. A *S. Livingstone* foi detectada nos três pontos, sendo duas no mês de janeiro de 2011 e uma no mês de junho de 2011.

A regressão logística binária foi adequada para investigar os efeitos da sazonalidade e dos pontos de coleta sobre a ocorrência de *Salmonella* spp. nos mexilhões dos bancos naturais. Porém, o modelo não evidenciou significativamente os efeitos dos preditores na ocorrência de *Salmonella* spp. ($z = 0,09$; $p = 0,925$) e ($z = -0,60$; $p = 0,547$) para os locais de coleta e sazonalidade, respectivamente. Esses valores p são superiores a 0,05, indicando que não há provas suficientes de que os coeficientes sejam diferentes de zero com o nível de significância $\alpha = 0,05$. O valor de log-verossimilhança (-14,596) obtido pela iteração máxima e a estatística $G = 0,378$; $g.l = 2$; $p = 0,828$) também indica que todos os coeficientes associados aos preditores são iguais à zero.

DISCUSSÃO

A prevalência do sorotipo *S. Livingstone* pode estar relacionada às fontes específicas de contaminação dos locais de coleta do mexilhão, pela ocorrência de uma população maior desse sorotipo específico ou por sua maior capacidade de sobreviver às variações ambientais. Ademais, as aves também podem servir como reservatórios e fontes disseminadoras da *Salmonella* para outras espécies animais, como relataram Silva et al.¹⁴.

Os resultados obtidos neste estudo com o isolamento de *Salmonella* *Livingstone*, *S. Infantis*, *S. enterica* subsp. *salamae* e *S. Albany* nos mexilhões *Perna perna* vem ao encontro dos resultados obtidos por Nunes¹⁵, que isolou *Salmonella* spp. em amostras de água e bivalves coletados (*Perna perna*, *Crassostrea rhizophorae* e *Anomalocardia brasiliensis*) em áreas portuárias brasileiras, incluindo o porto de Santos/SP, entre os vários sorotipos identificados destacaram-se a *Salmonella* *Infantis*, *S. Albany* e a *S. Livingstone*. Ristori

Tabela 1. Sorotipos de *Salmonella* spp. isoladas em amostras de mexilhões *Perna perna*, coletadas em três locais da Ilha das Palmas, na baía de Santos, no período de agosto de 2010 a julho de 2011

Mês	Local	Amostra	Detecção <i>Salmonella</i> spp.	Sorotipo
Agosto -2010	1	A 1	Ausência	-
	2	A 2	Ausência	-
	3	A 3	Ausência	-
Setembro - 2011	1	A 4	Ausência	-
	2	A 5	Ausência	-
	3	A 6	Ausência	-
Novembro-2010	1	A 7	Ausência	-
	2	A 8	Presença	<i>S. Infantis</i>
	3	A 9	Presença	<i>S. enterica</i> subsp <i>salamae</i>
Janeiro-2011	1	A 10	Presença	<i>S. Livingstone</i>
	2	A 11	Ausência	-
	3	A 12	Presença	<i>S. Livingstone</i>
Fevereiro-2011	1	A 13	Ausência	-
	2	A 14	Ausência	-
	3	A 15	Ausência	-
Março-2011	1	A 16	Ausência	-
	2	A 17	Ausência	-
	3	A 18	Ausência	-
Abril-2011	1	A 19	Ausência	-
	2	A 20	Ausência	-
	3	A 21	Ausência	-
Maio-2010	1	A 22	Ausência	-
	2	A 23	Ausência	-
Junho-2011	1	A 24	Ausência	-
	2	A 25	Presença	<i>S. Livingstone</i>
	3	A 26	Ausência	-
Julho-2011	1	A 27	Presença	<i>S. Albany</i>
	2	A 28	Ausência	-
	3	A 29	Ausência	-

et al.⁸ observaram, na região estuarina de Cananéia/SP, a presença de *Salmonella* na água e em ostras, identificando quatro sorotipos, sendo *S. Sandiego*, *S. Rubislaw* e *S. I 6.8:z10*: nas amostras de águas e *S. houtenae* 16:z4,z23:- em uma amostra de ostra.

Na pesquisa realizada com mexilhões *Perna perna* na Baía de Santos/SP, a *Salmonella* spp. foi detectada na terceira coleta, realizada no mês de novembro, correspondendo à primavera brasileira, na quarta coleta, realizada no mês de janeiro, correspondendo ao verão e na nona e décima coletas, realizadas nos

meses de junho e julho, correspondendo ao inverno. Os resultados observados neste estudo corroboram com os achados por Nunes¹⁵ e Ristori et al.⁸, que também isolaram *Salmonella* na primavera, verão, outono e inverno. Apesar de não serem detectadas amostras positivas para esse patógeno no outono, esses dados evidenciam que, possivelmente, as variáveis ambientais de cada estação do ano (temperatura da água do mar e do ambiente, chuvas, salinidade e radiação solar) não interferiram no isolamento de *Salmonella* spp. em mexilhões *Perna perna*, durante o período de realização deste estudo.

Considerando a presença de *Salmonella* spp. nos ambientes agrícolas e aquáticos, esses ambientes assumem papel importante na veiculação de zoonoses¹⁵. No presente estudo a detecção da *Salmonella* ocorreu em 20,7% do total das amostras analisadas referentes aos três pontos de coleta na Ilha das Palmas/Santos, com isolamento de diferentes cepas de *Salmonella* para os distintos pontos. Os resultados encontrados diferiram dos encontrados por Setti et al.¹⁰, no Marrocos, que observaram *Salmonella* em apenas 10% (28) dos mexilhões das 279 amostras analisadas no período de julho de 2004 a maio de 2008.

Várias são as dificuldades para a detecção da *Salmonella* spp. como, por exemplo, quando o alimento está impróprio para o consumo nenhum teste é realizado, logo, a informação sobre a presença ou ausência de *Salmonella* spp. não é gerada. Além disso, existem vários outros motivos para a não detecção de *Salmonella* spp. nos alimentos, tais como a presença de micro-organismos contaminantes, que podem dificultar o isolamento de bactérias injuriadas e a baixa capacidade de competição desse gênero frente à outras bactérias presentes nos alimentos^{6,9}.

A Resolução RDC nº 12/2001 de 2 de janeiro de 2001 da ANVISA/Ministério da Saúde³³ estabeleceu os Padrões Microbiológicos Sanitários para Alimentos e determinou os critérios para a Conclusão e Interpretação dos Resultados das Análises Microbiológicas de Alimentos Destinados ao Consumo Humano. Segundo esta Resolução, os alimentos com presença de *Salmonella* spp. são considerados impróprios para o consumo. Os resultados obtidos neste estudo com à detecção da *Salmonella* spp. em seis amostras de mexilhões analisados, demonstraram que esses frutos do mar estavam fora dos padrões microbiológicos estabelecidos pela Resolução RDC nº 12/2001.

CONCLUSÃO

Nos mexilhões *Perna perna* coletados em bancos naturais, foi isolada *Salmonella* spp. em 20,7% (6 amostras) das 29 analisadas. As cepas de *Salmonella* spp. dominantes foram *S. Livingstone* com 50% (3) de amostras positivas e *S. Infantis*, *S. enterica* subsp. *salamae* e *S. Albany* com 16,6% de amostras positivas, correspondendo à uma amostra cada.

Em cada um dos pontos de coleta foram isoladas duas cepas distintas de *Salmonella* spp, no ponto 1 *S. Livingstone* e *S. Albany*, no ponto 2 *S. Infantis* e *S. Livingstone*, e no ponto 3 *S. enterica* subsp. *salamae* e *S. Livingstone*.

A *S. Livingstone* foi detectada nos três pontos, sendo duas no mês de janeiro de 2011 e uma no mês de junho de 2011.

REFERÊNCIAS

1. Klappenbach MA. Lista preliminar de los mytilidae brasileños con claves para su determinación y notas sobre su distribución. *An Acad Bras Ciênc*. 1964;37(supl.): 327-52.
2. Casarini LM, Henriques MB. Estimativa do estoque do mexilhão *Perna perna* e da espécie invasora *Isognomon bicolor* em bancos naturais da Baía de Santos, São Paulo, Brasil. *Bol Inst Pesca*. 2011;37(1): 1-11.
3. Gourmelon M, Lazure P, Hervio-Heath D, Le Saux JC, Caprais MP, Le Guyader FS, et al. Microbial modelling in coastal environments and early warning systems: useful tools to limit shellfish microbial contamination. In: Rees G, Pond K, Kay D, Bartram J, Santo Domingo J, eds. *World Health Organization (WHO). Safe Management of Shellfish and Harvest Waters*. London: IWA Publishing; 2010.p.297-318.
4. Casarini LM, Henriques MB, Graça-Lopes R, Souza MR. Chemical and bacteriological evaluation of the water and mussels of Santos bay, São Paulo, Brazil. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2010;69:297-303.
5. World Health Organization - WHO. Food safety and foodborne illness. 2007. [acesso 2011 Ago 22]. Disponível em: [http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/print.html].
6. Andrews WH, Flowers RS, Silliker J, Bailey JS. *Salmonella*. In: Downes FP, Ito K, eds. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Washington, DC: American Public Health Association (APHA); 2001.p.357-80.
7. Vieira RHSE, Lima EA, Sousa DBR, Reis EF, Costa RG, Rodrigues DP. *Vibrio* spp. and *Salmonella* spp., presence and susceptibility in crabs *Ucides cordatus*. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2004;46(4):179-82.
8. Ristori CA, Iaria ST, Gelli DS, Rivera ING. Pathogenic bacteria associated with oysters (*Crassostrea brasiliiana*) and estuarine water along the south coast of Brazil. *Int J Environ Health Res*. 2007;17(4):259-69.

9. Rakesh K, Poothuvallil KS, Nirmala T. Evaluation of Culture Media for Selective Enrichment and Isolation of *Salmonella* in Seafood. *J AOAC Int*. 2010;93(5):1468-71.
10. Setti I, Rodriguez-Castro A, Pata MP, Cadarso-Suarez C, Yacoubi B, Bensmael L, et al. Characteristics and Dynamics of *Salmonella* Contamination along the Coast of Agadir, Morocco. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75(24):7700-09.
11. Henriques MB, Casarini LM. Avaliação do crescimento do mexilhão *Perna perna* e da espécie invasora *Isognomon bicolor* em banco natural da ilha das Palmas, baía de Santos, estado de São Paulo, Brasil. *Bol Inst Pesca*. 2009;35(4):577-86.
12. Silva NJR, Reno SF, Henriques MB. Atividade extrativa do mexilhão *Perna perna* em bancos naturais da baía de Santos, estado de São Paulo: uma abordagem socioeconômica. *Informações econômicas, São Paulo*. 2009;39(9):62-73.
13. Schriewer A, Miller WA, Byrne BA, Miller MA, Oates S, Conrad PA, et al. Presence of Bacteroidales as a predictor of pathogens in surface waters of the central California coast. *Appl Environ Microbiol*. 2010;76(17):5802-14.
14. Silva MA, Marvulo MFV, Mota RA, Silva JCR. A importância da ordem Ciconiiformes na cadeia epidemiológica de *Salmonella* spp. para a saúde pública e a conservação da diversidade biológica. *Pesq Vet Bras*. 2010;30(7):573-80.
15. Nunes SL. *Salmonella* spp. isoladas de águas e moluscos bivalves de regiões portuárias brasileiras – Suscetibilidade antimicrobiana e caracterização molecular dos sorogrupos (A-D1, B e C2-C3) [tese de doutorado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo, 2007.

Avaliação da unidade analítica na detecção de *Salmonella* spp. em frangos a varejo

Evaluation of the analytical unit for detecting *Salmonella* spp. in poultry at retail

RIALA6/1423

Ricardo Seiti YAMATOIGI*, Julia Arantes GALVÃO, Eduardo Delbon BALDINI, Luiz Carlos Teixeira de SOUZA JUNIOR, Marianna Vaz RODRIGUES, José Paes Almeida Nogueira PINTO

*Endereço para correspondência: Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista – UNESP. Caixa Postal 572, Rubião Jr., Botucatu, SP, Brasil, (14) CEP:18.010.970, (14)38116273, e-mail: rsyvet@yahoo.com.br

Recebido: 30.11.2010 – Aceito para publicação: 16.09.2011

RESUMO

Mais de 95% das salmoneloses humanas são de origem alimentar e, entre os alimentos envolvidos na transmissão estão os produtos de origem animal, especialmente os de maior relevância, os produtos avícolas. Diante desta questão, o Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabeleceu um programa com a finalidade de reduzir e monitorar a contaminação por *Salmonella* spp. nas carcaças de aves. Neste estudo, foi comparada a eficiência de duas metodologias de análises (o enxágue da carcaça e a excisão da pele) para recuperação de células da bactéria, bem como para a verificação da ocorrência do agente patogênico em amostras coletadas na região de Botucatu, SP. Em 100 carcaças analisadas, computando-se os resultados de ambas as metodologias, 43% (43/100) estavam contaminadas por *Salmonella* spp. Por meio de metodologia de enxágue foram detectadas 81,40% (35/43) amostras com resultados positivos e 51,16% (22/43) pela técnica de excisão. Embora a técnica de enxágue tenha detectado número superior de amostras positivas, não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre os resultados obtidos pelas duas metodologias. Estudos adicionais devem ser realizados, dada à importância das carcaças de frango na veiculação de *Salmonella* spp. e sua consequente introdução no ambiente de preparação de alimentos.

Palavras chave. *Salmonella*, carcaça de frango, enxágue, excisão de 25 gramas.

ABSTRACT

Over 95 % of the cases of human salmonellosis are foodborne. Among the foods involved in transmission of these diseases are the products from animal origin, being the poultry products highly relevant. To deal with this issue, the Ministry of Agriculture, Livestocks Farming and Supply (MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) established a program, in order to monitor the contamination by *Salmonella* spp. in poultry carcasses. This study aimed at comparing the efficiency of two analytical methodologies (rinsing of chicken carcass and skin excision) for recovering the cells from this bacterium and to verify the occurrence of this pathogen in samples collected in Botucatu, SP. Analyzing 100 carcasses, and computing the results by both techniques, contamination by *Salmonella* spp. was detected in 43% samples. Using the rinsing technique, 81.40% (35/43) showed positive results as well as 51.16% (22/43) using the skin excision methodology. Although the rinsing technique detected high number of positive samples, no statistical difference ($p > 0.05$) was found between the results obtained from two methodologies. Further studies should be conducted on this issue as the poultry carcasses are crucial source for transmission of *Salmonella* spp., and the subsequent introduction of this pathogen on food preparation environment.

Keywords. *Salmonella*, poultry carcass, rinsing, 25 grams excision.

INTRODUÇÃO

As bactérias do gênero *Salmonella*, isoladas e identificadas a partir do final do século XIX, continuam desempenhando um papel importante como agentes etiológicos de enfermidades, tanto em animais, quanto no homem¹. Constituído por mais de 2500 sorotipos, o gênero é responsável por perdas econômicas consideráveis nos plantéis animais e, em relação ao homem, é considerado um dos principais agentes etiológicos das enfermidades transmitidas por alimentos – ETA^{1,2}.

Mais de 95 % das salmoneloses humanas têm origem nos alimentos e, entre os alimentos envolvidos na transmissão estão os produtos de origem animal, especialmente os avícolas³.

De acordo com levantamentos realizados em vários países, 30 a 50 % das carcaças de frangos congeladas ou refrigeradas estão contaminadas por *Salmonella* spp.⁴⁻⁶. No Brasil, há registros de até 86,7% de amostras contaminadas⁷.

Preocupada com esta questão e com seus reflexos sobre a saúde, a Secretaria de Defesa Agropecuária, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), instituiu por meio da Instrução Normativa nº 70, de 06 de outubro de 2003, o Programa de Redução de Patógenos - Monitoramento Microbiológico e Controle de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos e perus (PRP)⁸.

Segundo esta Instrução Normativa, os abatedouros avícolas fiscalizados pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF) brasileiro, devem remeter a laboratórios credenciados carcaças de frangos ou perus para pesquisa de *Salmonella* spp., sendo o número de amostras analisadas relacionado ao volume de abate de cada estabelecimento⁸.

A Instrução Normativa estipula que a pesquisa do patógeno deve ser realizada a partir de 25 ± 0,2 g de cortes de pele e músculo das regiões pericloacal, asas e pescoço das carcaças. Esta metodologia, no entanto, tem sido contestada por vários pesquisadores no Brasil e no exterior, mesmo antes da introdução do PRP, já que o enxágue das carcaças inteiras com volume variável de líquido tem mostrado resultados bastante superiores na recuperação do patógeno quando comparados aos alcançados pela pesagem de 25 g das amostras avaliadas⁸.

Confirmada esta discrepância nos resultados obtidos pelas metodologias, o PRP, instituído no país, poderia estar subestimando a real prevalência de *Salmonella* spp. nas carcaças de frangos produzidas no

Brasil, podendo comprometer os objetivos primários de sua implantação.

Com base em tais considerações, o presente estudo teve como objetivo comparar o método de enxágue com aquele que preconiza a excisão de 25 g de cortes de pele e músculo das regiões pericloacal, asas e pescoço, na recuperação de *Salmonella* spp. de carcaças de frangos, bem como verificar a ocorrência do patógeno em amostras colhidas na região de Botucatu, SP. Tais dados poderão fornecer subsídios ao MAPA no que se refere à escolha da unidade analítica a ser empregada na pesquisa de *Salmonella* spp. e à avaliação da qualidade sanitária do produto encontrado no comércio varejista frente às exigências regulamentares.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta do material

Foram coletadas aleatoriamente 100 carcaças resfriadas de frangos no comércio varejista da região de Botucatu/SP, sendo as mesmas acondicionadas e enviadas em caixas isotérmicas, contendo gelo reciclável, para o Laboratório de Alimentos do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública (FMVZ) da UNESP - Botucatu, a fim de serem analisadas.

Isolamento da *Salmonella*

As carcaças de frango coletados foram enxaguadas com 300 mL de água peptonada tamponada a 1 % (Difco, Becton Dickinson) durante três minutos e a solução de enxágue foi transferida para um saco plástico estéril.

A partir da mesma carcaça de frango enxaguada, foram excisados 25 g de pele e músculo conforme descrito pelo Programa de Recuperação de Patógenos (PRP)³, em saco plástico estéril e adicionado de 225 mL de água peptonada tamponada a 1% (Difco, Becton Dickinson), seguidos de homogeneização por três minutos em *stomacher* (ITR).

Em seguida realizou-se a pesquisa de *Salmonella* spp. conforme preconizado por Andrews⁹: os produtos foram incubados a 35 °C por 24 horas e, após a incubação, 0,1 mL da amostra incubada foi transferida para 10 mL do caldo de Rappaport-Vassiliadis (Difco, Becton Dickinson) e 1 mL para 10 mL de caldo de Tetrationato (Difco, Becton Dickinson), adicionado de 0,2 mL de solução de iodo e 0,1 mL de solução de verde brilhante a 0,1 %, ambos incubados a 42 °C por 24 horas. Decorrido o tempo de incubação, cada caldo foi estriado com alça bacteriológica

em placas contendo ágar Xilose-lisina-desoxicolato (Difco, Becton Dickinson), ágar Sulfito-Bismuto (Difco, Becton Dickinson) e ágar MLCB (Oxoid), sendo posteriormente incubadas a 35 °C por 24 horas. As colônias suspeitas foram repicadas em Triple sugar iron ágar (Difco, Becton Dickinson) e Lisine iron ágar (Difco, Becton Dickinson) e incubadas por 24 horas a 35 °C. Para os tubos que apresentaram reação característica para *Salmonella* spp., foram realizadas provas bioquímicas complementares (indol, Voges Proskauer, vermelho de metila, citrato, uréia, fenilalanina e movimento). Nos isolados que apresentaram características para *Salmonella* nos testes bioquímicos, foram realizados testes sorológicos para o antígeno polivalente O e H.

Em 50% das amostras avaliadas, a técnica de enxágue foi realizada antes da técnica de excisão e nas restantes o processo foi invertido.

Análise estatística

As proporções de amostras positivas e negativas para *Salmonella* sp. obtidas a partir de cada unidade analítica, foram comparadas entre si pelo teste de Goodman para contraste entre e dentro de populações binomiais, considerando o nível de 5% de significância¹⁰.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 100 carcaças analisadas, 43% apresentaram contaminação por *Salmonella* spp. Deste total, pelo método de enxágue, foram detectadas 35 amostras positivas, correspondendo a 81,40 % do total de positivos. Pela metodologia de excisão, foram detectadas 24 das 43 amostras positivas, correspondendo a 55,80% do total. A pesquisa de *Salmonella* apresentou resultado positivo simultaneamente por ambas as unidades analíticas em 16 das 43 amostras positivas (37,21%). A sequência de utilização dos métodos avaliados, isto é, o emprego do enxague ou da excisão como primeira opção na análise das carcaças não teve influência nos resultados obtidos.

Resultados semelhantes foram observados em outros estudos, onde foram avaliados produtos avícolas comercializados no varejo. Em um estudo realizado na Bélgica por Uyttendaele et al.¹¹, encontrou 36,5% (282/772) de amostras positivas para *Salmonella* em frangos comercializados no varejo. Em Trinidad e Tobago, também foi encontrada alta ocorrência deste agente em amostras coletadas no varejo, totalizando

60,7 % de positividade¹². No Brasil, Santos¹³ analisou um total de 150 carcaças de frangos congeladas de 4 marcas, coletadas no comércio varejista, e encontrou 32 % de positividade para o patógeno.

A alta ocorrência de *Salmonella* nos produtos comercializados no varejo pode ser resultante de vários fatores: abate de lotes provenientes de propriedades com deficiências no controle higiênico-sanitário; transporte inadequado até os abatedouros; e contaminação cruzada durante as operações de abate e processamento das carcaças¹⁴. Em relação a esta última etapa, as operações de escaldagem, depenagem, evisceração e resfriamento das carcaças são importantes, sendo que, medidas de higiene devem ser aplicadas em cada um desses estágios, visando garantir a qualidade sanitária do produto¹⁴.

Quanto aos resultados obtidos pelo emprego de diferentes metodologias de coleta (Tabela 1) verificou-se que o método de enxágue resultou, numericamente, em maior positividade de amostras quando comparado ao de excisão de 25 gramas. Resultados semelhantes foram encontrados por Macvoy et al.¹⁵, tendo o método de enxágue obtido 58 % de positividade e o de excisão 46 %. Ressalte-se, no entanto, que tanto em nosso experimento, quanto no de Macvoy et al.¹⁵, não se observou diferença estatística significativa quando do emprego das duas diferentes unidades analíticas.

Tabela 1. Frequência de *Salmonella* sp. em carcaças de frango, de acordo com o método utilizado

MÉTODO	Resultados		TOTAL
	Negativo	Positivo	
Excisão (25 g)	76 (76 %)aB	24(24 %)aA	100
Enxague	65(65 %)aB	35(35 %)aA	100

a: $p > 0,05$ (métodos)

A,B: $p < 0,05$ (respostas)

CONCLUSÃO

A contaminação das carcaças avaliadas revelou-se alta, com percentuais acima do fixado pela Instrução Normativa nº 708. Dos métodos avaliados, o enxágue foi o que apresentou o melhor desempenho na detecção de *Salmonella* spp. em carcaças de frango. Estudos adicionais devem ser realizados sobre o tema, dada à importância desse produto na veiculação de *Salmonella* spp. e sua consequente introdução no ambiente de preparação de alimentos.

REFERÊNCIAS

1. D'aoust JY, Maurer J, Bailey JS. *Salmonella* species. In: Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ. Food microbiology: fundamentals and frontiers. Washington: ASM Press, 2001. p.141-78.
2. Popoff MY, Bockemühl J, Gheesling LL. Supplement 2002 (nº. 46) to the Kauffmann-White scheme. *Res Microbiol*. 2004; 155:568-70.
3. Tauxe RV. *Salmonella*: a postmodern pathogen. *J Food Prot*. 1991; 54(7):563-8.
4. Fletcher DL. Influence of sampling methodology on reported incidence of salmonella in poultry. *J AOAC Int*. 2006;89(2):512-6.
5. Simmons M, Fletcher DL, Cason JA, Berrang ME. Recovery of *Salmonella* from retail broilers by a whole-carcass enrichment procedure. *J Food Prot*. 2003;66(3):446-50.
6. Silva JA. Microrganismos patogênicos em carne de frangos. *Hig Aliment*. 1998;12(58):9-14.
7. Carvalho ACFB, Cortez ALL. *Salmonella* spp. em carcaças, carne mecanicamente separada, linguiças e cortes comerciais de frango. *Rev Ciênc Rural*. 2005;35(6):1-6.
8. Brasil. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 70, de 06 de outubro de 2003. Institui o Programa de Redução de Patógenos Monitoramento Microbiológico e Controle de *Salmonella* sp. Em Carcaças de Frangos e Perus. Brasília. [acesso 2010 Nov 18]. Disponível em [<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=3136>].
9. Andrews WH, June GA, Sherrod P, Hammak TS, Amaguana RM. *Salmonella*. In: Food and Drug Administration – Bacteriological Analytical Manual, 8th ed. Gaithersburg: J AOAC Int; 1998.p. 5.01-5.020.
10. Goodman LA. On simultaneous confidence intervals for contrast among multinomial populations. *Technometrics*. 1965;7(2):247-54.
11. Uyttendaele M, Troy P, Debevere J. Incidence of *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, and *Listeria monocytogenes* in poultry carcasses and different types of poultry products for sale on the Belgian retail market. *J Food Prot*.1999; 62(7):735-40.
12. Thomas A, Lallo CHO, Badrie N. Microbiological evaluation of broiler carcasses, wash and rinse water pluck shop (cottage poultry processors) in the country Nariva/Mayaro, Trinidad, Trinidad e Tobago, west indies. *Tropiculture*. 2006;24(3):135-42.
13. Santos DMS, Junior, AB, Fernandes SA, Tavechio AT, Amaral LA. *Salmonella* em carcaças de frango congeladas. *Pesq Vet Bras*. 2000;20(1):39-42.
14. Mead L, Lammerding AM, Cox N, Doyle MP, Humbert F, Kulikovskiy A, et al. Scientific and Technical Factors Affecting the Setting of *Salmonella* Criteria for Raw Poultry: A Global Perspective. *J Food Prot*. 2010;73(08):1566–90.
15. Mcavoy JM, Nde CW, Sherwood JS, Logue CM. An evaluation of sampling methods for the detection of *Escherichia coli* and *Salmonella* on turkey carcasses. *J Food Prot*. 2005;68(1):34-9.

Qualidade do óleo de palma bruto (*Elaeis guineensis*): matéria-prima para fritura de acarajés

The quality of crude palm oil (*Elaeis guineensis*): raw material for deep-frying *acarajés*

RIALA6/1424

Fabiana Martins CURVELO¹, Deusdélia Teixeira de ALMEIDA^{2*}, Itaciara Larroza NUNES², Sabrina FEITOSA²

*Endereço para correspondência: ²Escola de Nutrição, Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal da Bahia, Rua Araújo Pinho, 32 Canela. CEP: 40110150. Salvador, BA, Brasil. Tel: 71 32837700, e-mail: delia@ufba.br

¹Programa de Pós Graduação em Alimentos, Nutrição e Saúde, Escola de Nutrição, Universidade Federal da Bahia

Recebido: 23.05.2011 - Aceito para publicação: 07.12.2011

RESUMO

Uma característica marcante da produção do óleo de palma na Bahia é o modo de extração, além da variedade de produtos comercializados em feiras e supermercados. Com o objetivo de conhecer os critérios adotados pelas *baianas de acarajé* na escolha do óleo para fritura, foram analisadas as características de qualidade desses produtos. Foram coletados 15 tipos de óleos, em embalagens originais, comumente empregados na fritura de acarajé, na cidade da Salvador. A qualidade do óleo foi verificada por meio de análises de acidez (mg KOH/g), peróxidos (mEq/kg), índice de refração (40 °C) e análise da cor (CIELab). Nas entrevistas realizadas, 48% das *baianas de acarajé* mostraram preferência pelo óleo de palma rotulado, composto por oleína e estearina (89%), para fritura dos acarajés. Em 73,33% das amostras a acidez foi superior ao limite estabelecido pela legislação (10mg KOH/g); o índice de peróxidos variou entre 0,5-4,5mEq/kg e o índice de refração entre 1,4500-1,4590; as amostras contendo somente a fração oleína apresentaram-se mais luminosas e vermelhas em relação àquelas com as duas frações. Observou-se heterogeneidade entre os índices analíticos dos óleos, destacando-se a elevada acidez, condição que, quando associada às altas temperaturas de fritura, favorece a formação de ácidos graxos oxidados, altamente absorvíveis e citotóxicos.

Palavras-chave. óleo de palma bruto, azeite de dendê, acidez, cor, fritura de acarajés.

ABSTRACT

A remarkable characteristic of the crude palm oil production in Bahia is the rustic way of extraction and the variety of products sold in supermarkets and marketplaces. This study investigated the criteria used by *baianas de acarajé* for choosing the palm oil for deep-frying of acarajé, and to evaluate their quality. Fifteen kinds of crude palm oil, usually employed for frying acarajé in Salvador City, were collected in their original packing. The quality of these samples was verified by analysis of acidity (mg KOH/g), peroxide value (mEq/kg), refraction index (40 °C) and color (CIELab). During the interviews, the *baianas de acarajé* have stated preference to labeled palm oil (48%) and the products containing both olein and stearin (89%) for frying acarajé. The acidity was higher than those established by legislation (10mg KOH/g) in 73.33% of samples; the peroxide values varied from 0.5 to 4.5 mEq/kg, and the refraction index between 1.4500-1.4590. The samples containing only olein fraction, were more brighter and intense red than those composed by both fractions. High heterogeneity was observed in the analyzed palm oil samples, remarkably high acidity, and when this condition is combined with high temperature frying, a formation of the absorbable and highly cytotoxic oxidized fatty acids might be induced.

Keywords. crude palm oil, color, deep-frying *acarajé*, acidity.

INTRODUÇÃO

O azeite de dendê, ou óleo de palma como é conhecido internacionalmente, consiste de um óleo vegetal, extraído do mesocarpo do fruto da palmeira *Elaeis guineensis*. Estima-se que no período 2008/2012, a produção do óleo de palma deverá superar a produção individual de todos os demais óleos e gorduras, atingindo uma média anual de 30 milhões de toneladas frente as 29,1 milhões de toneladas do óleo de soja, 15,5 milhões de toneladas do óleo de canola (colza) e 12,1 milhões de toneladas do óleo de girassol¹.

Em sua forma bruta, o óleo de palma só é consumido no Brasil e na África. Uma das características mais marcantes da produção do óleo de palma na Bahia é o seu modo rústico de extração, por meio de prensagem, nos chamados “rodões” de pedra, um processo rudimentar, que envolve todo o grupo familiar, onde não se observa cuidados com os frutos no momento da colheita e transporte, o que acaba ocasionando uma grave acidificação do óleo a ser consumido. A comercialização é realizada por duas principais usinas de beneficiamento, as quais “terceirizam” a produção artesanal, embalando, rotulando e distribuindo o óleo².

Na Bahia, o óleo de palma é ingrediente em diversos pratos culinários – moquecas, vatapá, xinxim de galinha, caruru e acarajé, este último considerado patrimônio imaterial do país. Esta iguaria é elaborada com feijão fradinho descorticado, cebola ralada e sal, finalizando com a fritura dos bolinhos por imersão em óleo de palma bruto. Os bolinhos são servidos em porções individuais, acompanhados de recheio de vatapá, camarão, caruru e salada, sendo largamente comercializados nas ruas da cidade de Salvador por *baianas de acarajé*².

Como mencionado, os acarajés são fritos por imersão no óleo de palma bruto, processo que ocasiona reações hidrolíticas, térmicas e oxidativas no óleo, cuja intensidade está na dependência de vários fatores, tais como: temperatura e tempo de fritura; relação superfície/volume do óleo; adição de óleo novo (*turnover*); tipo de aquecimento; e a qualidade inicial do óleo³. Neste último aspecto, alguns métodos são empregados para monitorar a qualidade inicial e final dos óleos de fritura, a exemplo do índice de refração (40 °C), acidez (mg KOH/g), peróxidos (mEq/kg) e compostos polares (%). Conforme mencionado por Camilo et al⁴ na França e Bélgica não se permite a utilização de óleos com mais de 2% de ácido linolênico para frituras.

O óleo de palma possui boas características para frituras, pois contém pequenas quantidades de ácido linoléico (10%) e traços de linolênico, os quais são muito susceptíveis à oxidação, além de alto teor de ácidos graxos monoinsaturados e de antioxidantes naturais, como os carotenoides, tocoferóis e tocotrienóis, o que faz com que ele resista por mais tempo a elevadas temperaturas^{5,6}. No entanto, a exemplo de outros óleos vegetais, sua qualidade inicial é determinante para a boa condução do processo de fritura.

Apesar da alta produção e consumo de acarajés, não existe até o momento estudos sobre os critérios utilizados pelas baianas de acarajé para a escolha do óleo a ser empregado na fritura de acarajés e as características de qualidade dos mesmos, o que é objetivo da presente proposta.

MATERIAL E MÉTODOS

Caracterização e obtenção das amostras

A seleção dos óleos de palma comercializados nos supermercados e/ou do produto artesanal vendido nas feiras da cidade de Salvador/BA baseou-se em informações obtidas por meio de respostas a um questionário aplicado às *baianas de acarajé*, em 149 pontos de venda do produto. As questões abordadas foram: 1) Qual a o tipo do azeite empregado na fritura do acarajé?; 2) Com que frequência você adquire o azeite de dendê?; 3) Qual fração do azeite utiliza na fritura de acarajés? 4) Quais critérios você utiliza para selecionar o azeite?

Os locais para aplicação do questionário foram selecionados a partir de fichas cadastrais das baianas filiadas à Associação de Baianas do Acarajé e Mingau (ABAM), a qual disponibilizou 1794 fichas, que após serem revisadas (excluíram-se os cadastros com informações incompletas ou duplicadas), totalizaram 1385 locais de venda. Para obtenção da amostra, identificou-se o quantitativo de *baianas de acarajé* distribuídas em cada um dos 12 distritos sanitários da cidade de Salvador. A seguir, dividiu-se o número de baianas de cada distrito pela população total (1385) e multiplicou-se este resultado pelo tamanho pretendido da amostra (150), o que representou 11% dos pontos de comercialização da cidade.

Após análise dos dados do referido questionário foram coletados 15 tipos de óleo de palma brutos, os mais utilizados pelas *baianas de acarajé* entrevistadas,

assim distribuídos: 5 amostras de produção artesanal ou comum (C1-C5) contendo as duas fases do azeite (oleína e estearina), sem registro e rótulo, procedentes de diferentes produtores das cidades de Nazaré e Valença – BA; 4 amostras industrializadas contendo as frações de oleína e estearina (I1-I4) e 2 amostras industrializadas contendo mistura da fração oleína com óleo de soja (IM1 e IM2), todas rotuladas e registradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA); 4 amostras contendo exclusivamente oleína de palma, sendo 2 amostras (F1-F2) com rótulo e registro (MAPA) e 2 sem tais condições (F3-F4). Considera-se para critério deste estudo, os azeites industrializados os que continham o rótulo e com ausência destes, artesanais ou comuns. Cabe salientar que as baianas de acarajé denominam a oleína como *flor do azeite* e a estearina como *bambá*.

As amostras foram coletadas em suas embalagens originais e mantidas em temperatura ambiente ao abrigo da luz até o momento das análises.

Determinações analíticas

As análises físico-químicas, para todos os tipos de óleos, foram realizadas em triplicata, sendo que os índices de acidez (mg KOH/g), peróxido (mEq/kg) e de refração foram determinados de acordo com Métodos físico-químicos para análise de alimentos, do Instituto Adolfo Lutz⁷.

A análise da cor foi realizada pela escala CIELab, em triplicata, empregando-se colorímetro Minolta CR 400 (Minolta, Osaka, Japão) com iluminante D₆₅, ângulo de observação de 20° e diâmetro da fenda de 11 mm. Onde L* (luminosidade, 0 – escuro e 100 – branco), a* [intensidade de vermelho, variando de verde a vermelho (-a/+a)], b* [intensidade de amarelo, variando de azul a amarelo a (-b/+b)], C* Chroma [(a*² + b*²)^{1/2}], ângulo h_{ab} [arco tangente (b*/a*)] e diferença de cor = DE* = {(DL*)² + (Da*)² + (Db*)²}^{1/2}⁸.

Neste estudo os seguintes parâmetros foram adotados para avaliar a qualidade do óleo de palma bruto: índice de peróxidos menor que 15 mEq/kg; refração (40 °C) entre 1,454 e 1,456, para o óleo bruto com ambas frações e 1,458-1,460 para a amostra contendo apenas oleína; e a acidez máxima de 10 mg KOH/g de óleo^{9,10}.

Análises estatísticas

Para a análise estatística foi utilizado o programa SPSS (*Statistical Product and Service Solutions*) versão

13.0 e as variáveis foram analisadas por meio do teste de correlação de Spearman's, frequência e análises descritivas para estimativa pontual (média e desvio-padrão).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Critérios de seleção das baianas na escolha do óleo de palma para fritura de acarajés

A maior parte das entrevistadas opta pela aquisição de algum óleo proveniente da indústria (48%), seguido daquelas que preferem o azeite artesanal (15%), conforme demonstra a Figura 1a. A aquisição deste óleo é, na maioria das vezes, semanal (58%) (Figura 1b), sendo que este, geralmente, é acondicionado em embalagens do tipo PET ou vidro, ambas reaproveitadas ou recicladas, o que pode afetar a qualidade do óleo¹¹.

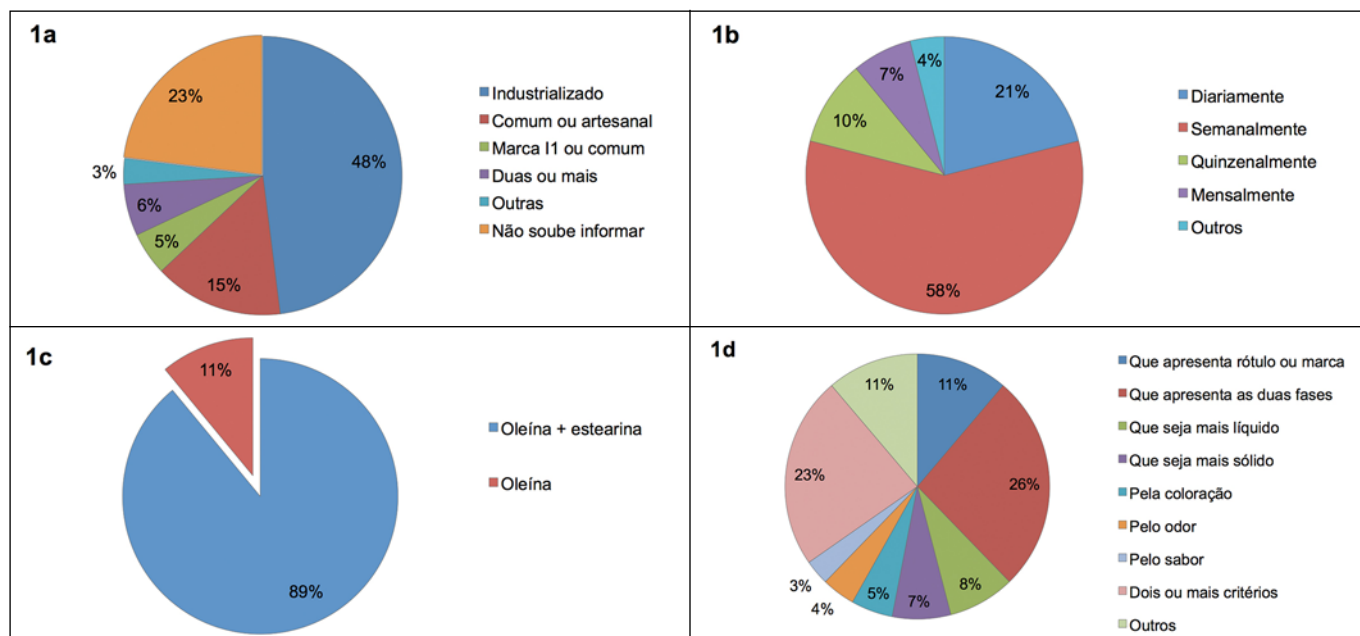
Com relação ao óleo empregado como matéria prima para fritura, 89% das participantes referem utilizar o que contém as duas frações oleína (líquida, insaturada) e estearina (sólida, saturada)¹² (Figura 1c e 1d).

O tipo de óleo empregado na fritura interfere nas reações termoxidativas do mesmo¹³, de modo que a escolha das baianas por um óleo que contenha as duas fases (Figura 1c e 1d), com composição equilibrada entre ácidos graxos saturados e insaturados, possibilita uma maior estabilidade durante a fritura⁶.

Características físico-químicas do óleo de palma bruto

Os resultados da Tabela 1 demonstram elevada disparidade entre os valores das variáveis estudadas. Sabe-se que o óleo nesta região é obtido em seu estado bruto, sendo comercializado em sua fração líquida (oleína) e/ou integral (oleína e estearina). A quantidade de tais frações na embalagem não obedece a nenhum critério de proporcionalidade, apresentando-se como uma suspensão heterogênea com diferentes composições químicas, sendo que a fração sólida deposita-se na parte inferior do recipiente e a líquida acima deste.

De acordo com a Tabela 1, os valores médios para ácidos graxos livres (mg KOH/g), nas amostras analisadas, encontram-se acima do limite estabelecido pela legislação nacional (10 mg KOH/g)¹⁰. A elevação deste índice pode ser decorrente de uma associação de fatores, tais como: processo rudimentar de extração, que expõe o óleo à hidrólise autocatalítica, microbiana e/ou enzimática; mecanismos que têm seus efeitos potencializados pelas precárias condições de colheita, transporte dos frutos, processamento e armazenamento do óleo².



1a: Principais tipos de óleos utilizados pelas baianas; 1b: Frequência com que as baianas compram o óleo; 1c: Preferência das baianas quanto à fração do óleo de palma; 1d: Critérios empregados pelas baianas para selecionar o óleo

Figura 1. Critérios de seleção de óleo de palma para fritura de acarajés

Tabela 1. Análise descritiva das características físico-químicas e coordenadas CIELab (L*, a*, b*, C* e hab) de cor de óleos de palma brutos comercializados na cidade de Salvador

Amostras	Acidez (mg KOH/g)	Índice de peróxidos (mEq/kg)	Índice de refração (40°C)	L*	a*	b*	C*	h _{ab}
Oleína + estearina sem registro								
C1	8,90	2,31	1,4495	41,66	18,60	42,54	46,43	66,39
C2	18,43	1,36	1,4490	41,39	18,67	41,72	45,71	65,86
C3	13,61	3,72	1,4505	48,35	20,93	54,14	58,04	68,86
C4	15,82	2,07	1,4535	38,50	24,73	38,00	45,34	56,95
C5	4,94	2,41	1,4515	41,96	18,71	43,17	47,06	66,56
MÉDIA ± DP	12,34 ± 5,42	2,37 ± 0,86	1,4508 ± 0,00	42,37 ± 3,35	20,33 ± 2,45	43,91 ± 5,61	48,52 ± 4,97	64,92 ± 4,26
Oleína + estearina com registro								
I1	12,84	2,72	1,4535	39,49	18,04	38,84	42,82	65,09
I2	22,19	0,96	1,4505	42,24	20,42	43,80	48,33	65,01
I3	10,15	2,34	1,4535	50,30	24,39	56,60	61,63	66,69
I4	4,08	1,22	1,4535	39,01	25,50	38,56	46,22	56,53
MÉDIA ± DP	12,32 ± 7,53	1,81 ± 0,85	1,4527 ± 0,00	42,76 ± 4,67	22,09 ± 3,10	44,45 ± 7,56	49,75 ± 7,37	63,33 ± 4,11
Blend óleo de soja + oleína								
IM1	21,57	0,50	1,4500	59,75	25,15	72,43	76,67	70,85
IM2	1,03	2,87	1,4590	63,08	14,78	77,01	78,41	79,13
MÉDIA ± DP	11,30 ± 14,52	1,69 ± 1,68	1,4545 ± 0,00	61,42 ± 1,83	19,97 ± 5,68	74,72 ± 2,51	77,54 ± 0,96	74,99 ± 4,54
Oleína com registro								
F11	15,64	1,55	1,4530	59,69	28,19	73,30	78,53	68,97
F12	14,05	1,94	1,4530	59,34	28,52	71,42	76,91	68,24
MÉDIA ± DP	14,85 ± 1,13	1,75 ± 0,28	1,4530 ± 0,00	59,52 ± 0,20	28,36 ± 0,19	72,36 ± 1,03	77,72 ± 0,89	68,61 ± 0,40
Oleína sem registro								
F4	16,00	3,46	1,4530	59,16	27,59	72,66	77,72	69,21
F3	32,60	4,50	1,4520	60,77	24,82	74,03	78,08	71,47
MÉDIA ± DP	24,30 ± 11,74	3,98 ± 0,74	1,4525 ± 0,00	59,97 ± 0,88	26,21 ± 1,52	73,35 ± 0,75	77,90 ± 0,20	70,34 ± 1,24

DP= desvio-padrão

Em relação ao armazenamento, todos os óleos estudados estavam acondicionados em garrafas de vidro transparentes, ou do tipo PET, expostas à luz solar direta, em temperatura ambiente e com prazo de validade de 18 meses (óleos rotulados). Um estudo realizado na Nigéria, país que se assemelha à Bahia no que tange ao tipo de produção e uso culinário do óleo de palma bruto, demonstrou que este tipo de acondicionamento leva a uma maior degradação do óleo¹¹.

Uma pesquisa realizada em Belém do Pará associou o aumento da acidez, de 4,9 mg KOH/g para 32 mg KOH/g de óleo de palma bruto, após 330 dias em tambor plástico, exposto à luz, com a presença de cepas do fungo *Paecilomyces variotii*, que biotransforma o óleo gerando ácidos graxos livres¹⁴. São relevantes os elevados níveis de acidez observados neste estudo, condizentes com outras pesquisas de óleos brutos brasileiros que encontraram teores entre 5,19 – 24,66% em ácido palmítico, chegando a 45%, principalmente quando esses valores são comparados aos dados de estudos internacionais e nacionais^{5,14}. Cabe salientar que a estabilidade oxidativa dos óleos está intimamente relacionada ao grau de insaturação dos mesmos, de maneira que os ácidos graxos insaturados são mais sensíveis à oxidação do que os saturados. Portanto, estes resultados podem estar associados, também, ao fato de que os óleos de palma brasileiros são mais insaturados que os da Malásia e Indonésia, apresentando, maior percentual do ácido oléico 43,16% e menor do ácido palmítico 38,99%¹⁵.

Em contrapartida, todas as amostras apresentaram índice de peróxidos abaixo do limite máximo permitido pela legislação (15mEq/kg)¹⁰, variando de 0,5 a 4,5 mEq/kg. Resultados apresentados por Berger⁵ demonstraram índices de peróxidos variando de 1,94 a 10%, os quais estão de acordo com os resultados da presente pesquisa.

Uma das 15 amostras analisadas apresentou índice de refração acima do recomendado (1,4590)¹⁰ (Tabela 1); tal amostra era composta por um *blend*, da oleína de palma bruta e óleo de soja (IM2), então é de se esperar que um óleo mais insaturado, contenha índice de refração elevado conforme descrito por Malacrida e Jorge³. Os outros valores encontravam-se abaixo da média dos índices verificados em outros estudos com óleo de palma bruto^{6,12}, o que indica que a maior parte da matéria-prima analisada demonstrou comportamento de um óleo que contém maior proporção de ácidos graxos

saturados, fato evidenciado pela correlação inversa entre este índice e a acidez (- 0,658; $p < 0,01$).

É importante ressaltar que não foi observado um índice de refração elevado na amostra que também estava rotulada como óleo de soja + oleína (IM1). É possível supor que a referida amostra não apresentasse/ou contivesse mínimas quantidades de óleo de soja, o que justificaria, também, sua elevada acidez (Tabela 1). Cabe destacar que esta marca é comercializada no mercado com embalagens contendo ou não óleo de soja.

Cor

Os valores médios das coordenadas de cor no espaço CIELab dos óleos analisados estão no quadrante correspondente aos valores positivos para a^* , b^* e L^* , com predomínio de pigmento laranja demonstrado pelos elevados valores de b^* e ângulo de tonalidade próximo a 90° (Tabela 1).

A cor do óleo de palma varia do amarelo claro até o laranja-avermelhado e, é atribuída à quantidade de carotenoides do fruto, além do nível de oxidação provocado pelas lipoxigenases em frutos escurecidos e estocados por longo período antes de serem processados e à oxidação catalisada pelo ferro durante o processamento⁶.

Os óleos com frações apenas de oleína apresentaram-se mais luminosos e com a coloração mais intensa em relação à fração integral (estearina + oleína) (DE= 34,63 unidades). Considerando-se a amostra soja + oleína (IM2), nota-se que a mesma apresenta-se mais luminosa (L^*), brilhante (C^*), amarela (b^* e h^*) e menos vermelha (a^*) em relação a todas as demais, o que indica, mais uma vez, a ausência ou teor mínimo de óleo de soja na amostra IM1.

A análise de correlação entre as características físico-químicas demonstrou uma correlação direta entre a acidez do óleo e a sua luminosidade (L^*) (0,297; $p < 0,05$) e entre a acidez e a cor amarela (b^*) (0,314; $p < 0,05$), sendo que este último parâmetro teve comportamento semelhante em relação ao índice de peróxido (0,311; $p < 0,05$) e este índice também influenciou diretamente o tono (h_{ab}) (0,451; $p < 0,01$).

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, foi observada a heterogeneidade em todos os indicadores analisados, refletindo a falta de controle do processo de produção, embalagem, envase e armazenamento dos

óleos. Ressalta-se a acidez dos mesmos, que ultrapassou o limite estabelecido em 73% das amostras. O consumo de óleos com elevada acidez deve ser evitado, considerando que os ácidos graxos livres podem ser facilmente oxidados, e quando associado às altas temperaturas de fritura, pode ocorrer maior formação de monômeros oxidados, como os epóxidos, cetoácidos e hidroxiácidos, os quais são altamente absorvidos e citotóxicos. Finalmente, é recomendável investimentos por parte das empresas e órgãos governamentais no controle de qualidade dos óleos, além de uma efetiva fiscalização dos órgãos competentes visando à melhoria da alimentação ofertada à população.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pelo financiamento do projeto “Uma imersão no tabuleiro da baiana: o acarajé, o azeite de dendê e seus aspectos sócio-culturais e nutricionais” (processo nº482825/2007-0) e a Associação das Baianas de Acarajés e Mingau (ABAM) da cidade de Salvador.

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Superintendência da Zona Franca de Manaus (SUFRAMA). Potencialidades regionais: estudo de viabilidade econômica do dendê. 2003. [acesso 2008 Out 23]. Disponível em: [http://www.suframa.gov.br/publicacoes/proj_pot_regionais/dende.pdf].
2. Lody R organizador. Dendê símbolo e sabor. São Paulo: Editora SENAC; 2009.
3. Malacrida CR, Jorge N. Influência da relação superfície/volume e do tempo de fritura sobre as alterações da mistura azeite de dendê-óleo de soja. *Ciênc Agrotec*. 2006;30(4):730-42.
4. Camilo VMA, Almeida DT, Araújo PN, Cardoso LA, Andrade JC, Bonelli M. Avaliação da qualidade de óleos e gorduras de fritura em bares, restaurantes e lanchonetes. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2010;69(1):91-8.
5. Berger KG. The use of palm oil in frying. Selangor: Malaysian Palm Oil Promotion Council (MPOPC); 2005 [acesso 2010 Jul 14]. Disponível em: [http://www.mpoc.org].
6. Edem, DO. Palm oil: Biochemical, physiological, nutritional, hematological, and toxicological aspects: a review. *Plant Foods Hum Nutr*. 2002;57:319-41.
7. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo - Brasil). Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 4ª ed. Brasília (DF): ANVISA; 2005.
8. Andreu-Sevilla A, Hartmann EA, Ayas E, Burlo-Carbonell F, Estrella PD, Valverde JM, et al. Mathematical quantification of total carotenoids in Sioma_oil using color coordinates and multiple linear regression during deep-frying simulations. *Eur Food Res Tech*. 2008;22:1283-91.
9. Codex Alimentarius Commission - (Joint FAO/WHO). Codex standard for named vegetable oils, Codex Stan 210 (Amended 2003-2005). Roma; 2003.
10. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 270, 2005. Aprova o Regulamento Técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal. [acesso 2008 Set 21]. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br].
11. Nkpa NN, Osanu FC, Arowolo TJ. Effect of Packaging Materials on Storage Stability of Crude Palm Oil. *J Am Oil Chem Soc*. 1990;67(4):854-7.
12. Gee, PT. Analytical characteristics of crude and refined palm oil and fractions. *Eur J Lipid Sci Techno*. 2007;109:373-9.
13. Jorge N, Bellei BPS, Lunardi VM, Malacrida CMR. Alterações Físico-químicas dos óleos de girassol, milho e soja em frituras. *Quim Nova*. 2005;28(6):947-51.
14. Campinha CMS, Machado CRG, Araújo W. Causa do aumento da acidez do óleo bruto durante o armazenamento. *In: Anais do I Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia do Biodiesel; 2007; Brasília, BR*.
15. Tango JS, Santos LC, Lacaz PA, Turatti JM, Silva MTC, (é necessário colocar o nome dos 6 primeiros autores) et al. Características físicas e químicas do óleo de dendê. *Bol Inst Tec Aliment (ITAL)*. 1981;4(18):509-42.

Microbiological quality of organic and conventional tomatoes

Qualidade microbiológica de tomate convencional e orgânico

RIALA6/1425

Sila Mary Rodrigues FERREIRA^{1*}, Renato João Sossela de FREITAS², Cesar Aparecido da SILVA¹, Elisa Noemberg Lazzari KARKLE³, Thaís Carolina Bassler MAIA⁴

*Endereço para correspondência: ¹Departamento de Nutrição, Universidade Federal do Paraná – UFPR, Av. Prefeito Lothário Meissner, 632, Jd. Botânico - Curitiba/Paraná, Brasil. CEP 80210-170. Tel: (41)33604017. E-mail: sila@ufpr.br, PR Brasil.

²Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná-UFPR.

³Kansas State University, Grain Science and Industry, 785-532-6011, Manhattan - KS, EUA.

⁴Universidade de Cuiabá – UNIC, Mato Grosso, Brasil.

Recebido: 11.03.2011 - Aceito para publicação: 28.08.2011

ABSTRACT

In view of the need to inform the producers, dealers and consumers about the capability of the vegetables in being a vehicle for microorganisms, they should receive suitable hygienic and sanitary treatment. This paper aimed at evaluating the microbiological quality of organic and conventional tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) commercialized in Curitiba city, southern Brazil. Eight samples of conventional tomatoes and four samples of organic tomatoes were collected from different sites. The microbiological analyses for detecting *Salmonella* spp and molds and yeasts were conducted according to the Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods. Total coliforms and *Escherichia coli* were analyzed by the Petrifilm™ methodology. The data were analyzed by variance analysis and Tukey tests. No *Salmonella* sp was isolated from 25 g of tomato samples. The total coliform counts ranged up to 1.4×10^3 CFU/g and *Escherichia coli* up to 2.3×10^2 CFU/g in conventional tomatoes. Yeasts and molds were found in conventional tomato samples up to 2.1×10 , and up to 1.04×10^{12} CFU/g in organic tomato samples. This study clearly shows that the tomatoes ought to receive suitable hygienic and sanitary treatment before being commercialized.

Keywords. organic tomato, conventional tomato, microbiological quality.

RESUMO

Em razão da necessidade de mostrar aos produtores, fornecedores e consumidores que os vegetais são veículos de microrganismos e que devem receber tratamento higiênico-sanitário adequado, o presente estudo avaliou a qualidade microbiológica de amostras de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) orgânico e convencional, comercializados na região metropolitana de Curitiba – Sul do Brasil. Foram coletadas oito amostras de tomate convencional e quatro de tomate orgânico de diferentes locais. A detecção de *Salmonella* spp, fungos e leveduras foi efetuada de acordo com o *Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods*. Para a pesquisa de coliformes totais e *Escherichia coli* foi empregada a metodologia de petrifilm™. Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey. *Salmonella* sp não foi detectada em 25 gramas de amostras de tomate; os coliformes totais variaram até $1,4 \times 10^3$ CFU/g e a *Escherichia coli* até $2,3 \times 10^2$ CFU/g nas amostras de tomate convencional. Os bolores e as leveduras foram isolados das amostras de tomate, cujos valores foram de $2,1 \times 10$ no tomate convencional, e de até $1,04 \times 10^{12}$ UFC/g no tomate orgânico. Este estudo evidenciou a necessidade da realização de tratamento higiênico-sanitário adequado nos tomates antes de sua comercialização.

Palavras-chave. tomate orgânico, tomate convencional, qualidade microbiológica.

INTRODUCTION

The importance in characterizing the hygienic conditions of vegetables and fruits is evident, especially those that are consumed raw, since they act as a vehicle for microorganisms transmission that might cause food intoxication. Sanitation procedures can decrease the presence of microorganisms, thus being a quality control measure in the whole development and manipulation process^{1,2}.

The highest risk of contamination is caused by agricultural practices that involve use of animal and vegetal fertilizers³. The situation is serious in less developed countries, where the use of natural or partially treated fertilizers is a common practice. The risk is even greater in vegetables that grow next near the soil. Besides the natural composition, the soil presents other factors such as moisture, temperature and pH that favor the survival of a large number of microorganisms².

The interest for products of agro-ecological agriculture has been rising over the past years. As a consequence, consumers have an expanded possibility of choosing between products arising from organically grown or conventional products in big city retailers. However, despite the practical difference in the growing systems, consumers have no information about the quality and properties of products grown in different production systems.

The organic system of agriculture has been emerging rapidly. As part of a strategy to sustainable development, there is a tendency of substituting the conventional systems

by organic ones in the area of Curitiba (city in southern Brazil), as a protection measure to the manancial area. Few works^{1,3} have reported the quality characteristics of organic products, specially tomatoes.

Based on the discussion above and on the lack of comparative information on tomato contamination, this work was conducted in order to evaluate the microbiological quality of tomato samples (*Lycopersicon esculentum* Mill) commercialized in Curitiba city, southern Brazil.

MATERIAL AND METHODS

Samples

There were collected of different places, 12 tomatoes samples (*Lycopersicon esculentum* Mill.), being 8 samples of conventionally grown (C) and 4 organically grown (O), commercialized in the area of Curitiba. Four wooden boxes arising from different positions were collected in each commercial point selected (Table 1). The boxes were transported to the laboratory, homogenized in a stainless steel container and fruits from different points were caught. Following a completely randomized design, 5 fruits were collected for the analyses. The time between the collection of the samples and its separation did not take more than 12 hours.

Analysis

The microbiological analyses were conducted according to the Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods⁴ for *Salmonella* spp. and molds and yeasts (CFU/g). For total coliforms (CFU/g) and *Escherichia coli* (CFU/g) the method Petrifilm™ was applied⁵. For the sample preparation was used five tomatoes. From crushed fruits was withdrawal a portion of 25 grams that was diluted in 225 mL of buffered peptone water (BPW) at 0.1%. Preparations of subsequent decimal dilutions were performed in tubes containing 9 mL of the diluent up to 1/1000. The petrifilm™ method, carried out in two stages, was used to determine colony forming units per gram (CFU/g) of total coliforms e *Escherichia coli* at 35 °C for 48 hours⁵. *Salmonella* spp. was detected in four successive steps. The sample contained in the saline peptone water was incubated at 37 °C for 18-24 hours. The sample was transferred to two different tubes of enrichment selective and incubated at 37 °C for 24 hours. After the incubation

Table 1. Samples of organic and conventional tomatoes commercialized in Curitiba city, southern Brazil

Sample ¹	Group	Cultivar	Origin
C1	Oblong, Santa Cruz	cv. Santa Clara	Producer ³
C2	Round, Salad	cv. Raísa (LL) ²	Producer ³
C3	Round, Salad	cv. Raísa (LL) ²	Producer ⁴
C4	Round, Salad	cv. Raísa (LL) ²	Producer ⁴
C5	Oblong, Santa Cruz	cv. Santa Clara	Supermarket
C6	Round, Salad	cv. Carmen (LL) ²	Supermarket
C7	Round, Salad	cv. Carmen (LL) ²	Supermarket
C8	Round, Salad	cv. Raísa (LL) ²	Producer ⁴
O1	Oblong, Santa Cruz	cv. Santa Clara	Producer ⁵
O2	Oblong, Santa Cruz	cv. Santa Clara	Producer ⁶
O3	Oblong, Santa Cruz	cv. Santa Clara	Producer ⁶
O4	Oblong, Santa Cruz	cv. Santa Clara	Producer ⁴

NOTE: (1) Production system: C = Conventional and O = Organic; (2) LL = long life; (3) State supply center = Curitiba; (4) Colombo city; (5) Campo Magro city; (6) Campo Largo city

period, each sample was seeded in plates of Petri with brilliant green agar (BGA) and in *Salmonella Shigella* agar (SS) and, after that, they were incubated again at 37 °C for 24 hours. Since there was no development of colonies it was not necessary the identification of the sort of *Salmonella*⁴. For of count yeasts and molds were used 1 mL aliquots of each dilution were grown using potato dextrose agar (PDA). After the culture medium solidification, the plates were incubated at 30 °C for 48 hours days, and the colonies were quantified⁴.

The standards and criteria for *Salmonella* spp. (absence in 25 g) according to the general legislation for vegetables⁶ since there are no standards specifically for tomatoes. For *Escherichia coli* we followed the standard recommended for faecal coliform (10² CFU/g) in accordance with current legislation for vegetables⁶. For total coliforms (CFU/g) and yeast count, the acceptable limit of <10² was adopted⁷. This count ensures consumer health protection, since counts above 10⁴ CFU/g indicate potentiality to form micotoxins. The results were submitted for variance analysis using the software Excel[®]. The comparison among the averages was performed by Tukey test (p > 0,05).

RESULTS AND DISCUSION

Microbiologic characterization of tomatoes is really important. Since this produce is often consumed raw, there is a strong reason for the increase of the quality control by hygienic monitoring and sanitary practices from harvest to sale.

The results of microbiological analyses of organically grown and conventional tomatoes are demonstrated in Table 2.

The results show that all of the samples presented absence of *Samonella* spp. in 25 g, complying with the Brazilian legislation for vegetables⁶ and confirming the results of Bandekar⁸ and Pingulkar⁹, who found low levels of contamination by this microorganism in vegetables. On the other hand, Nguz et al.³ detected *Salmonella* spp. in 13.3% of fresh-cut organic mixed vegetables analysed.

The conventional tomato samples C1 and C2 and the organic samples O2 and O3 showed a total coliform count above 10² CFU/g (Table 2), indicating poor practices of post-harvest. Results above 10³ CFU/g were also found in fruits and vegetables^{2,3,8,9}. Pingulkar, Kamat and Bongirwar⁹ found total bacterial counts in 10⁴ CFU/g and a higher range of bacterial (10⁶ - 10⁸ CFU/g) counts were

Table 2. Microbiological analysis of conventional and organic tomatoes commercialized in Curitiba city, southern Brazil

Sample	<i>Salmonella</i> spp. (Presence in 25g)	Total coliforms (CFU*/g)	<i>Escherichia coli</i> (CFU/g)	Molds and yeast (CFU/g)
C1	Absence	>1.11x10 ³ a	2.3x10 ² a	5x10 ² a
C2	Absence	1.11x10 ³ a	1x10 ^b	2.8x10 ^b
C3	Absence	1.5x10 ^b	Nd**	3.92x10 ³ b
C4	Absence	3.33x10 ^b	2x10 ^b	1.31x10 ⁴ b
C5	Absence	Nd**	Nd**	2.4x10 ^b
C6	Absence	7.2x10 ^b	7.2x10 ^c	2.1x10 ^b
C7	Absence	Nd**	Nd**	2.2x10 ^b
C8	Absence	15 ^c	Nd**	3.27x10 ⁴ d
O1	Absence	1x10 ^c	1x10 ^b	8x10 ³ c
O2	Absence	1.73x10 ² d	Nd**	1.04x10 ¹ ² e
O3	Absence	1.4x10 ³ a	1x10 ^b	2.47x10 ⁴ d
O4	Absence	Nd**	Nd**	1.11x10 ⁴ d

NOTE: * CFU = Colony-forming unity; **Nd = not detected; a,b,c,d. Values in the same column followed by different superscripts are significantly different (p < 0.05)

noticed in ready-to-eat salads from restaurants. This count is considered high⁶, which indicates that these products need adequate washing before consumption. Although tomatoes are not grown in direct contact with soil, the contamination may occur due to irrigation water and/or contamination during harvest by the handler. It is also a common practice among the workers to place the tomatoes on the ground while waiting the transportation boxes.

Tomato contamination may be caused by the use of wooden boxes, which are reused without proper cleaning and favor microbiological growth. This is considered a favorable condition for fruit contamination since this type of box cannot be sanitized. Once externally contaminated and with no aseptic treatment, the fruit may become a vehicle for human contamination and for contamination of the inner part of the fruit, through cracks caused by injuries. The container used for unprocessed vegetables such as tomatoes can be disposable or returnable. When it is returnable, the box must be resistant to handling and sanitizing, cannot be a contamination vehicle and must follow the specifications of good practices applied to food.

Regarding *Escherichia coli*, only the sample C1 had a count above 10² (CFU/g)⁶. These results are similar to those from other studies about the organic and conventional vegetables^{1,3,8,9}. Nguz et al.³ reported levels of *Escherichia coli* in fresh-cut organic vegetables of up 10³ (CFU/g).

The presence of total coliforms and *Escherichia coli* indicates unsatisfactory hygienic-sanitary conditions

and represents a threat to consumers since this group of microorganisms indicates contamination by human or animal faces.

The molds and yeast count in conventional and organic tomatoes (Table 2) were compared to the limit of 10^2 (UFC/g)⁷, since there is no legal limit for tomatoes or vegetables. The results demonstrate that half of the conventional tomato samples had a count above 10^2 (UFC/g). Similar results were also found for fresh-cut organic vegetables mixed³.

The samples C4, C8, O2, O3 and O4 had yeast count above 10^4 , a potential risk to consumers if not properly washed before raw consumption. Similar results (10^4 CFU/g) were also found for tomatoes by Pingulkar⁹.

Based on the results of the microbiological analyses, it was observed that the counts were higher for organically grown tomatoes. The highest contamination of organic tomatoes might be explained by the use of animal fertilizer, the irrigation water and/or contamination during harvest by the handler.

The results indicate that both organic and conventional tomatoes commercialized in Curitiba city, southern Brazil, need be properly washed before consumption. Also they need of good practices applied to food.

CONCLUSION

Based on the microbiological analyses of organic and conventional tomatoes commercialized in Curitiba city, it can be concluded that: there is no contamination by *Samonella* spp. in both conventional and organic samples; for total coliforms in samples C1, C2, O2 and O3 the count was above 10^2 (CFU/g); only sample C1 has a count above 10^2 (CFU/g) for *Escherichia coli*; half of the conventional samples and all of the organic samples had a yeast and mold counts above 10^2 (CFU/g);

The results confirm the need of a better control of good practices, from the harvest to commercialization of tomatoes. There is also the need of proper sanitation of the product before consumption.

REFERENCES

1. Sagoo SK, Little CL, Mitchell RT. The microbiological examination of ready-to-eat organic vegetables from retail establishments in the United Kingdom. *Lett Appl Microbiol*. 2001;33: 434-9.
2. Silva SRP, Verdin SEF, Pereira DC, Schatkoski AEM, Rott MB, Corção G. Microbiological quality of minimally processed vegetables sold in Porto Alegre, Brazil. *Braz J Microbiol*. 2007;38:594-8.
3. Nguz K, Shindano J, Samapundo S, Huyghebaert A. Microbiological evaluation of fresh-cut organic vegetables produced in Zambia. *Food Control*. 2005;7:623-8.
4. American Public Health Association - APHA. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4th ed. Washington. 2001; p. 1219.
5. Official methods of analysis of the Association Analytical Chemists - AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International, 18th ed. Gaithersburg, Maryland, 2005.
6. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 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, 10 jan. 2001. Seção 1.
7. Reis KC, Pereira J, Valle RHP, Nery FC. Avaliação da qualidade microbiológica de mini-milho (*Zea Mays*) minimamente processado. *Hig aliment*. 2003;17(106):66-8.
8. Bandekar JR, Dhokane VS, Shashidhar R, Hajare S, Ghadge N, Kamat AS, et al. Microbiological quality of carrot, tomato and cucumber from Mumbai market. *J Food Sci Tech*. 2005;42:99-101.
9. Pingulkar K, Kamat A, Bongirwar D. Microbiological quality of fresh leafy vegetables, salad components and ready-to-eat salads: an evidence of inhibition of *Listeria nonocytogenes* in tomatoes. *Int J Food Sci Nutr*. 2001;52:15-23.

Avaliação higiênico-sanitária, através de análises microbiológicas, de alimentos produzidos e comercializados em uma grande rede de hipermercados em Salvador- BA

Silva, AS. *Evaluation of the hygienic-sanitary, through microbiological analyzes, of foods produced and sold in the retail market in a large hypermarket chain in Salvador (Bahia, Brazil)*. Salvador, BA. 2010. [Dissertação de Mestrado - Área de concentração: Segurança Alimentar, Universidad de León em convênio com a Fundação Universitária Iberoamerica – FUNIBER]. Orientador: Eneo Alves Silva Júnior

O presente trabalho traz uma avaliação higiênico-sanitária de alimentos produzidos e comercializados no varejo, sendo utilizado como parâmetro as análises microbiológicas no período de 2008 a 2009 e tendo como objeto de estudo 03 lojas de uma grande rede de hipermercados em Salvador – BA. Para isso, foram analisadas amostras de alimentos prontos para o consumo segundo a metodologia de pesquisa aprovada pela Legislação Brasileira, RDC 12/ANVISA. No ano de 2008 foram analisadas 160 amostras, sendo que 14% (22) estavam insatisfatórias. No ano de 2009 houve um incremento no número de amostras analisadas (174 amostras), bem como no número de amostras classificadas como insatisfatórias 21% (36). Os resultados obtidos evidenciaram que tanto em 2008 (14%; 3,2%) quanto em 2009 (20,8%; 8,7%) os indicadores sanitários (coliformes a 45 °C, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp, *Clostridium* SR (Sulfito Redutor) a 46 °C, *Staphylococcus* coagulase positiva) foram prevalentes em relação aos indicadores higiênicos (contagem padrão em placas, bolores e leveduras, coliformes a 35 °C), respectivamente. No quadro comparativo dos anos de 2008 e 2009 observou-se que o maior percentual encontrado referia-se aos coliformes a 45°C com \approx 10,5% (35), seguidos da *Salmonella* sp com \approx 2,7% (9); do *Bacillus cereus* com \approx 2,1% (7); *Clostridium* SR a 46°C com \approx 1,2% (4); *Listeria monocytogenes* com \approx 0,6% (2) e *Staphylococcus* coagulase-positiva com \approx 0,3% (1). São estudados de forma detalhada dois grupos de alimentos, classificados pela RDC 12/ANVISA como alimentos prontos para o consumo, os itens: 18 – produtos de confeitaria, lanchonete, padarias e similares, doces e salgados – prontos para o consumo; e 22 – pratos prontos para o consumo (alimentos prontos de cozinhas, restaurantes e similares). Verificou-se que nestes dois anos (2008/2009) os alimentos prontos para o consumo apresentaram predominantemente a contaminação por coliformes a 45 °C ou coliformes fecais seguidos do *Bacillus cereus*. A presença tanto dos coliformes a 45 °C como do *Bacillus cereus* refletem entre outras coisas que as condições sanitárias na manipulação estão inadequadas. Com base nos resultados apresentados, conclui-se que apesar dos resultados das amostras analisadas excederem os valores de Tolerância para Amostra Indicativa conforme a RDC12/ANVISA estes números ainda estão abaixo dos valores capaz de causar uma toxinfecção alimentar. Estes microrganismos indicam que a condição de manipulação no processamento dos alimentos necessita ser revista, devido às falhas nos pontos críticos de controle, seja nos métodos de higienização, ou na técnica envolvendo os tempos e as temperaturas de segurança.

Palavras-chave. higiene dos alimentos, segurança alimentar, análises microbiológicas.

Dissertação disponível na Biblioteca da
Fundação Universitária Iberoamerica – FUNIBER, Florianópolis/SC.
E-mail: alessandrasantiago@hotmail.com

Produção de monoacilgliceróis e diacilgliceróis ricos em ácidos graxos ômega-3 a partir da glicerólise enzimática de óleo de peixe

Feltes, MMC. **Production of monoacylglycerols and diacylglycerols rich in omega-3 fatty acids by means of enzymatic glycerolysis of fish oil.** Florianópolis, SC, 2011. [Tese de doutorado – Área de concentração: Engenharia de Alimentos. Laboratório de Engenharia Bioquímica, Departamento de Engenharia Química e de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina]. Orientador: Jorge Luiz Ninow. Co-orientadora: Débora de Oliveira

O objetivo deste estudo foi apresentar novas informações experimentais para a obtenção de emulsificantes (monoacilgliceróis e/ou diacilgliceróis) por meio da glicerólise de óleo de peixe em diferentes sistemas (livre de solvente e de surfactante, na presença de *tert*-butanol ou contendo surfactante de grau alimentício), utilizando-se a lipase Novozym® 435 como catalisador. Entre os surfactantes testados (Tween 60, Tween 65, Tween 80 e lecitina de soja), o Tween 65 foi escolhido para o aprofundamento do estudo no meio contendo este aditivo, com o intuito de melhorar o contato entre os substratos imiscíveis (óleo e glicerol) e a enzima. Entretanto, análises prévias verificaram que a lipase testada pode agir sobre todos os surfactantes avaliados. Nas reações de glicerólise testadas, o efeito de parâmetros de processo relevantes (concentração de enzima, temperatura, proporção molar de glicerol e óleo, proporção de solvente, concentração de surfactante) para a produção dos emulsificantes desejados foi avaliado em todos os meios reacionais. Para todos os sistemas, as condições da glicerólise mostraram-se importantes para a obtenção dos produtos desejados. Apesar de a reação de glicerólise ter sido viável em meio livre de solvente e de surfactante, foi necessário um longo tempo de reação (24 h) para a obtenção de quantidades satisfatórias de mono- (25,93% m/m) e diacilgliceróis (38,24% m/m). Estes teores foram obtidos em reação conduzida a 70 °C em banho-maria do tipo Dubnoff, com 5% de lipase (em massa, em relação ao total de substratos) e com a proporção molar de glicerol e óleo de 1:1. Foi possível produzir 43,30% e 43,10% de diacilgliceróis em meios contendo, respectivamente, 1:1 (v/v) de *tert*-butanol e 5% (m/m em relação ao total de substratos) de Tween 65. As reações para os dois sistemas foram conduzidas a 70 °C, durante 2 h sob agitação mecânica, utilizando-se a proporção molar de glicerol:óleo de 1:1 e 15% de lipase (m/m). Este estudo descreveu a viabilidade da produção de monoacilgliceróis e/ou diacilgliceróis enriquecidos em EPA e DHA, utilizando-se diferentes meios reacionais.

Palavras-chave. lipase, monoacilgliceróis, diacilgliceróis, óleo de peixe, ômega-3.

Tese disponível no site <http://www.tede.ufsc.br/teses/PEAL0147-T.pdf>
E-mail: mmanuelafeltes@hotmail.com

Financiamento: Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica do Estado de Santa Catarina (FAPESC), Chamada Pública Universal nº 07/2009 (Auxílio financeiro).

Errata

RIAL 70(3), 2011

Página 252

Onde se lê: Maria ELVIRA (coluna 2, último parágrafo... Passados vinte anos...)

Leia-se: Maria ELISA

Página 424

Keywords. rubella, isolation, polymerase chain reaction, epidemiology, genotypes.

■ COLABORADORES

Agradecimentos aos relatores

O Corpo Editorial agradece a todos os relatores abaixo relacionados que, com seu trabalho voluntário e anônimo ao longo de 2011 contribuíram para o bom andamento das atividades e elevação do nível dos artigos publicados pela Revista.

- **Adelaide Del Pino Beleia** Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Londrina, PR
- **Adriana Torres Silva e Alves** Instituto de Tecnologia de Alimentos, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Laticínios. Campinas, SP
- **Adriano Gomes da Cruz** Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Tecnologia de Alimentos. Campinas, SP
- **Afonso de Liguori Oliveira** Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária. Departamento de Tecnologia e Inspeção. Belo Horizonte, MG
- **Aida Couto Dinucci Bezerra** Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Nutrição, Departamento de Alimentos e Nutrição. Cuiabá, MT
- **Alaíse Gil Guimarães** Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, Departamento de Análises Bromatológicas. Salvador, BA
- **Alba Lucia Andrade Coelho Nisida** Instituto de Tecnologia de Alimentos, Centro de Tecnologia de Hortifrutícolas. Campinas, SP
- **Alceu Afonso Jordão Junior** Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Clínica Médica. Ribeirão Preto, SP
- **Alessandra Santos Lopes** Universidade Federal do Pará, Instituto de Tecnologia, Faculdade de Engenharia de Alimentos. Belém, PA
- **Alexandre da Trindade Alfaro** Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus de Francisco Beltrão. Francisco Beltrão, PR
- **Alexandre Tourino Mendonça** Universidade Vale do Rio Verde. Três Corações, MG
- **Alice Eiko Murakami** Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Zootecnia. Maringá, PR
- **Alice Momoyo Sakuma** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Materiais de Referência. São Paulo, SP
- **Amanda Latércia Tranchez Dias** Universidade Federal de Alfenas, Instituto de Ciências Biomédicas, Laboratório de Microbiologia. Alfenas, MG
- **Ana Carolina Ritter** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Ciência dos Alimentos, Laboratório de Toxicologia Ambiental. Porto Alegre, RS
- **Ana Célia Ruggiero** Universidade Metodista de Piracicaba, Faculdade de Ciências Exatas e da Natureza. Piracicaba, SP
- **Ana Flávia Santos Coelho** Fundação Universidade Federal do Tocantins, Engenharia de Alimentos, Laboratório de Microbiologia de Alimentos. Palmas, TO
- **Ana Lúcia da Silva Corrêa Lemos** Instituto de Tecnologia de Alimentos, Centro de Tecnologia de Carnes. Campinas, SP
- **Anamaria Mello Miranda Paniago** Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Clínica Médica. Campo Grande, MS
- **Anderlise Borsoi** Universidade Tuiuti do Paraná. Curitiba, PR
- **Anderson Junger Teodoro** Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Departamento de Tecnologia de Alimentos. Rio de Janeiro, RJ
- **Anderson Marliere Navarro** Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Clínica Médica. Ribeirão Preto, SP
- **Anderson de Souza Sant'Ana** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Laboratório de Microbiologia de Alimentos. São Paulo, SP
- **Andrea Troller Pinto** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva. Porto Alegre, RS
- **Andreimar Martins Soares** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas. Ribeirão Preto, SP
- **Angelo Berchieri Junior** Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal, SP
- **Antonio Hugo José Fróes Campos** Fundação Antonio Prudente, Hospital do Câncer AC Camargo, Departamento de Anatomia Patológica. São Paulo, SP
- **Antonio Silvio do Egito Vasconcelos** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos. Sobral, CE
- **Aroldo Arévalo Pinedo** Fundação Universidade Federal do Tocantins, Engenharia de Alimentos. Palmas, TO

- **Aurélia Santos Faraoni** Universidade Federal de Sergipe. São Cristóvão, SE
- **Bianca Ramos Marins** Fundação Oswaldo Cruz, Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio. Rio de Janeiro, RJ
- **Carla de Oliveira Rosas** Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Departamento de Microbiologia, Setor de Alimentos. Rio de Janeiro, RJ
- **Carla Rosane Barboza Mendonça** Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Ciências Domésticas, Departamento de Ciência dos Alimentos. Pelotas, RS
- **Carlos Augusto Bastos de Souza** Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Serviço de Ginecologia e Obstetrícia. Porto Alegre, RS
- **Carmem Lygia Burgos Ambrósio** Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória. Vitória de Santo Antão, PE
- **Carmen Etsuko Kataoka Higaskino** Instituto de Tecnologia do Paraná, Departamento de Soluções Tecnológicas, Laboratório de Microbiologia. Curitiba, PR
- **Caroline Dellinghausen Borges** Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Ciências Domésticas, Departamento de Ciência dos Alimentos. Pelotas, RS
- **Cecilia Cristina Marques dos Santos** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Laboratórios Regionais. São José do Rio Preto, SP
- **Célia Maria Carvalho Pereira Araujo Romão** Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Departamento de Microbiologia. Rio de Janeiro, RJ
- **Christiane Bertachini Lombello** Universidade Federal do ABC, Centro de Engenharia, Modelagem e Ciências Sociais Aplicadas. Santo André, SP
- **Christiane Maciel Vasconcellos Barros De Rensis** Universidade Norte do Paraná. Londrina, PR
- **Christiane Soares Pereira** Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Departamento de Bacteriologia. Rio de Janeiro, RJ
- **Cibele Cristina Osawa** Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Rio de Janeiro, RJ
- **Cid Aimbiré de Moraes Santos** Universidade Federal do Paraná, Departamento de Farmácia, Setor de Ciências da Saúde. Curitiba, PR
- **Cintia Guarienti** Instituto Federal Farroupilha. Santo Augusto, RS
- **Clarissa Damiani** Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia, Departamento de Tecnologia de Alimentos. Goiânia, GO
- **Claudia Saunders** Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Nutrição Josué de Castro. Rio de Janeiro, RJ
- **Clícia Maria de Jesus Benevides** Universidade do Estado da Bahia, Centro de Ciências da Saúde e dos Alimentos, Departamento de Ciências da Vida. Salvador, BA
- **Daisy Pontes Netto** Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva. Londrina, PR
- **Déborah Inês Teixeira Fávoro** Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares, Laboratório de Análise por Ativação Neutrônica. São Paulo, SP
- **Denise Rocco de Sena** Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo. Vitória, ES
- **Dermânio Tadeu Lima Ferreira** Faculdade Assis Gurgacz. Cascavel, PR
- **Deusdélia Teixeira Almeida** Universidade Federal da Bahia, Escola de Nutrição, Departamento de Ciência dos Alimentos. Salvador, BA
- **Divani Maria Capuano** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Laboratórios Regionais. Taubaté, SP
- **Djalva Maria da Nobrega Santana** Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos. Seropédica, RJ
- **Edimir Andrade Pereira** Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, PR
- **Edna Froeder Arcuri** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite. Juiz de Fora, MG
- **Edna Regina Amante** Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Florianópolis, SC
- **Eduardo Alexis Lobo Alcayaga** Universidade de Santa Cruz do Sul, Departamento de Biologia. Santa Cruz do Sul, RS
- **Eduardo Ramirez Asquieri** Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Farmácia, Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Laboratório de Química dos Alimentos. Goiânia, GO
- **Elaine Cristina Pinto Moreschi** Companhia Industrial e Comercial Brasileira de Produtos Alimentares Nestlé, Nestlé São Paulo, Centro de Garantia da Qualidade. São Paulo, SP
- **Elayse Maria Hachich** Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. São Paulo, SP
- **Elfriede Marianne Bacchi** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia. São Paulo, SP
- **Eliana Badiale Furlong** Universidade Federal do Rio Grande, Escola de Química e Alimentos, Laboratório de Ciência de Alimentos. Rio Grande, RS

- **Eliane Gil Rodrigues de Castro** Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Hospital das Clínicas, Instituto da Criança, Centro de Assistência Toxicológica. São Paulo, SP
- **Elizabeth A. Accioly** Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Nutrição “Josué de Castro”, Departamento de Nutrição e Dietética. Rio de Janeiro, RJ
- **Elza Iouko Ida** Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Londrina, PR
- **Ernesto Hofer** Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Zoonoses Bacterianas. Rio de Janeiro, RJ
- **Euzenir Nunes Sarno** Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Hanseníase. Rio de Janeiro, RJ
- **Fabiano Cleber Bertoldi** Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina, Estação Experimental de Itajaí. Itajaí, SC
- **Felipe Rabello Lourenço** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia. São Paulo, SP
- **Fernando Augusto Curvello** Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Zootécnica, Departamento de Produção Animal. Seropédica, RJ
- **Geni Rodrigues Sampaio** Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Nutrição. São Paulo, SP
- **Gerson Antonio Pianetti** Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Departamento de Produtos Farmacêuticos. Belo Horizonte, MG
- **Giselda Macena Lira** Universidade Federal de Alagoas, Faculdade de Nutrição. Maceió, AL
- **Glaucia Celeste de Souza Amancio** Fundação Ezequiel Dias, Divisão de Vigilância Sanitária, Serviço de Ciências Bioquímicas, Laboratório de Biologia Molecular. Belo Horizonte, MG
- **Glândara Aparecida de Souza Martins** Fundação Universidade Federal do Tocantins, Engenharia de Alimentos, Laboratório de Microbiologia e Bioprocessos. Palmas, TO
- **Graciette Matioli** Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Farmácia e Farmacologia. Maringá, PR
- **Gutemberg de Melo Rocha** Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Biologia Celular, Molecular e Biagentes Patogênicos. Ribeirão Preto, SP
- **Héctor Henrique Ferreira Koolen** Universidade Federal do Amazonas, Conselho de Ensino e Pesquisa, Departamento de Química. Manaus, AM
- **Heitor Daguer** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Laboratório Nacional Agropecuário, Serviço Laboratorial Avançado. São José, SC
- **Helena Rodrigues Lopes** Universidade Federal Fluminense, Instituto Biomédico, Centro de Ciências Médicas. Niterói, RJ
- **Heloísa Werneck de Macedo** Universidade Federal Fluminense, Faculdade de Medicina, Departamento de Patologia. Niterói, RJ
- **Heryka Myrna Maia Ramalho** Universidade Potiguar. Natal, RN
- **Ingrid Cabral Machado** Instituto de Pesca, Centro Avançado da Pesquisa Tecnológica do Agronegócio do Pescado Marinho. Santos, SP
- **Isa Beatriz Noll** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Ciência dos Alimentos, Laboratório de Toxicologia Ambiental. Porto Alegre, RS
- **Ivo Mottin Demiate** Universidade Estadual de Ponta Grossa, Setor de Ciências Agrárias e de Tecnologia, Departamento de Engenharia de Alimentos. Ponta Grossa, PR
- **Jane Martha Gratton Mikcha** Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências de Saúde, Departamento de Análises Clínicas. Maringá, PR
- **Jean Pierre Rosier** Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina, Estação Experimental de Videira. Videira, SC
- **Jesus Nazareno Silva de Souza** Universidade Federal do Pará, Faculdade de Engenharia de Alimentos. Belém, PA
- **João Andrade da Silva** Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Nutrição, Laboratório de Nutrição Experimental. João Pessoa, PB
- **João Evangelista Fiorini** Universidade José do Rosário Vellano, Instituto de Farmácia e Nutrição, Departamento de Biologia, Laboratório de Biologia e Fisiologia de Micro-organismos. Alfenas, MG
- **João Carlos de Oliveira Tortora** Universidade Gama Filho, Centro de Ciências Biomédicas. Rio de Janeiro, RJ
- **João Vicente Neto** Escola Agrotécnica Federal de Cáceres. Cáceres, MT
- **Jocelem Mastrodi Salgado** Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Departamento de Agricultura. Piracicaba, SP
- **Joelma Pereira** Universidade Federal de Lavras, Departamento de Ciência dos Alimentos, Laboratório de Grãos, Raízes e Tuberculos. Lavras, MG
- **José Artur Bogo Chies** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Departamento de Genética, Laboratório de Imunogenética. Porto Alegre, RS

- **José Torquato de Queiroz Tavares** Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas. Cruz das Almas, BA
- **Jonas Gruber** Universidade de São Paulo, Instituto de Química, Departamento de Química Fundamental. São Paulo, SP
- **Karin Correa Scheffer Ferreira** Instituto Pasteur, Seção de Diagnóstico. São Paulo, SP
- **Karina Braga Gomes Borges** Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. Belo Horizonte, MG
- **Karla Silva Ferreira** Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Laboratório de Tecnologia de Alimentos. Campos dos Goytacazes, RJ
- **Kesia Diego Quintaes** Universidade Federal de Ouro Preto, Escola de Nutrição. Ouro Preto, MG
- **Larissa Canhadas Bertan** Universidade Federal da Fronteira Sul. Laranjeiras do Sul, PR
- **Larissa Lagoa Ribeiro Furtini** Universidade Federal de Lavras, Departamento de Ciência dos Alimentos. Lavras, MG
- **Leonor Almeida de Souza Soares** Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande, RS
- **Lilian Viana Teixeira** Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Departamento de Tecnologia e Inspeção. Belo Horizonte, MG
- **Lucia Ferro Bricks** Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Hospital das Clínicas, Instituto da Criança. São Paulo, SP
- **Luciana Cadioli Panchoni** Universidade Estadual do Norte do Paraná, Faculdade Luiz Meneghel. Bandeirantes, PR
- **Luciana Maria Ramires Esper** Universidade Federal Fluminense, Faculdade de Farmácia, Departamento de Bromatologia, Laboratório de Controle Microbiológico de Alimentos. Niterói, RJ
- **Luciano José Quintão Teixeira** Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Engenharia Rural. Alegre, ES
- **Luiz Francisco Zafalon** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa de Pecuária do Sudeste. São Carlos, SP
- **Luiz Henrique Beirão** Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Florianópolis, SC
- **Luis Roberto Batista** Universidade Federal de Lavras, Departamento de Ciência dos Alimentos, Laboratório de Microbiologia de Alimentos. Lavras, MG
- **Luiz Simeão do Carmo** Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia. Belo Horizonte, MG
- **Maisa Ribeiro Pereira Lima Brigagão** Universidade Federal de Alfenas, Departamento de Ciências Exatas. Alfenas, MG
- **Marcello Otake Sato** Universidade Federal de Tocantins, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia. Araguaina, TO
- **Márcia Cassimira Marcos da Costa** Fundação Ezequiel Dias, Divisão de Vigilância Sanitária, Laboratório de Resíduos de Pesticidas. Belo Horizonte, MG
- **Márcia de Aguiar Ferreira** Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Brasília, DF
- **Márcia de Mello Luvielmo** Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Ciência dos Alimentos. Pelotas, RS
- **Márcia Elena Zanutto** Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde. Vitória da Conquista, BA
- **Márcia Helena de Rizzo da Matta** Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Departamento de Química. Campo Grande, MS
- **Márcia Monks Jantzen** Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Ciência dos Alimentos. Pelotas, RS
- **Marco Antonio Moreira Furtado** Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica, Departamento de Alimentos e Toxicologia. Juiz de Fora, MG
- **Marcondes Viana da Silva** Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Departamento de Estudos Básicos e Instrumentais, Núcleo de Estudos em Ciência de Alimentos. Itapetinga, BA
- **Marcone Augusto Leal de Oliveira** Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química. Juiz de Fora, MG
- **Marcos Antonio Gonçalves Munhoz** Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Hospital das Clínicas, Divisão de Laboratório Central. São Paulo, SP
- **Marcos dos Santos Lima** Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano. Petrolina, PE
- **Marcos Franke Pinto** Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina Veterinária, Departamento de Apoio a Produção e Saúde Animal. Araçatuba, SP
- **Marcos Vinicius da Silva** Instituto de Infectologia Emílio Ribas. São Paulo, SP
- **Maria Aparecida Nicoletti** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia. São Paulo, SP

- **Maria Claudia Dantas Porfirio Borges** Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Departamento de Microbiologia. Goiânia, GO
- **Maria de Fátima Costa Pires** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Procedimentos Interdisciplinares, Núcleo de Microscopia Eletrônica. São Paulo, SP
- **Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha** Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Departamento de Microbiologia e Imunologia. Botucatu, SP
- **Maria Goreth Pinheiro Chaves** Laboratório Central de Saúde Pública. Goiânia, GO
- **Maria Helena Gaíva Gomes da Silva** Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Nutrição, Departamento de Alimentos e Nutrição. Cuiabá, MT
- **Maria Ines de Moura Sarquis** Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de Coleção de Cultura de Fungos. Rio de Janeiro, RJ
- **Maria Inês Zanoli Sato** Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. São Paulo, SP
- **Maria Judite Bittencourt Fernandes** Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal, Laboratório de Biologia Celular. São Paulo, SP
- **Maria Luiza Bazzo** Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas, Laboratório de Biologia Molecular e Micobactérias. Florianópolis, SC
- **Maria Lucia Masson** Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico, Departamento de Engenharia Química, Setor de Tecnologia. Curitiba, PR
- **Maria Nogueira Marques** Instituto Tecnológico e de Pesquisas do Estado de Sergipe. Aracaju, SE
- **Maria Petronilia Oliveira Hellqvist** Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar, Laboratório de Macroalgas. Fortaleza, CE
- **Maria Spinola Miranda** Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, Departamento de Análises Bromatológicas. Salvador, BA
- **Maria Teresa de Alvarenga Freire** Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia de Alimentos. Pirassununga, SP
- **Marialice Pinto Coelho Silvestre** Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Departamento de Alimentos, Laboratório de Bromatologia. Belo Horizonte, MG
- **Mário Sérgio Mantovani** Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Geral. Londrina, PR
- **Marta Fonseca Martins Guimarães** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite. Juiz de Fora, MG
- **Martha Zavariz de Miranda** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Trigo. Passo Fundo, RS
- **Mauricio Morishi Ogusku** Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Coordenação de Pesquisas em Ciências da Saúde, Laboratório de Micobacteriologia. Manaus, AM
- **Michele Hoeltz** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Ciência dos Alimentos. Porto Alegre, RS
- **Milton Luiz Pinho Espírito Santo** Universidade Federal do Rio Grande, Escola de Química e Alimentos. Rio Grande, RS
- **Mirian Ribeiro Leite Moura** Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, Departamento de Produtos Naturais e Alimentos. Rio de Janeiro, RJ
- **Moacir Evandro Lage** Universidade Federal de Goiás, Departamento de Medicina Veterinária, Centro de Pesquisas em Alimentos. Goiânia, GO
- **Myrna Sabino** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Contaminantes, Núcleo de Contaminantes Orgânicos. São Paulo, SP
- **Nancy da Rós** Instituto Butantan, Divisão de Desenvolvimento Tecnológico e Produção. São Paulo, SP
- **Neiva Deliberali Rosso** Universidade Estadual de Ponta Grossa, Departamento de Química, Setor de Ciências Exatas e Naturais. Ponta Grossa, PR
- **Nelcindo Nascimento Terra** Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos. Santa Maria, RS
- **Nelma de Mello Silva Oliveira** Universidade José do Rosário Vellano, Laboratório de Biologia e Fisiologia de Microrganismo, Alfenas MG
- **Nilson Evelázio de Souza** Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Exatas, Departamento de Química. Maringá, PR
- **Patricia Sartorelli** Universidade Federal de São Paulo. Diadema, SP
- **Paula Araujo Opromolla** Coordenadoria de Controle de Doenças, Centro de Vigilância Sanitária. São Paulo, SP
- **Paula Bernadete de Moura Ferreira** Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, DF
- **Paulo Afonso Lopes** Instituto Militar de Engenharia, Seção de Engenharia de Construção. Rio de Janeiro, RJ
- **Paulo Cezar Bastianello Campagnol** Instituto Federal do Triângulo Mineiro. Uberaba, MG

- **Paulo Sérgio Marcellini** Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Departamento de Tecnologia de Alimentos. Rio de Janeiro, RJ
- **Pedro Luiz Silva Pinto** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Parasitologia e Micologia, Núcleo de Enteroparasitas. São Paulo, SP
- **Priscila Alonso dos Santos** Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano. Rio Verde, GO
- **Rafaella de Andrade Mattietto** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Agroindústria. Belem, PA
- **Raquel Gouvea** Universidade Federal Fluminense, Centro de Ciências Médicas, Departamento de Tecnologia de Alimentos. Niterói, RJ
- **Regilda Saraiva dos Reis Moreira Araujo** Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Nutrição. Teresina, PI
- **Regina Baptista dos Reis** Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Nutrição, Departamento de Alimentos e Nutrição. Cuiabá, MT
- **Regina Coeli de Oliveira Torres** Laboratório Central de Saúde Pública, Divisão de Produtos e Meio Ambiente. Florianópolis, SC
- **Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira** Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Engenharia de Pesca. Fortaleza, CE
- **Renata Golin Bueno Costa** Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Centro Tecnológico Instituto de Laticínios Cândido Tostes. Juiz de Fora, MG
- **Renato Souza Cruz** Universidade Estadual de Feira de Santana, Departamento de Tecnologia. Feira de Santana, BA
- **Ricardo Targino Moreira** Universidade Federal da Paraíba, Centro de Tecnologia, Departamento de Tecnologia Química e de Alimentos. João Pessoa, PB
- **Ryzia de Cássia Vieira Cardoso** Universidade Federal da Bahia, Escola de Nutrição, Departamento de Ciência dos Alimentos. Salvador, BA
- **Roberta Targino Pinto Correia** Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química. Natal, RN
- **Roberto Dimenstein** Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Biociências, Departamento de Bioquímica. Natal, RN
- **Rosa Helena Luchese** Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos. Seropédica, RJ
- **Rosane da Silva Rodrigues** Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Ciências Domésticas, Departamento de Ciências dos Alimentos. Pelotas, RS
- **Rosângela Andréa Van Laere Borioli** ZorgSaam de Honte Zeeuws Vlaanderen, Klinisch Laboratorium. Terneuzen, Holanda
- **Rosemary Aparecida de Carvalho** Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia de Alimentos. Pirassununga, SP
- **Rozane Marcia Triches** Prefeitura Municipal de Dois Irmãos, Secretaria de Educação, Setor de Alimentação Escolar. Dois Irmãos, RS
- **Rupércio Alvares Caçado** Greensky Consultoria e Assessoria Alimentícia. Curitiba, PR
- **Samanta Cristine Grassi Almeida** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Imunologia. São Paulo, SP
- **Sandra Maria Pinto** Universidade Federal de Lavras, Departamento de Ciência dos Alimentos. Lavras, MG
- **Sara Ramos da Silva** Instituto Federal do Espírito Santo. Vitória, ES
- **Sila Mary Rodrigues Ferreira** Universidade Federal do Paraná, Departamento de Nutrição. Curitiba, PR
- **Silvana Magalhães Salgado** Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Nutrição. Recife, PE
- **Silvia Conceição Reis Pereira Mello** Centro Universitário Augusto Motta. Rio de Janeiro, RJ
- **Simone Cristina Marques** Universidade Federal de Lavras, Departamento de Biologia. Lavras, MG
- **Solange de Paula Ramos** Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Histologia. Londrina, PR
- **Sonia Machado Rocha Ribeiro** Universidade Federal de Viçosa, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Nutrição e Saúde. Viçosa, MG
- **Taciana Fernandes Souza Barbosa** Instituto Evandro Chagas. Ananindeua, PA
- **Tania Sueli Andrade** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Procedimentos Interdisciplinares, Núcleo de Coleção de Micro-organismos. São Paulo, SP
- **Tarso Ledur Kist** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências. Porto Alegre, RS
- **Tatiana Saldanha** Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos. Seropédica, RJ
- **Tatiana Valesca Rodriguez Alicio** Universidade Federal de Pelotas, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos. Pelotas, RS
- **Tereza Cristina Marinho Jorge** Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas. Cascavel, PR
- **Terezinha de Jesus Andreoli Pinto** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia. São Paulo, SP
- **Valdeni Terezinha Zani** Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Porto Alegre, RS
- **Vanessa Dias Capriles** Universidade Federal de São Paulo. Santos, SP

- **Vanessa Pires da Rosa** Universidade Federal de Santa Maria, Colégio Agrícola Frederico Westphalen. Frederico Westphalen, RS
- **Veronica Elisa Pimenta Vicentini** Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Celular e Genética. Maringá, PR
- **Verônica Ortiz Alvarenga** Universidade Federal de Rondônia. Ariquemes, RO
- **Victor Eduardo Arrúa Arias** Centro de Referência da Saúde da Mulher Hospital Pérola Byington, Núcleo de Patologia. São Paulo, SP
- **Viviani Ruffo de Oliveira** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina. Porto Alegre, RS
- **Zelyta Pinheiro de Faro** Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória. Vitória de Santo Antão, PE

Agradecimento especial pela revisão do inglês

Dra. Mirthes Ueda

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 9605 contra crimes ambientais, a Lei Federal 6638/76 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.

I. CATEGORIA DE ARTIGOS

1.1 ARTIGOS ORIGINAIS: Incluem estudos relacionados à prevenção e controle de agravos e à promoção à saúde. Devem ser baseados em novos dados ou perspectivas relevantes para saúde pública. Cada artigo deve conter objetivos e hipóteses claras, desenho e métodos utilizados, resultados, discussão e conclusões.

INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES:

▪ Devem ter até 20 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.

- As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 05 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.
- As referências bibliográficas, limitadas a 40, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.
- Os resumos em português e em inglês (*abstract*) devem ter até 200 palavras, com a indicação de 3 a 6 palavras-chave (*keywords*).

A estrutura dos artigos originais de pesquisa é a convencional: Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão e Conclusão, embora outros formatos possam ser aceitos, mas respeitando a lógica da estrutura de artigos científicos.

1.2 ARTIGOS DE REVISÃO: Dedicados à apresentação e à discussão de temas de interesse científico e de relevância para a saúde pública. Devem apresentar formulação clara de um objeto científico de interesse, argumentação lógica, crítica teórico-metodológica dos trabalhos consultados e síntese conclusiva. Devem ser elaborados por pesquisadores com experiência no campo em questão ou por especialistas de reconhecido saber.

Informações complementares:

- Devem ter até 25 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.
- As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 03 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.
- As referências bibliográficas, limitadas a 50, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.
- Os resumos em português e em inglês (*abstract*) devem ter até 200 palavras, com a indicação de 3 a 6 palavras-chave (*keywords*).

1.3 COMUNICAÇÕES BREVES: São relatos sucintos destinados à rápida divulgação de eventos significativos no campo da pesquisa de interesse em saúde pública e que não comportam uma análise mais abrangente.

Informações complementares:

- Devem ter até 10 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.
- As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 02 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.
- As referências bibliográficas, limitadas a 15, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.
- Os resumos em português e em inglês (*abstract*) devem ter até 200 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (*keywords*).
- Sua apresentação deve acompanhar as mesmas normas exigidas para artigos originais.

1.4 NOTAS CIENTÍFICAS: São relatos sucintos destinados à rápida divulgação de eventos relevantes de uma pesquisa experimental que justifique a publicação de resultados parciais.

Informações complementares:

- Devem ter até 06 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.
- As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 02 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.
- As referências bibliográficas, limitadas a 10, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.
- Os resumos em português e em inglês (*abstract*) devem ter até 200 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (*keywords*).
- Sua apresentação deve acompanhar as mesmas normas exigidas para artigos originais, porém na forma de texto único.

1.5 RELATOS DE CASO: São textos que contemplam principalmente a área médica, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada.

Informações complementares:

- Devem ter até 03 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.
- As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 02 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.

- As referências bibliográficas, limitadas a 10, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.
- Os resumos em português e em inglês (*abstract*) devem ter até 200 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (*keywords*).
- Devem apresentar Introdução, Relato de caso, Discussão e Conclusão, na forma de texto único.

1.6 RESUMOS DE TESES E DISSERTAÇÕES: São aceitos resumos de teses e dissertações até um ano após a defesa.

Informações complementares:

- Devem ter até 400 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (*keywords*).
- Sua apresentação deve conter o nome do autor e do orientador, título do trabalho em português e em inglês, nome da instituição em que foi apresentado, área de concentração e ano da defesa.

2. APRESENTAÇÃO DO MANUSCRITO: Os textos devem ser redigidos em processador de texto *Word for Windows* 2003 ou compatível, no formato A4, espaço duplo, fonte *Times New Roman*, tamanho 12. Devem ser evitados arquivos compactados. A estrutura do manuscrito deve estar em conformidade com as normas do Sistema Vancouver – Título; Autores e Instituições; Resumo e Abstract; Introdução; Material e Métodos; Resultados; Discussão; Conclusão; Agradecimentos; Referências; Tabelas; Figuras e Fotografias.

2.1 PÁGINA DE IDENTIFICAÇÃO: Deve constar:

Título em português e em inglês: O título deve ser conciso, completo e conter informações. Se o manuscrito for submetido em inglês, deve ser fornecido um título em português.

Autores: De acordo com o *International Committee of Medical Journal Editors* (ICMJE), são considerados autores aqueles que contribuíram substancialmente para a concepção e planejamento, ou análise e interpretação dos dados; contribuíram significativamente na elaboração do rascunho ou na revisão crítica do conteúdo e participaram da aprovação da versão final do mesmo. Somente a aquisição de financiamento, a coleta de dados ou supervisão geral de grupos de pesquisa não justificam autoria – maiores esclarecimentos sobre autoria podem ser encontrados na página do ICMJE (<http://www.icjme.org>). Deve constar o nome completo, sem abreviações e com último sobrenome em caixa alta (exemplo: Ana Maria Camargo da SILVA) e o e-mail do autor responsável. O autor responsável para troca de correspondência deve estar assinalado com asterisco (*) e apresentar também o endereço completo.

Afiliação: Deve ser indicada a instituição à qual cada autor está afiliado, na seguinte ordem de hierarquias institucionais de afiliação: laboratório, setor, seção, serviço, divisão, departamento, instituto, faculdade e universidade.

Financiamento da pesquisa: Se a pesquisa foi subvencionada, indicar o tipo de auxílio, o nome da agência financiadora e o respectivo número do processo.

Apresentação prévia: Quando baseado em tese ou dissertação, indicar o nome do autor, título, ano, nome do programa de pós-graduação e instituição onde foi apresentada. Quando apresentado em evento científico, indicar o nome do evento, local e ano da realização.

2.2 PREPARO DO MANUSCRITO:

Resumo/Abstract: Todos os textos deverão ter resumos em português e inglês, dimensionados para ter até 200 palavras. Como regra geral, o resumo deve incluir objetivos do estudo, principais procedimentos metodológicos, principais resultados e conclusões.

Palavras-chave/keywords: Devem ser indicados entre 3 a 6 descritores do conteúdo, extraídos do vocabulário Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) da Bireme (disponível em <http://www.bireme.br>) nos idiomas português e inglês. Em inglês, com base no *Medical Subject Headings* (MeSH).

Caso não sejam encontrados descritores adequados para a temática do manuscrito, poderão ser indicados termos não existentes nos conjuntos citados.

Estrutura do texto:

A) Introdução: Deve ser breve, relatando o contexto e a justificativa do estudo, apoiados em referências pertinentes ao objetivo do manuscrito, sintetizando a importância e destacando as lacunas do conhecimento abordadas. Não deve incluir dados ou conclusões do estudo em referência

B) Material e Métodos: Os procedimentos adotados devem ser descritos claramente, bem como as variáveis analisadas, com a respectiva definição, quando necessária, e a hipótese a ser testada. Devem ser descritas a população e a amostra, instrumentos de medida, com a apresentação, se possível, de medidas de validade e conter informações sobre a coleta e processamento de dados. Deve ser incluída a devida referência para os métodos e técnicas empregados, inclusive os métodos estatísticos; métodos novos ou substancialmente modificados devem ser descritos, justificando as razões para seu uso e mencionando suas limitações. Os critérios

éticos da pesquisa devem ser respeitados; os autores devem explicitar que a pesquisa foi conduzida dentro de padrões éticos e foi aprovada por comitê de ética, indicando o nome do comitê de ética, número e data do registro.

C) Resultados: Devem ser apresentados em uma sequência lógica, iniciando-se com a descrição dos dados mais importantes. Tabelas e figuras devem ser restritas àquelas necessárias para argumentação e a descrição dos dados no texto deve ser restrita aos mais importantes. Os gráficos devem ser utilizados para destacar os resultados mais relevantes e resumir relações complexas. Dados em gráficos e tabelas não devem ser duplicados nem repetidos no texto. Os resultados numéricos devem especificar os métodos estatísticos utilizados na análise.

D) Discussão: A partir dos dados obtidos e resultados alcançados, os novos e importantes aspectos observados devem ser interpretados à luz da literatura científica e das teorias existentes no campo. Argumentos e provas baseadas em comunicação de caráter pessoal ou divulgadas em documentos restritos não podem servir de apoio às argumentações do autor. Tanto as limitações do trabalho quanto suas implicações para futuras pesquisas devem ser esclarecidas. Incluir somente hipóteses e generalizações baseadas nos dados do trabalho. As conclusões podem finalizar essa 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.

Henington 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. [acesso 2008 nov 25]. 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 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:



www.rspress.com.br



Instituto Adolfo Lutz



SECRETARIA
DA SAÚDE



ISSN 0073-9555

