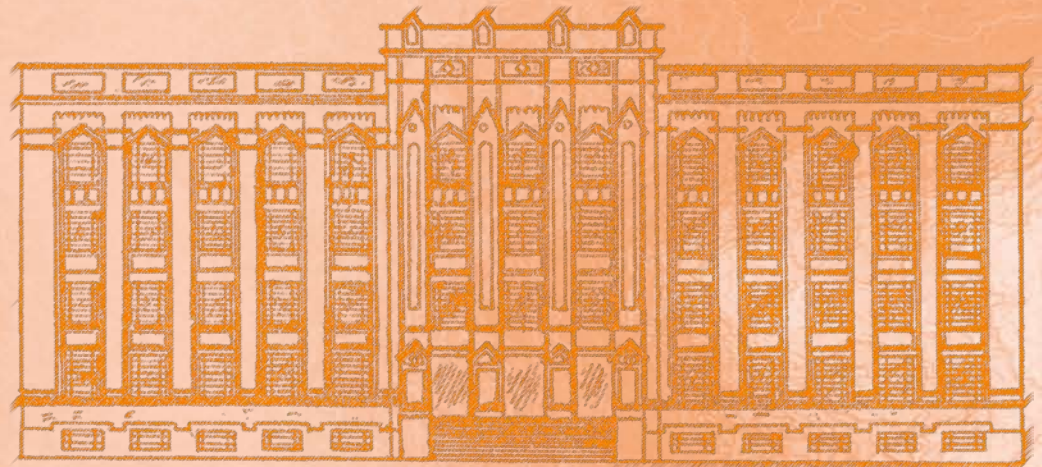


REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

ISSN 0073-9855
RIALA6



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE

Volume 70 número 2, 2011



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

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Volume 70 número 2, 2011
Abril - Junho 2011

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

Diretor Geral do Instituto Adolfo Lutz

Alberto José da Silva Duarte

Editor Chefe

Adriana Bugno

Editor Adjunto

Luis Fernando de Macedo Brígido

Editores Assistentes

Christiane Asturiano Ristori Costa

Jacqueline Tanury Macruz Peresi

Lucile Tiemi Abe Matsumoto

Márcia Liane Buzzo

Maria Helena Iha

Maria Helena Martini

Miriam Solange Fernandes Caruso

Neuza Kasumi Shirata

Raquel dos Anjos Fazioli

Núcleo de Acervo

Rocely Aparecida Bueno Moita

Conselho Editorial / Editorial Board

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

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

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

1941
2011, 70(2)

ISSN 0073-9855 CDD₁₈ 614.07205

RIALA 6
ISSN 1983-3814 versão *on line*
ISSN 2176-3844 CD-ROM

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

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

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

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

<http://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:



■ ARTIGO ORIGINAL/ORIGINAL ARTICLE

- 1350 HAART therapy does not reduce the proteinase and phospholipase secretion by oral *Candida albicans* isolated from HIV-positive patients**
A terapia HAART não reduz a secreção de proteinase e fosfolipase por isolados bucais de *Candida albicans* de pacientes HIV positivos
Graziella Nuernberg BACK-BRITO, Vivian Narana Ribeiro EL ACHKAR, Aline Lopes GARBIM, Rogério de Lima ROMEIRO, Antonio Olavo Cardoso JORGE, Ivan BALDUCCI, Cristiane Yumi KOGA-ITO 101-105
- 1351 Rabies virus viability after short-term cryopreservation using cryoprotectant agents**
Viabilidade de vírus da Raiva após criopreservação de curto-prazo com uso de agentes crioprotetores
EDMARA CHAVES COSTA, MARIA FÁTIMA DA SILVA TEIXEIRA, TEREZA D'ÁVILA DE FREITAS AGUIAR, BENEDITO NEILSON ROLIM, PHYLLIS CATHARINA ROMIJN, MARCOS FÁBIO GADELHA ROCHA..... 106-112
- 1352 Avaliação de resíduos de agrotóxicos em arroz e feijão e sua contribuição para prevenção de riscos à saúde da população consumidora**
Survey of pesticide residues in rice and beans and its contribution to prevention of human health risks of consumers
VERA REGINA ROSSI LEMES, TEREZA ATSUKO KUSSUMI, VIVIANE EMI NAKANO, SONIA BIA ROCHA, MARIA CELESTE CARDEAL DE OLIVEIRA, MARCELA PIZA RODRIGUES, JOSÉ INALDO ALMEIDA RIBEIRO..... 113-121
- 1353 Otimização e validação de metodologia analítica para determinação de flavonóis e flavonas por CLAE em pólen apícola utilizando-se Análise de Superfície de Resposta**
Optimization and validation of HPLC methodology for determining flavonols and flavones in bee pollen by surface methodology
MÁRCIA CRISTINA TEIXEIRA MARTINS, DELIA RODRIGUEZ-AMAYA, MARCELO ANTONIO MORGANO, MARIA ISABEL RODRIGUES 122-131
- 1354 Análise físico-química de méis de abelhas africanizada e nativa**
Physical-chemical analysis of honeys from africanized and native bees
EMANUEL NETO ALVES DE OLIVEIRA, DYEGO DA COSTA SANTOS..... 132-138
- 1355 Identificação e avaliação da resistência antimicrobiana de leveduras em vegetais minimamente processados**
Identification and evaluation of antimicrobial resistance of yeast in minimally processed vegetables
ANA PAULA MACIEL PEREIRA, CATHERINE HIRSCH WERLE, TÂNIA MARIA VINTURIM GONÇALVES, FERNANDO LEITE HOFFMANN..... 139-143
- 1356 Avaliação da qualidade microbiológica de *sashimis* a base de salmão, preparados em restaurantes especializados em culinária japonesa**
Microbiological quality of salmon-based sashimi prepared at restaurants specialized in japanese food
MARCELO JOSTMEIER VALLANDRO, THAIS DE CAMPOS, DANIEL PAIM, MARISA CARDOSO, LIRIS KINDLEIN 144-150
- 1357 Avaliação da qualidade microbiológica no processamento de pescados**
Microbiological evaluation of quality in fish processing
CONSUELO LIMA SOUSA, JOSÉ DE ARIMATÉIA FREITAS, LÚCIA DE FÁTIMA HENRIQUES LOURENÇO, EDER AUGUSTO FURTADO ARAUJO, JESUS NAZARENO SILVA DE SOUZA..... 151-157

-
- 1358 Avaliação das características físico-químicas e colorimétricas de vinhos finos de duas principais regiões vinícolas do Brasil**
 Evaluation of physicochemical and colorimetric characteristics of fine wines from two main vineyards regions of Brazil
 LUISA COSTA DE OLIVEIRA, SARA OLIVEIRA DE SOUZA, MARIA EUGÊNIA DE OLIVEIRA MAMEDE..... 158-167
- 1359 Physical and chemical characteristics and lycopene retention of dried tomatoes subjected to different pre-treatments**
 Características físicas, químicas e retenção de licopeno em tomates secos submetidos a diferentes pré-tratamentos
 WILSON CÉSAR DE ABREU, MARIA DE FÁTIMA PÍCCOLO BARCELOS, EDSON PABLO SILVA,
 EDUARDO VALÉRIO DE BARROS VILAS BOAS..... 168-174
- 1360 Avaliação sensorial e físico-química de pescado processado**
 Sensory and physico-chemical evaluation of processed fish
 MARIA DO CARMO ANDION FARIAS, JOSÉ DE ARIMATÉA FREITAS 175-179
- 1361 Effect of different ingredients contents on physical, physicochemical and sensory properties of the creamy banana marmalade cv. 'nanica' (*Musa cavendishii*)**
 Efeito dos diferentes teores de ingredientes nas propriedades físicas, físico-químicas e sensoriais de doce de banana cremoso cv. 'nanica' (*Musa cavendishii*)
 PATRICIA APARECIDA PIMENTA PEREIRA, ANIRENE GALVÃO TAVARES PEREIRA, SORAIA VILELA BORGES, LUISA PEREIRA FIGUEIREDO, WANDERSON ALEXANDRE VALENTE, MARALI VILELA DIAS, FABIANA QUEIROZ..... 180-184
- 1362 Propriedade das frações protéicas de cultivares de arroz, aveia e trigo**
 Properties of protein fraction of rice, oat and wheat cultivars
 FERNANDA ARNHOLD PAGNUSSATT, JAQUELINE GARDA-BUFFON, LUIZ CARLOS GUTKOSKI,
 ELIANA BADIÁLE-FURLONG..... 185-192
- 1363 Ocorrência de nitratos e nitritos em queijos Minas Frescal, Mussarela, Parmesão e Prato**
 Occurrence of nitrate and nitrite in cheeses Minas Frescal, Mozzarella, Parmesan and Prato
 JANILSON FERNANDES GONÇALVES, WEMERSON DE CASTRO OLIVEIRA, CLAUDIA APARECIDA DE OLIVEIRA E SILVA,
 MARIEM RODRIGUES RIBEIRO CUNHA, FLAVIO RODRIGUES PEREIRA 193-198
- 1364 Rapid analysis for predicting the expansion of the *polvilho azedo***
 Análises rápidas para prever a expansão do polvilho azedo
 MARIA JANETE ANGELONI MARCON, DIEGO JACOB KURTZ, MARCELO MARASCHIN,
 VALÉRIA REGINATTO, EDNA REGINA AMANTE..... 199-205
- 1365 Efeitos da formulação láctea à base de flocos de abóbora e inulina sobre o crescimento e desenvolvimento de ratos após desmame**
 Effects of milk-based formulation of pumpkin flakes and inulin on growth and development of rats after weaning
 ANDRÉA CARLA MENDONÇA DE SOUZA, SILVANA MAGALHÃES SALGADO, ALDA VERÔNICA SOUZA LIVERA,
 FRANCISCA MARTINS BION, SAMARA ALVACHIAN CARDOSO ANDRADE, KARINA CORREIA DA SILVEIRA,
 ZELYTA PINHEIRO DE FARO, NONETE BARBOSA GUERRA 206-212
- 1366 Baixo consumo habitual de alimentos fonte de vitamina E em população infantil**
 Low habitual consumption of food sources of vitamin E in the child population
 RAFAELA CRISTHINE PORDEUS LUNA, CHRISTIANE CARMEM COSTA DO NASCIMENTO, GEOVANNA TORRES DE PAIVA BANDEIRA,
 ADYLA FARIAS DE OLIVEIRA, MUSSARA GOMES CAVALCANTE ALVES MONTEIRO, FERNANDA PATRÍCIA TORRES BARBOSA,
 TARCIANE MARINHO ALBUQUERQUE, ANA HERMÍNIA DE ANDRADE E SILVA, RONEI MARCOS DE MORAES,
 ROBERTO TEIXEIRA LIMA, MARIA JOSÉ DE CARVALHO COSTA 213-219

■ COMUNICAÇÃO BREVE/BRIEF COMMUNICATION

1367 Monitoramento da concentração de íons fluoreto na água destinada ao consumo humano proveniente de um município com diferentes sistemas de abastecimento público

Monitoring the fluoride ions concentration in water for human consumption from a municipality with different public water supply systems

ROSÂNGELA AGUILAR DA SILVA, MATEUS HENRIQUE PETRARCA, ROBERTO COSTA SANTOS, ISABEL TACACO YAMAMOTO, LILIAN REGINA MACELLONI MARQUES..... 220-224

1368 Teores de β -caroteno e vitamina C durante o amadurecimento da manga “UBÁ” (*Mangifera indica* L. var. Ubá)

β -carotene and vitamin C content during maturation of “UBÁ” mango (*Mangifera indica* L. var. Ubá)

GARDÊNIA MÁRCIA SILVA CAMPOS MATA, DANIELA DA SILVA OLIVEIRA, CERES MATTOS DELLA LUCIA, FLÁVIA MILAGRES CAMPOS, JOSÉ HUMBERTO DE QUEIROZ, HELENA MARIA PINHEIRO-SANT'ANA..... 225-229

1369 Avaliação da adequação às boas práticas em unidades de alimentação e nutrição

Evaluation of good practices procedures in food services

MÍRIAM ALMEIDA FERREIRA, JACKLINE FREITAS BRILHANTE DE SÃO JOSÉ, ANA PAULA BATISTA TOMAZINI, HÉRCIA STAMPINI DUARTE MARTINI, REGINA CÉLIA DE MIRANDA MILAGRES, HELENA MARIA PINHEIRO-SANT'ANA 230-235

1370 Efeito do congelamento sobre a concentração de retinol em fígado de codorna

Effect of freezing procedure on the retinol concentration in liver quail

ROBERTO DIMENSTEIN, MÁRCIA MARÍLIA GOMES DANTAS, VIDEANNY VIDENOV ALVES DOS SANTOS, HERYKA MYRNA MAIA RAMALHO 236-239

■ RESUMOS DE TESES E DISSERTAÇÕES

Anticorpo monoclonal de alta eficiência no desenvolvimento de imun química aplicada - análise de ocratoxina em vinho

Monoclonal antibody with high efficiency in the development of applied immunochemistry - analysis of OTA in wine

SILVA DLD..... 240

Determinação de bifenilos policlorados em leite em pó e ingestão diária estimada por pré-escolares

Determination of polychlorinated biphenyls in powdered milk and estimated daily ingestion in pre-scholars.

COELHO, AN..... 241

Molecular typing of strains of vancomycin-resistant *Enterococcus* spp isolated in hospitals in the city of Sao Paulo in the period 1999 to 2008

Tipagem molecular de cepas de *Enterococcus* spp resistentes à vancomicina, isoladas em hospitais da cidade de São Paulo, no período de 1999 a 2008.

SACRAMENTO AG..... 242

Caracterização e propriedades funcionais de óleos extraídos de castanhas e nozes

Characterization and functional properties of oils extracted from nuts and walnuts

COSTA, T 243

■ ERRATA 244

■ INSTRUÇÕES AOS AUTORES..... 245-250

HAART therapy does not reduce the proteinase and phospholipase secretion by oral *Candida albicans* isolated from HIV-positive patients

A terapia HAART não reduz a secreção de proteinase e fosfolipase por isolados bucais de *Candida albicans* de pacientes HIV positivos

RIALA6/1350

Graziella Nuernberg BACK-BRITO, Vivian Narana Ribeiro EL ACHKAR, Aline Lopes GARBIM, Rogério de Lima ROMEIRO, Antonio Olavo Cardoso JORGE, Ivan BALDUCCI, Cristiane Yumi KOGA-ITO*

*Endereço para correspondência: Department of Social Dentistry, São José dos Campos Dental School, Universidade Estadual Paulista, Av. Eng. Francisco José Longo, 777, Jardim São Dimas, São José dos Campos/SP, Brasil. CEP 12245-000. Tel.: 12 3947-9033. E-mail: cristiane@fosjc.unesp.br.

Recebido: 23.02.2010 – Aceito para publicação: 30.06.2011

ABSTRACT

Production of exoenzymes, specifically the proteinase and phospholipase, is considered one of the most important of pathogenicity mechanisms of *C. albicans*, which is crucial for tissue invasion. This study aimed at evaluating the production of these exoenzymes in 50 oral *C. albicans* isolates from HIV-positive (HIV+) patients treated with highly active anti-retroviral therapy (HAART), and from 50 control individuals. For testing the production of phospholipase and proteinase, the culture media containing egg yolk and bovine albumin were used, respectively. The results were obtained by measuring the diameter of the colony and divided by the diameter of colony plus the precipitation zone, defined as Pz. Data were statistically analyzed by Student's t test (5%). Statistically significant difference ($p = 0.001$) was observed between the mean values of Pz for proteinase in isolates from HIV+ patients ($Pz = 0.358 \pm 0.295$) and from control group ($Pz = 0.660 \pm 0.370$). The same results were observed for phospholipase production ($Pz = 0.399 \pm 0.227$ for HIV+ group; $Pz = 0.635 \pm 0.292$ control group). Both enzymes were highly produced by *C. albicans* isolated from HIV+ patients when compared with those secreted by *C. albicans* obtained from control group, suggesting that HAART did not reduce the secretion of these enzymes by this pathogenic fungus infecting HIV+ patients.

Keywords. *Candida albicans*, HIV, proteinase, phospholipase, oral cavity.

RESUMO

A produção de proteinase e fosfolipase é considerada como um dos principais mecanismos de patogenicidade de *C. albicans*, pois essas enzimas são importantes na invasão tecidual. Este estudo avaliou a produção dessas exoenzimas de 50 isolados bucais de *C. albicans* de pacientes HIV positivos (HIV+), sob tratamento com terapia antirretroviral altamente ativo (HAART), e dos isolados de 50 indivíduos controle. Para os testes de fosfolipase e proteinase, foram empregados meios de cultura contendo, respectivamente, gema de ovo e albumina bovina. Os resultados foram obtidos pela medida do diâmetro da colônia dividida pela somatória do diâmetro da colônia e do halo de precipitação, definido como Pz. Os dados foram analisados pelo teste t de Student. Houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0.001$) entre os valores médios de Pz para a proteinase obtida do grupo HIV+ ($Pz = 0,358 \pm 0,295$) e controle ($Pz = 0,660 \pm 0,370$). O mesmo foi observado para a produção de fosfolipase ($Pz = 0,399 \pm 0,227$ grupo HIV+; $Pz = 0,635 \pm 0,292$ controle). Os isolados de *C. albicans* provenientes dos pacientes HIV+ apresentaram maior produção de fosfolipase e proteinase em relação ao controle, o que indicou que a terapia HAART não reduziu a secreção dessas enzimas pelos isolados dos pacientes HIV+.

Palavras-chave. *Candida albicans*, HIV, fosfolipase, proteinase, cavidade bucal.

INTRODUCTION

Candida spp. are commensal members of the normal oral microbiota, and can be isolated from around 40% of human healthy population¹⁻³. Hence, isolation of *Candida* in the oral cavity is no confirming evidence of infection and must be taken along with clinical indicators¹.

The transformation of *Candida* from its innocuous into the parasitary form depends on virulence factors of the microorganism, predisposing factors of the host, and of the environment, i.e. the presence of prostheses⁴.

Candida is the main group related to superficial and systemic fungi infections⁵. Oral candidosis occurs among over 95% of patients with AIDS, being recognized as an important marker of that disease and its progression, being a frequent cause of morbidity and mortality in those patients⁶⁻⁸.

Enzymatic activity is considered to be a pathogenicity mechanism of *Candida*, as they are important in tissue invasion. *C. albicans* secretes several enzymes such as phospholipase, lipase, phosphomonoesterases and proteinases^{4,5}.

Proteinase is mainly produced by the most pathogenic species, as *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* and *C. parapsilosis*, that supports the idea that the secretion of proteinases is a virulence-related factor⁹⁻¹². The secreted aspartyl proteinase (SAPs) degrades many human proteins on the lesion site, as albumin, hemoglobin and secretory immunoglobulin A (IgA-s). The proteolytic activity has been associated with tissue invasion¹³. Naglik et al.¹¹ reported that the expression of Sap-family genes is related to the co-regulation of other virulence factors, such as the biofilm formation, adherence, filamentation, in addition to pervasion, tissue invasion, nutrition and interaction with the host's immune system functions. Samaranyake et al.⁴ reported that *C. albicans* isolates from HIV-positive patients showed greater proteinase activity in rats than isolates from HIV-negative individuals.

Phospholipases act by cleaving the phospholipids, affecting the stability of the membrane and causing cell lysis. They seem to be connected to production of germinative tubes, transition into hyphal forms, and tissue injury. Phospholipase production is concentrated on the tips of the hyphae, and the productive activity is greater when the hypha is in direct contact with the membrane, what shows that the extra-cell phospholipases are relevant in tissue invasion from *C. albicans*¹³⁻¹⁵.

The term anti-retroviral highly active anti-retroviral therapy (HAART) is used when there is an association of three or more anti-retroviral drugs with different mechanisms of action. In the literature, it is reported that with this form of therapy, the oral manifestations have decreased, because this practice promotes inhibition of viral replication, redistribution and restoration of immunity, resulting in an increase in CD4 cells counts^{4,16}.

Considering that *C. albicans* is associated to several facts that demand attention, especially whenever related to AIDS¹⁷, the evaluation of proteinase and phospholipase production is relevant to express pathogenicity. This way, the aim of the present study was two-fold. First, to verify the effect of HAART therapy on exoenzymes production by *Candida albicans* oral isolates. Also, to compare the phospholipase and proteinase production by *C. albicans* oral isolates from HIV-positive patients and control individuals.

MATERIAL AND METHODS

Fifty (n = 50) isolates of *C. albicans* from HIV-positive patients and fifty (n = 50) from control individuals, previously isolated from oral rinses. Forty-five individuals (23 female and 22 male), aged from 22 to 66 years, HIV-positive diagnosed by ELISA and confirmed by Western-blot, in treatment at the Day Hospital of Taubaté Medical School and using a highly active anti-retroviral therapy for at least one year were included in the study. Regarding the treatment, it was not possible to evaluate a fixed therapy protocol for all patients because the treatment strategy changes according to the CD4 lymphocyte level and viral load as well as other relevant clinical variables, such as the occurrence of opportunistic diseases and adverse reactions to medication.

For the control group, 45 healthy individuals aged from 23 to 66 years, and with similar conditions in relation to age, gender, prosthesis use and oral conditions to the HIV-positive individuals were selected among the patients under treatment at São José dos Campos Dental School, São Paulo State University. Patients with diabetes *mellitus* or other systemic diseases, pregnant women, smokers, denture or orthodontic devices users and individuals under treatment with antimicrobials/antifungals during the last 60 days that preceded the sampling or with lesions of oral candidosis were excluded.

Oral rinses samples were collected from HIV-positive patients and control individuals in a previous study¹⁸ approved by the Local Ethics Committee (protocol number 012-PH/CEP) (Local Ethics Committee 012-PH/CEP). Phenotypical identification included germ tube formation in bovine serum, growth in corn meal-Tween 80 agar, fermentation and assimilation of carbohydrates^{19,20}. Isolates identified phenotypically as *C. albicans*/*C. dubliniensis* were submitted to molecular detection of *C. dubliniensis*. These isolates were analyzed by polymerase chain reaction (PCR), according to the methodology proposed by Donnelly et al.²¹ and Mähns et al.²², with modifications. For the present study, only *C. albicans* isolates were included.

For the phospholipase and proteinase testings, culture media containing egg yolk and bovine albumin, respectively, according to Price et al.²³ and Rüchel et al.²⁴ were used. First, the samples were plated onto Sabouraud agar (Difco, Detroit, USA), 24 hours before the experiment and incubated at 37 °C. After growth, the samples were inoculated in the culture media for the testing, by inoculation in five equidistant points. The plates were incubated at 37 °C for 5 days.

Presence of phospholipase production was observed by the formation of an opaque area around the colony (indicating calcium precipitation, so called precipitation zone), and enzymatic activity was measured according to Price et al.²³. These authors define Pz as the colony diameter (dc) divided by the colony diameter plus the precipitation zone (dp) ($Pz = dc/dc+dp$). Presence of proteinase was verified as the formation of a halo around the colony, and enzymatic activity was measured as reported also by this author, through the Pz value. Pz values were classified considering no activity when $Pz = 1.0$; positive activity, when $1.0 < Pz < 0.64$ and strongly positive, when $Pz < 0.64$. Data were statistically analyzed by Student's t test (5%).

RESULTS

There was statistically significant difference ($p = 0.001$) between mean Pz values for proteinase obtained for the HIV group ($Pz = 0.358 \pm 0.295$) and control group ($Pz = 0.660 \pm 0.370$). The same was verified about production of phospholipase (HIV group $Pz = 0.399 \pm 0.227$; control group $Pz = 0.635 \pm 0.292$) ($p = 0.001$) (Table 1).

Comparing the mean Pz values for phospholipase and proteinase enzymes for the control group, the values are

Table 1. Mean values according to the enzymes and studied groups (HIV and control groups)

Enzyme	HIV	Control	p-value
	Mean ± SD	Mean ± SD	
Phospholipase	0.399 ± 0.227	0.635 ± 0.292	$p = 0.001^*$
Proteinase	0.358 ± 0.295	0.660 ± 0.370	$p = 0.001^*$

SD = standard deviation

*The table shows the statistically significant difference according to the enzymes and studied groups (HIV and control groups) by Pz values mean

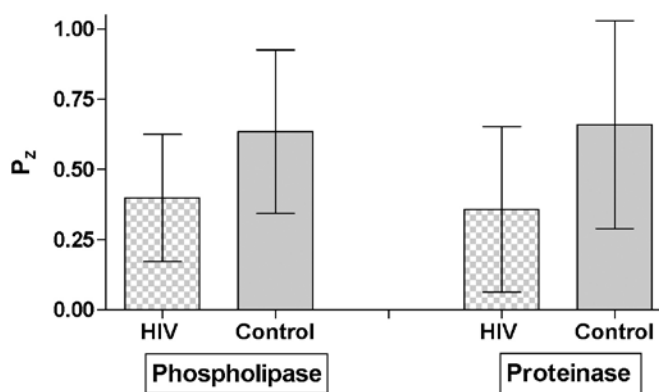


Figure 1. Comparing the mean Pz values for phospholipase and proteinase enzymes for the HIV and control groups

closer to the $\geq 0.64 < 1.00$ interval, that indicates positive enzymatic activity. On the other hand, for the HIV group, the Pz mean figures are lower than 0,64, indicating strongly positive enzymatic activity for both enzymes (Figure 1).

In the HIV group, for proteinase, 82% of the isolates were classified as strongly positive enzymatic activity, and 18% negative; in the control group, 48% were strongly positive, and 52% negative. For phospholipase, in the HIV group, 70% were strongly positive, 16% positive and 14% negative. In the control group, 62% were strongly positive and 38% negative. The Figure 1 shows the mean values of Pz and standard deviation for each studied group.

DISCUSSION

The development process of an infection depends on the relationship between microorganism virulence and the host's ability in preventing or resisting to the microbial invasion/colonization^{9,13}. Virulence factors expressed by *C. albicans* are quite variable and depend

on the infection type, stage and location, as well as on the host's response. *C. albicans* presents high adaptation ability in the host organism and this suggests the presence of virulence factors different from other non-pathogenic fungi⁹. A number of potential virulence factors have been reported, as adherence factors, formation of germ tubes, hyphae/pseudohyphae production and extracellular proteolytic activity^{13-15,25-27}. Phospholipase can play an important role in host's tissue invasion in candidosis lesions, breaking the lipid membrane of epithelial cells and facilitating the hyphae penetration into cytoplasm. Proteinase production increases the ability of the fungus in colonizing and penetrating the host tissue, destroying a number of proteins that are relevant for the host's defence, such as immunoglobulins, complement and cytokines²⁷.

The enzymatic production of *Candida* spp. isolated from several anatomical locations was evaluated by Kantarcioglu e Yücel²⁷, who reported 78.9% enzymatic activity for proteinase and 62.1% for phospholipase in the studied isolates. A total of 93.3% of *C. albicans* isolates produced phospholipase and 95% produced proteinase. In the present study, 82% of the isolates from HIV-positive patients and 48% from control individuals produced proteinase. Phospholipase activity was observed in 86% of the isolates from HIV group and 62% from the control group. In a study including children with AIDS¹⁷, the authors reported that *C. albicans* oral isolates showed higher proteinase and phospholipase production when compared to control group.

Ribeiro et al.²⁸ analyzed *C. albicans* isolates from Down's syndrome children and verified that 96% of the samples produced phospholipase, while 80% of the samples from the control group were positive to the same enzyme. Candido et al.²⁹ analyzed 79 clinical *Candida* oral isolates from patients with clinical evidence of oral candidosis and verified that 83.3% and 66.7%, respectively, produced phospholipase and proteinase enzymes. The same authors analyzed patients without clinical indicators of oral candidosis and verified that 71.9% of isolates were positive for phospholipase and 68.7% for proteinase. Koga-Ito et al.²⁶ reported higher production of proteinase by *C. albicans* isolated from patients with oral candidosis when compared to isolates from control individuals. For phospholipase enzyme production, no statistically significant between the studied groups were detected.

Upon introduction of highly active anti-retroviral therapy (HAART) including protease HIV inhibitor, a

significant reduction of fungal infections incidence in HIV-positive patients has been reported^{16,30}. Previous studies reported that protease-inhibitors drugs showed anti-*Candida* activity as they are able to inhibit proteinases of the fungi by cross-reaction^{4,16,30-34}. Ribeiro et al.³² observed higher production of exoenzymes in oral and vaginal samples of HIV-positive women. However, when isolates from HAART-using patients with protease inhibitors were analyzed, lower levels of proteinase were produced. The levels reported by these authors were similar to those found for the isolates from the control group in our study.

The fact that anti-retroviral agents may reduce exoenzyme production was not confirmed in this study. The same results were verified in previous study¹⁷, that demonstrated proteinase and phospholipase production were strongly positive in the AIDS group when compared to the control group. As the production of these exoenzymes suggests increased pathogenicity of these isolates, great attention should be given for these results.

REFERENCES

1. Ellepola ANB, Samaranyake LP. Oral candidal infections and antimycotics. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2000;11(2):172-98.
2. Boriollo MF, Rosa EA, Bernardo WL, Gonçalves RB, Höfling JF. Electrophoretic protein patterns and numerical analysis of *Candida albicans* from the oral cavities of healthy children. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2003;45(5):249-7.
3. Sánchez-Vargas LO, Ortiz-López NG, Villar M, Moragues MD, Aguirre JM, Cashat-Cruz M, et al. Point prevalence, microbiology and antifungal susceptibility patterns of oral *Candida* isolates colonizing or infecting Mexican HIV/AIDS patients and healthy persons. *Rev Iberoam Micol*. 2005;22(2):83-92.
4. Samaranyake LP, Fidel PL, Naglik JR, Sweet SP, Teanpaisan R, Coogan MM et al. Fungal infections associated with HIV infection. *Oral Dis*. 2002;8(2):151-60.
5. Bramono K, Yamazaki M, Tsuboi R, Ogawa H. Comparison of proteinase, lipase and alpha-glucosidase activities from the clinical isolates of *Candida* species. *Jpn J Infect Dis*. 2006; 9:73-6.
6. Lin AL, Johnson DA, Patterson TF, Wu Y, Lu DL, Shi Q et al. Salivary anticandidal activity and saliva composition in an HIV-infected cohort. *Oral Microbiol Immunol*. 2001;16 (5):270-8.
7. Nittayananta W, Jealae S, Winn T. Oral *Candida* in HIV-infected heterosexuals and intravenous drug users in Thailand. *J Oral Pathol Med*. 2001;30(6):347-54.
8. Al-Abeid HM, Abu-Elteen KH, Elkarmi AZ, Hamad MA. Isolation and characterization of *Candida* spp. in Jordanian cancer patients: prevalence, pathogenic determinants, and antifungal sensitivity. *Jpn J Infect Dis*. 2004;57(6):279-84.
9. Hube B, Naglik J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiol*. 2001;147:1997-2005.

10. Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Molec Biol Rev*. 2003;67(3):400-28.
11. Naglik JR, Albrecht A, Bader O, Hube B. *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. *Cell Microbiol*. 2004;6(10):915-26.
12. Schaller M, Borelli C, Korting HC, Hube B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses*. 2005;48(6):365-77.
13. Yang YL. Virulence factors of *Candida* species. *J Microbiol Immunol Infect*. 2003;36(4):223-38.
14. Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev*. 2001;3(1):122-43.
15. Niewerth M, Korting HC. Phospholipases of *Candida albicans*. *Mycoses*. 2001;44(9):361-7.
16. Gonçalves L de S, Ferreira SM, Silva A Jr, Villoria GE, Costinha LH, Colombo AP. Association of T CD4 lymphocyte levels and chronic periodontitis in HIV-infected Brazilian patients undergoing highly active anti-retroviral therapy: clinical results. *J Periodontol*. 2005;76(6):915-22.
17. Bosco VP, Birman EG, Cury AE, Paula CR. Yeast from the oral cavity of children with AIDS: exoenzyme production and antifungal resistance. *Pesq Odont Bras*. 2003;17(3):217-22.
18. Back-Brito GN, Mota AJ, Vasconcelos TC, Querido SMR, Jorge AOC. Frequency of *Candida* spp. in the oral cavity of Brazilian HIV-positive patients and correlation with CD4 cell counts and viral load. *Mycopathol*. 2009;167(2):81-7.
19. Sandvén P. Laboratory identification and sensitivity testing of yeast isolates. *Acta Odonto Scand*. 1990;48:27-36.
20. Williams DW, Lewis MAO. Isolation and identification of *Candida* from the oral cavity. *Oral Dis*. 2000;6:3-11.
21. Donnelly SM, Sullivan DJ, Shanley DB, Coleman DC. Phylogenetic analysis and rapid identification of *Candida dubliniensis* based on analysis of ACT1 intron and exon sequences. *Microbiol*. 1999;145:1871-82.
22. Mähns B, Stehr F, Schäfer W, Neuber K. Comparison of standard phenotypic assays with a PCR method to discriminate *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Mycoses*. 2005;46: 55-61.
23. Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia*. 1982;20(1):7-14.
24. Ruchel R, Tegeler R, TROST M. A comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. *Sabouraudia*. 1982;20:233-44.
25. Haynes K. Virulence in *Candida* species. *TRENDS Microbiol*. 2001; 9(12):591-6.
26. Koga-Ito CY, Lyon JP, Vidotto V, de Resende MA. Virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida albicans* isolates from oral candidosis patients and control individuals. *Mycopathol*. 2006;161(4):219-23.
27. Kantarcioglu AS, Yücel A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses*. 2002;45(5-6):160-5.
28. Ribeiro EL, Scroferneker ML, Cavalhaes MS, Campos CC, Nagato GM, Souza NA et al. Phenotypic aspects of oral strains of *Candida albicans* in children with down's syndrome. *Braz J Biol*. 2006;66(3):939-44.
29. Candido RC, Azevedo RVP, Komesu MC. Enzimotipagem de espécies de *Candida* isoladas da cavidade bucal. *Rev Bras Med Trop*. 2005;33:456-63.
30. Munro CA, Hube B. Anti-fungal therapy at the HAART of viral therapy. *Trends Microbiol*. 2002;10(4):173-7.
31. Tappuni AR, Fleming GJP. The effect of antiretroviral therapy on the prevalence of oral manifestations in HIV-infected patients: a UK study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001;92(6):623-8.
32. Ribeiro MA, Miranda AE, Gambale W, Paula CR. Prevalence and exoenzyme secretion by *Candida albicans* isolates from oral and vaginal mucosas of HIV-infected women. *Mycopathol*. 2004;157(3):255-61.
33. Ryder MI. An update on HIV and periodontal disease. *J Periodontol*. 2002;73(9):1071-8.
34. Perezous LF, Flaitz CM, Goldschmidt ME, Engelmeier RL. Colonization of *Candida* species in denture wearers with emphasis on HIV infection: a literatura review. *J Prosthet Dent*. 2005;93(3):288-93.

Rabies virus viability after short-term cryopreservation using cryoprotectant agents

Viabilidade de vírus da Raiva após criopreservação de curto prazo com uso de agentes crioprotetores

RIALA6/1351

Edmara Chaves COSTA¹, Maria Fátima da Silva TEIXEIRA^{1*}, Tereza D'Ávila de Freitas AGUIAR¹, Benedito Neilson ROLIM¹, Phyllis Catharina ROMIJN², Marcos Fábio Gadelha ROCHA¹

*Endereço para correspondência: ¹Laboratory of Virology, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Av. Paranjana, 1.700, Campus do Itaperi, Fortaleza/CE, Brasil. CEP 60740-000. Tel.: +55 85 3101-9849. Fax: +55 85 3101-9840. E-mail: labovirfavetuece@yahoo.com.br.

²Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro – PESAGRO-RIO.

Recebido: 30.08.2010 – Aceito para publicação: 26.04.2011

ABSTRACT

Rabies virus cryopreservation has been succinctly described in the scientific literature. The major researches about viral conservation emphasize the rabies diagnosis in decomposed samples. For now few information has been available concerning the use of cryoprotectants for rabies virus cryopreservation. This study aimed at assessing the viability of rabies virus after freezing/thawing procedures and investigating the effect of different concentrations of dimethyl sulphoxide (DMSO), glycerol (GLY), polyethyleneglycol (PEG) and sucrose (SUC) on rabies virus cryopreservation. Virus viability was assessed by virus isolation based on mouse inoculation test, titration and immunofluorescent antibody assay before and after 30 days of freezing procedures. The rabies virus samples after being exposed to cryopreservation without adding a cryoprotectant, its viability showed to be lower than that observed in samples exposed to other treatments. After 30 days of freezing procedure, the viability of cryopreserved samples using DMSO, GLY or PEG was lower than that observed in fresh samples. In addition, the use of sucrose at 10% or 68% concentrations induced positive effects on the viral particles viability after a short-term cryopreservation.

Keywords. challenge virus standard, rabies virus, cryoprotective agents, cryopreservation.

RESUMO

A criopreservação de vírus da raiva tem sido descrita de forma sucinta na literatura científica. Até o presente, poucas informações encontram-se disponíveis sobre o uso de agentes crioprotetores na conservação a frio de vírus da raiva. O objetivo deste trabalho foi de analisar a viabilidade de vírus da raiva expostos aos procedimentos de congelação/descongelação e de avaliar o efeito do dimetilsulfóxido (DMSO), do glicerol (GLI), do polietilenoglicol (PEG) e da sacarose (SAC), em diferentes concentrações, na criopreservação de vírus da raiva. A viabilidade viral foi testada por meio de isolamento viral utilizando-se testes de inoculação em camundongos, titulação viral e imunofluorescência direta antes e 30 dias após terem sido instituídos os protocolos de congelação. A viabilidade das amostras de vírus da raiva após criopreservação na ausência de agentes crioprotetores foi inferior àquela observada em outros tratamentos. Após 30 dias de congelação, a viabilidade das amostras criopreservadas com adição de DMSO, GLI e PEG foi mais baixa do que a observada em amostras frescas. Adicionalmente, o uso da sacarose nas concentrações de 10% ou 68% induziu efeitos positivos na viabilidade das partículas virais após criopreservação a curto prazo.

Palavras-chave. challenge virus standard, vírus da raiva, crioprotetores, criopreservação.

INTRODUCTION

The natural course of a life cycle dictates that biological materials will decay and die. The structure and function of the known organisms change and will be lost with time. Attempts to stop the biological clock have been chased by ancient and contemporaneous minds. At the center of many such schemes have been experiments with temperature and water content. Thereby, the development of cooling technologies provide a means of slowing the rate of deterioration of perishable goods and the use of much lower temperatures has offered a means of storing organisms in a state of suspended animation for extended, even indefinite, periods¹.

Cryopreservation means that materials are stored at low (from -20 to -80 °C in freezers) or ultra-low temperatures (-150 °C in liquid nitrogen containers); more recently, cryopreservation takes place in the liquid or in the vapor phase of nitrogen. However, the major drawback of cryopreservation consists in severe damage of the cells exposed to freezing. The cryoinjury is a lethal event, produced by the formation of intracellular ice, on the efflux of water outside the cell, and on an increase in the concentration of intracellular salts in the solution. The most critical range occurs between +15 and 0 °C, while minor events occur at temperatures below 0 °C, although thermal shock can occur between 0 °C and -80 °C. So, the modern era of cryobiology started with the discovery that some substances might protect eukaryotic cells against freeze damage; after this initial observation, several cryoprotectants agents were discovered and are now widely used^{2,3}.

Cryoprotective additives may provide protection by being intracellular (penetrating agents) or extracellular (nonpenetrating agents). Penetrating agents create the environment for the reduction of cell water content at low temperatures, they bind intracellular water colligatively which prevents excessive dehydration, reduces salt toxicity and prevents the formation of large ice crystals within the cell and hyperosmotic injury. On the other way, nonpenetrating agents may promote osmotic efflux of cell water during the cooling process, reducing the intracellular ice formation³.

In virology, a range of procedures exists for maintaining virus stocks and these depend to some extent on the peculiar properties of the particular viruses. They are noncellular structures, much smaller and less biochemically complex than the simplest unicellular

organisms. This relative simplicity, diminutive size and the absence of free water are largely responsible for the stability of viruses in diverse temperatures and their fairly easy preservation. Many viruses can be kept for months at refrigerator temperatures and stored for years at very low temperatures without the need for special preservatives or carefully regulated slow freezing techniques. Nevertheless, RNA viruses are less stable than DNA viruses and those with lipid envelopes, like rabies virus, are often less stable than non-enveloped viruses at ambient temperatures⁴.

For the last century, rabies virus has been studied in many research institutes around the world due to its crucial importance in public health. However, its cryopreservation has been briefly described in the scientific literature. In cases where the sample is required only as an antigen for routine diagnostic and the retention of virus infectivity is not essential, the virus samples can be stored without loss of antigenic activity, even though the infectivity might be significantly reduced⁴.

On the other hand, in many research situations there is only a small window of opportunity after which the study subject may no longer be available or conditions may have changed. Thus, these precious samples must be handled and stored carefully; allowing archiving of material, repeated experiments from the same specimen source and, by allowing distribution of stored samples, facilitates research collaboration. Storage or banking of the samples is, in itself, a central issue especially for long-term studies and for sample use in new studies in the future. Storage can affect the quality of the samples and determines whether their future use is possible⁵.

The infectivity of many viruses decrease during transport and storage, resulting in isolation failures from clinical specimens and diminished titers in virus stocks. This phenomenon occurs more rapidly at 20 °C and 4 °C than at ultralow temperatures. Since the former requires equipment that is not commonly found in most clinical and diagnostic laboratories, many virologists find it useful combining infected samples with a cryoprotectant agent. Glycerol, dimethyl sulphoxide, albumin, balanced salt solutions plus gelatin, animal sera, skim milk, polyethyleneglycol, sucrose and sorbitol are among the more commonly used cryoprotectants⁶.

Until now little information is available concerning the cryopreservation of rabies virus and the use of cryoprotectant agents in such samples. Thus, the aim of this work was to evaluate the viability of rabies virus after freezing/thawing procedures and assess the

effect of dimethyl sulphoxide (DMSO), glycerol (GLY), polyethyleneglycol (PEG) and sucrose (SUC), in different concentrations, on rabies virus cryopreservation.

MATERIAL AND METHODS

Experimental animals

Swiss albino mice (*Mus musculus*), three-four weeks old, weighting 10-16g were used. The probability sampling was utilized in order to have a random selection method that assures that the different units in the population have equal probabilities of being chosen.

All experiments were performed according to the Committee of Animal Handling and Ethical Regulation (protocol number: 08185881-7). The mice were anesthetized individually before every invasive procedure using inhalation anesthetics (halothane or isoflurane, depending on availability). Inhalant anesthetics were either used to euthanize the mice in terminal state of the disease. The animal was placed in a closed receptacle containing cotton or gauze soaked with an appropriate amount of the anesthetic. Vapors were inhaled until respiration ceases and death ensues, associated to a longer induction time.

Virus strain

The mice were infected with the murine-adapted Challenge Virus Standard (CVS) strain of rabies virus. The CVS strain induced clinical signs which are undoubtedly those of rabies, resulting from predictable (fixed) properties in terms of incubation period, pathological and clinical effects. In addition, it represents a more homogeneous viral population. The work strain CVS-31 (lyophilized specimen) was ceded by Dr. Phyllis Catharina Romijn (PESAGRO-RIO) in research collaboration. The titer of this seed CVS aliquot was tested ($3.60 \text{ Log}_{10} 50\% \text{ LD}_{50}$) and then it was replicated in three mice-brain-passages, increasing the titers to $5.40 \text{ Log}_{10} 50\% \text{ LD}_{50}$.

Samples

A total of 50 mice were inoculated with CVS-31 suspension (0.03ml), through intracerebral route, and observed daily. The encephalic tissues (central nervous system) from the infected mice were used. The brains of all mice that have died after the inoculation, or that have been euthanized when prostrate (terminal clinical signs of rabies), were removed. After disinfection with 70% ethanol, the skin of the head and neck was cut away with forceps and scissors, exposing the skull. The skull was grasped in

the orbits with mouse-tooth forceps and the skullcap was detached with curved scissors, thereby exposing the brain⁷. The tissues (0.2-0.4g each) were removed with a curette and transferred to a sterile universal collector. A composite sample was made in which material collected from several individuals was combined and homogenized in a pooled sample, reducing the subject-to-subject variability and thus increasing the power of statistical validity.

Cryoprotectants agents

A selection of some of the most widely used cryoprotector agents in microbiology was made. In literature, dimethyl sulphoxide (DMSO) concentrations varies from 1 to 32% (median ~10%), glycerol (GLY) (1,2,3-propanetriol) was applied at concentrations of 2–55% (median 10%), polyethylene glycol (PEG) has been used at concentrations of 5–45% (median 10%) and sucrose, at concentrations of 1–68% (median 10%)³. The median and maximum concentrations of the cryoprotectants agents cited on microbiology literature were used. The median of cryoprotectants concentration were chosen because, in certain analysis, it may reflect more accurately the measure of central tendency in the presence of outlier values than is the mean. Cryoprotectants maximum concentrations were employed to verify if in higher concentrations it causes decline of rabies virus viability. The Phosphate Buffered Saline (PBS pH7.2) was used as diluent.

Experimental procedure

The encephalic tissues pooled sample containing rabies virus particles was divided into 10 positive aliquots (0.5g each), in duplicate. Ten aliquots were used to analyze the viability of rabies virus samples immediately after cryoprotectants agents contact (T_0). The other aliquots were taken randomly, submitted to freezing/thawing protocols and analyzed after a 30-days period (T_{30}).

Virus isolation by mouse inoculation test and direct fluorescent antibody test were performed to evaluate rabies virus viability after the exposure to DMSO, GLY, PEG or SUC, before and after the cryopreservation experiments. The cryoprotectants were prepared in double straight concentration using PBS pH 7.2 as diluent. Eight aliquots (0.5g each) of the pooled sample were transferred to vials containing 200 μ l of cryoprotectant solution at 10% and 32% DMSO, 10% and 55% GLY, 10% and 45% PEG or 10% and 68% SUC – each in duplicate. Two aliquots were used as positive controls, one in pure state (sample control, PC-CVS) and the other in PBS pH7.2

solution (cryoprotectants control, PC-PBS). One duplicate was destined for the viability tests and the other for the cryopreservation treatment. An extra duplicated aliquot of normal mice brain was employed as negative control (NC-NMB). The positive controls were submitted to viral titration before and after the freezing/thawing protocol.

Samples were exposed to the cryoprotectants for 20 min at 20 °C and in PBS pH 7.2. After the exposure period, the specimens were washed to remove the cryoprotectant as follows: suspensions containing the virus were diluted in 2.0 ml PBS, equilibrated for another 5 min at room temperature, and then centrifuged at 150-200G for 5 min. This procedure was performed a second time. The samples were finally suspended in 2.0 ml viral diluents and the viability tests were made immediately.

Freezing and thawing process

For freezing, samples were equilibrated in 10% and 32% DMSO, 10% and 55% GLY, 10% and 45% PEG or 10% and 68% SUC and in PBS pH 7.2 for 20 min at 20 °C, as in the viability test. After the equilibration period, the vials were transferred to a -20 °C freezer and kept at this temperature for a 30-days period.

For thawing, the vials were taken from the freezer, warmed in air at room temperature for 1 min and immersed in a water-bath at 37 °C until it thawed. Thereafter, the cryoprotectants were removed as described above and the samples were submitted to the viability tests as follows.

Mouse inoculation test

Virus isolation was conducted by mouse inoculation test (MIT)⁷. The encephalic tissues were triturated in a mortar (pooled samples), diluted to 20% in phosphate buffered saline (PBS) pH 7.2, added 500UI of penicillin and 2 mg of streptomycin per ml of tissue suspension to prevent animal death from possible bacterial contamination of the tissue suspension, and clarified by centrifugation at 900x g for five minutes. The supernatant was collected and 0.03ml was used to inoculate each of 10 to 12 Swiss albino mice, three-four weeks old, through intracerebral route. It was used the BD Ultra-fine II™ U-100 insulin syringes – short needle – 31 gauge, 8mm (5/16”) for 30 units or less. The inoculated animals were observed daily up to 21 days. Mice receiving diluents only were used as negative controls. Animals dying within the first four days after inoculation and without signs suggestive of rabies were excluded.

Virus titration test

Controls and stock virus titrations were performed at designated intervals. A 10% suspension of the pooled sample was prepared in PBS pH7.2 solution⁷. Serial 10-fold dilutions (10⁻¹ to 10⁻⁶) were made of supernatant fluid, and 0.03 ml of each dilution was inoculated by intracerebral route in either of six Swiss albino mice (*Mus musculus*), three weeks old, weighting 10-12g and examined daily. Rabies virus LD₅₀ titers were calculated⁸ and expressed as Log₁₀ 50% lethal doses (Log₁₀ 50% LD₅₀).

Table 1. Effects of freezing and storage temperature on rabies virus viability tested by mouse intracerebral inoculation and direct fluorescent antibody test after exposure to internal and external cryoprotectants

Samples	MIT ¹					FAT		
	MST ² (days)		Mortality			Results	Degree*	
	T ₀	T ₃₀	NAM ³ /NT ⁴		T ₀		T ₃₀	
					%			
NC-NMB	21	21	0/11	0/10	0	Negative	-	-
PC-CVS	6.5	7.8	10/10	10/10	100	Positive	++++	+++
PBS	7.0	7.0	10/10	10/10	100	Positive	+++	+++
DMSO (10%)	7.0	6.9	10/10	10/10	100	Positive	+++	+++
DMSO (32%)	7.0	7.0	10/10	10/10	100	Positive	++	++
GLY (10%)	7.0	7.0	11/11	10/10	100	Positive	+++	+++
GLY (55%)	7.0	6.9	11/11	10/10	100	Positive	+++	+++
PEG (10%)	7.0	6.7	10/10	10/10	100	Positive	+++	+++
PEG (45%)	7.0	7.0	12/12	10/10	100	Positive	+++	+++
SUC (10%)	6.8	7.0	10/10	10/10	100	Positive	++++	++++
SUC (68%)	6.8	7.0	11/11	10/10	100	Positive	++++	++++

¹Mouse Inoculation Test; ²Mean Survival Time; ³Number of Affected Mice; ⁴Number Tested;

*Evaluation of positivity degree: -, +, ++, +++, +++++

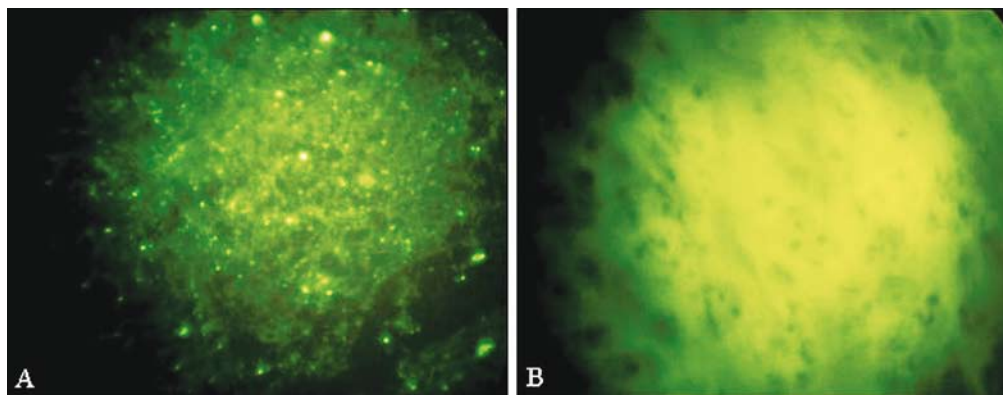


Figure 1. Photomicrograph with immunofluorescent staining of the samples impression smear shows bright apple-green viral nucleocapsid antigen targeted by virus-specific fluorescent-labeled antibodies and seen using fluorescein isothiocyanate filter in standard incident light ultraviolet microscope (Carl Zeiss, Germany), with $\times 400$ magnification. A: antigen very abundant in every field and amount per field was “not possible to count” (++++): Positive Control – Challenge Virus Standard (PC-CVS). B: no antigen throughout whole impression (-): Negative Control – Normal Mice Brain (NC-NMB)

Fluorescent antibody test

The viral antigens in infected samples were detected by the direct immunofluorescent antibody staining technique (FAT)⁹. The impression smears were made on multi-well immunofluorescence glass slides and fixed for 30 min in cold acetone at a -20°C environment, and air-dried. The samples were then incubated at 37°C with fluorescein isothiocyanate-labeled rabbit polyclonal antinucleocapsid antibody absorbed with 10% normal mouse brain (BIO-RAD Laboratories-France, Catalog Number 357-2112) for 60 minutes at 37°C in a humid chamber. Slides were washed with PBS pH 7.2 in two successive 5-minute wash periods. After rinsing with distilled water, the smears were air-dried and examined using a standard incident light ultraviolet microscope (Carl Zeiss, Germany), with $\times 40$ objective and $\times 10$ eyepiece lenses (total magnification $\times 400$).

Each smear was examined and graded by two readers independently and where disagreement occurred the respective cases were re-examined and a consensus reached. All the smears were graded from (-) to (++++), according to the amount of fluorescent antigen, as follows: (-), no antigen throughout whole smear; (+), antigen very scanty, one or more particles in fewer than 50% of microscope fields; (++) , antigen scanty, one or more particles in fewer than 100% of fields, but more than 50% of fields; (+++) , antigen abundant, one or more particles in each field, but the amount per field was ‘possible to count’; (++++), antigen very abundant in every field and amount per field was ‘not possible to count’. For the slides read of rabies samples smears, scores 3 and 4 were considered ‘easy’, while specimens with scores 1 and 2 were considered ‘difficult’ to diagnose¹⁰.

RESULTS

There was a decrease of viral titers when CVS strain samples were exposed to freezing/thawing procedure. In a 30-day period (T_{30}), the titre of the pooled sample was reduced from 5.40 to 4.69 Log_{10} 50% LD_{50} compared to fresh sample (T_0).

The results of viability tests in rabies virus samples, after exposure to internal and external cryoprotectants, are set out in Table 1. Before the freezing/thawing procedure, differences were observed in the immunofluorescent staining degree between the CVS strain positive control (PC-CVS), positive control exposed to PBS pH 7.2 (PC-PBS) and cryoprotectants treatments. While the PC-CVS (T_0) sample demonstrated the maximum fluorescence classification, there was a decrease on fluorescent degree from PC-PBS, as identified in samples exposed to DMSO (10%), GLY (10% and 55%) and PEG (10% and 45%). Decline in fluorescence profile was more severe in DMSO (32%) treatment. However, the outcome of sucrose cryoprotectant treatment (using either 10% or 68%) was equivalent to that observed in the PC-CVS (control not treated) Fig. 1-A.

Table 1 either shows the effects of freezing and storage temperature on rabies virus viability tested by mouse inoculation and direct fluorescent antibody test after a 30 days period. No difference was observed in the immunofluorescent staining degree subsequently to cryopreservation, irrespective of the cryoprotectants treatments or the concentration used. Otherwise, the

fluorescence intensity found in PC-CVS (T_{30}) following the cryopreservation was lower than in fresh samples and the mean survival time (MST) in the mouse inoculation test increased one day. Only when the pooled samples were cryopreserved without cryoprotectant (CP-CVS) did the fluorescence degree differ in the viability tests. Assays on negative control of normal mice brain (NC-NMB) were uniformly negative Fig.1-B.

DISCUSSION

The measurement of virus titres provides information about the viral viability after the freezing/thawing protocol. In a 30-day period, the pooled sample titre decreases when compared to fresh sample. The data shown indicates that the rabies virus samples had the viability compromised by freezing/thawing protocols in the absence of cryoprotectant agents.

The rabies virion capsid is surrounded by the host cell-derived membrane¹¹, what can be interpreted as a susceptibility feature of viral particle to mechanical damage caused by ice crystals formation, similar to those inflicted on host cells. According to Howell and Miller⁶, enveloped viruses demonstrate greater lability during storage than those lacking envelopes.

Since viruses acquire their envelopes by budding through cellular membranes, the dynamics associated with deleterious changes which occur during freezing and thawing may affect both viruses and cells in a similar manner. The mechanisms of membrane and viral envelope damage appear to be caused by the formation of external and internal ice, excessive changes in pH and solute concentration, and ice recrystallization, during freezing and thawing. In fact, decreases in viral titer correlate with demonstrable changes in areas of the viral envelope presumed to be associated with viral infectivity.

In addition, it was also shown that cryopreserved samples are still viable after 30 days at low temperature (-20 °C), but a decrease of titer occur. The present study showed that almost all treatments demonstrated a reduced quality of virus particles when compared to the control in the fluorescent antibody test. This reduction is presumable due to virus losses caused by the washings to remove the cryoprotectants. This is confirmed by the fact that in the treatment where the samples were not exposed to cryoprotectants (PC-PBS/ T_0), but were submitted to washings and centrifugations, the samples slide fluorescence degree was lower than in

the fresh control (PC-CVS/ T_0). However, when rabies virus samples were frozen without cryoprotectant (PC-CVS/ T_{30}), the slides degree examined after thawing was lower than the fresh control (PC-CVS/ T_0). In this case, the reduced of slides degree may be due cells rupture caused by the freezing and thawing procedures. Moreover, this inconsistency can be explained by the labile nature of RNA and the high ribonuclease content of brain tissues, and most importantly, degradation of RNA¹² in the pooled stores samples, promoting viral degradation and loss of viability.

The increase of the mean survival time (MST) in the mouse inoculation test (MIT) might be explained by lower viral virulence. This finding is similar to that observed by Lopes et al.¹³ studying long-term stored samples, frozen under natural conditions without any preservation substance, that encountered a higher MST (12-17 days). Considering that the average of mouse incubation period is five days and death occurs between one and three days after clinical signs initial manifestation, the mean survival time of mice inoculated with samples from naturally infected animals is generally seven to ten days and five to seven days for Challenge Virus Standard (CVS strain)^{7,13}.

In the present study, the use of sucrose at 10% and 68% concentrations induced positive effects on the viral particles viability after washing/centrifugation protocols (T_0) to remove cryoprotectant agents and for a 30-days period of cryopreservation (T_{30}). Non-permeable or external cryoprotectants protective action is very complex and attributable to a number of properties, the most important of which is the beginning of the dehydration process. In particular, sucrose does not enter the cell, but exerts its beneficial effects by causing cellular dehydration through changes in osmotic pressure¹⁴. It was suggested that the increase in the sucrose concentration generates an osmotic gradient across the cell membrane, which draws water out of the cell, causing the cell to dehydrate sufficiently before and during the freezing procedure¹⁵, also exerting a protective effect to the viral particles.

The results either demonstrate that after 30 days of freezing the viability of cryopreserved samples (using DMSO, GLY or PEG) was lower than the viability of fresh samples, but was similar to frozen controls. The viability of rabies virus after cryopreservation without a cryoprotectant was significantly lower than that observed in the other treatments with almost all samples

damaged following this procedure. As shown in this work, titration is an essential step in the evaluation of cryopreserved virus samples.

In conclusion, this study shows that cryopreservation of rabies samples in sucrose allows the maintenance of a better rabies virus viability after short-term cryopreservation. Such results could stimulate further researches in this area. More experiments are needed to clarify the basic aspects of rabies virus cryopreservation, mainly to obtain knowledge of fundamental cryobiological properties, which would minimize the injuries associated with the cryopreservation procedures. Other studies on the features of these cryoprotectant agents would provide new strategies to minimize such injuries and consequently elevate the viability of rabies virus stored samples.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), an agency linked to the Ministry of Science and Technology (MCT), by ceding of a scholarship to Edmara Chaves Costa.

REFERENCES

1. Day JG, McLellan MR. Cryopreservation and freeze-drying protocols. New Jersey: Humana Press; 1995.
2. Paoli DP. Biobanking in microbiology: from sample collection to epidemiology, diagnosis and research. *FEMS Microbiol Rev*. 2005;29:897-910.
3. Hubálek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiol*. 2003;46:205-29.
4. Gould EA. Virus cryopreservation and storage. *In*: Day JG, McLellan MR. Cryopreservation and freeze-drying protocols. New Jersey: Humana Press; 1995.
5. Paynter SJ. Principles and practical issues for cryopreservation of nerve cells. *Brain Res Bull*. 2008;75:1-14.
6. Howell CL, Miller MJ. Effect of sucrose phosphate and sorbitol on infectivity of enveloped viruses during storage. *J Clin Microbiol*. 1983;3:658-62.
7. Koprowski H. The mouse inoculation test. *In*: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H. (Eds). *Laboratory Techniques in Rabies*, 4th ed. Geneva: World Health Organization; 1996. p.80-86.
8. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Hyg*. 1938;27:493-7.
9. Dean DJ, Ableset MK, Atanasiu P. The fluorescent antibody test. *In*: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H. (Eds). *Laboratory Techniques in Rabies*, 4th ed. Geneva: World Health Organization; 1996. p.88-95.
10. Bingham J, Merwe M. Distribution of rabies antigen in infected brain material: determining the reliability of different regions of the brain for the rabies fluorescent antibody test. *J Virol Methods*. 2002;101:85-94.
11. Schnell MJ, McGettigan JP, Wirblich C, Papaneri A. The cell biology of rabies virus: using stealth to reach the brain. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8:51-61.
12. Wacharapluesadee S, Ruangvejvorachai P, Hemachuda T. A simple method for detection of rabies viral sequences in 16-year old archival brain specimens with one-week fixation in formalin. *J Virol Methods*. 2006;134:267-71.
13. Lopes MC, Venditti LLR, Queiroz LH. Comparison between RT-PCR and the mouse inoculation test for detection of rabies virus in samples kept for long periods under different conditions. *J Virol Methods*. 2010;164:19-23.
14. Fabbri R, Porcu E, Marsella T, Rocchetta G, Venturoli S, Flamigni C. Human oocyte cryopreservation: new perspectives regarding oocyte survival. *Hum Reprod*. 2001;16:411-6.
15. Chen ZJ, Li M, Li Y, Zhao LX, Tang R, Sheng Y, Gao X, Chang CH, Feng HL. Effects of sucrose concentration on the developmental potential of human frozen-thawed oocytes at different stages of maturity. *Hum Reprod*. 2004;10:2345-9.

Avaliação de resíduos de agrotóxicos em arroz e feijão e sua contribuição para prevenção de riscos à saúde da população consumidora

Survey of pesticide residues in rice and beans and its contribution to prevention of human health risks of consumers

RIALA6/1352

Vera Regina Rossi LEMES*, Tereza Atsuko KUSSUMI, Viviane Emi NAKANO, Sonia Bio ROCHA, Maria Celeste Cardeal de OLIVEIRA, Marcela Piza RODRIGUES, José Inaldo Almeida RIBEIRO

*Endereço para correspondência: Laboratório de Resíduos de Pesticidas, Núcleo de Contaminantes Orgânicos, Centro de Contaminantes, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, Cerqueira César, São Paulo/SP, Brasil. CEP 01246-902.

E-mail: lemesvrr@ial.sp.gov.br.

Recebido: 04.02.2011 – Aceito para publicação: 06.06.2011

RESUMO

O presente estudo foi realizado com a finalidade de analisar os resíduos de agrotóxicos em arroz e feijão, alimentos básicos nos hábitos alimentares do brasileiro, e estimar o risco à saúde pública. Foram coletadas 44 amostras de arroz e 44 de feijão pelas vigilâncias sanitárias municipais do Estado de São Paulo (Programa Paulista de Análise Fiscal de Alimentos). As amostras foram analisadas por meio de ensaio multirresíduo. Os resíduos de agrotóxicos foram encontrados em 26 (59%) amostras de arroz e em 11 (25%) das de feijão em teores entre 0,05 e 0,1 mg/kg, dentro dos Limites Máximos de Resíduos. A exposição ao propiconazole por meio da ingestão de arroz representou 0,15 e 0,58% da Ingestão Diária Aceitável (IDA) e a exposição à procimidona pela ingestão de feijão representou 0,02 e 0,1% da IDA, respectivamente, para as populações adulta e infantil. Nos demais agrotóxicos pesquisados não foram detectados resíduos iguais ou em valores maiores do que o limite de detecção da metodologia utilizada.

Palavras-chave. resíduos de agrotóxicos, saúde pública, fiscalização, cromatografia gasosa, arroz, feijão.

ABSTRACT

This study was conducted to determine the pesticide residues in rice and beans, the basic cereals in Brazilian eating habits, and to estimate the risk to public health. The cereals samples were collected by São Paulo Sanitary Surveillance (Paulista Program for Food Analysis Control). Pesticide residues were analyzed by multiresidue methodology in 44 rice samples and 44 beans samples. Pesticide residues were found in 26 (59%) rice samples and 11 (25%) in beans samples from 0.05 to 0.1 mg/kg, being within the maximum residue levels. The main residues found were propiconazole in rice and procymidone in beans. The estimated health risks by exposure to propiconazole through rice intake corresponded to 0.15 e 0.58% of the acceptable daily intake (ADI) and exposure to procymidone by beans intake was 0.02 e 0.1% of ADI for adult and children populations, respectively. The other active ingredients had no pesticide residues within or at values greater than the used methodology detection limit.

Keywords. pesticide residues, public health, inspection, gas chromatography, rice, beans.

INTRODUÇÃO

O arroz alimenta mais da metade da população humana da Terra e ocupa a posição de terceira maior cultura cerealífera do mundo, ultrapassado apenas pelo milho e trigo. Sua cultura apresenta grande capacidade de adaptação a diferentes condições de solo e clima e desempenha papel estratégico tanto em nível econômico quanto social para os povos das nações mais populosas da Ásia, África e América Latina¹.

A produção de arroz no mundo concentra-se nos países do sudeste asiático, sendo o consumo *per capita* nestes países superior ao de países ocidentais. O Brasil se destaca como o maior produtor de fora do continente asiático e está entre os dez principais produtores mundiais de arroz, cuja estimativa para as safras de 2010/2011 é de 12.628,2 mil toneladas^{2,3}.

O feijão, consumido em todos os continentes apresenta papel relevante na alimentação do brasileiro^{4,5}. É um dos produtos agrícolas de maior importância econômico-social no Brasil, sendo cultivado por pequenos e grandes produtores em diversificados sistemas de produção e em todas as regiões do país^{4,6}. Atualmente, o Brasil continua figurando entre os maiores produtores e consumidores mundiais de feijão, com 3.645,8 mil toneladas nas safras 2010/2011^{2,5}.

O arroz e o feijão são os alimentos básicos nos hábitos alimentares da população brasileira, representam importantes fontes de nutrientes e energia e atuam na prevenção de efeitos adversos à saúde. São ricos em carboidratos, proteínas, vitaminas e sais minerais. Quando combinados, além de serem fontes ricas de nutrientes e fibras, o balanço de aminoácidos é excelente, pois as deficiências existentes em cada um destes alimentos são reciprocamente compensadas pelo outro. Os grãos de arroz contêm metionina e os feijões, lisina, sendo que juntos fornecem quantidades de proteínas equiparadas a um pedaço de carne. Ainda equilibram o índice glicêmico, diminuindo o risco do diabetes e mantêm excelentes teores de flúor após o cozimento com água fluoretada, aumentando a concentração da substância na saliva, o que diminui a desmineralização dos dentes e protege contra as cáries⁶⁻¹⁰.

De acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)¹¹, Pesquisa de Orçamentos Familiares e Estudo Nacional de Despesa Familiar, a quantidade anual *per capita* de arroz polido e feijão adquirida para consumo no domicílio para o Estado de São Paulo foi de 12,719 kg e 5,241 kg, respectivamente.

O mercado, consumidor de produtos *in natura* ou processados, tem exigido requerimentos fitossanitários rigorosos, priorizando a segurança do alimento e do meio ambiente¹².

A preocupação com a exposição aos agrotóxicos tem sido crescente devido ao aumento da produção e do número de ingredientes ativos (i.a.) utilizados e em decorrência de estudos que apresentam resíduos, relacionando-os a possíveis efeitos adversos à saúde. Dentre estes, destacamos a ocorrência de possíveis alterações nos sistemas circulatório, respiratório, nervoso central e periférico, reprodutor e imunológico, bem como os possíveis efeitos anticolinesterásicos, em consequência de exposição crônica a esses resíduos nos alimentos¹³.

Para garantir a segurança dos alimentos que são disponibilizados para consumidores quanto ao nível de resíduos de agrotóxicos, cada país estabelece o Limite Máximo de Resíduo (LMR) no processo de registro do produto. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (ANVISA/MS) estabelece os respectivos LMRs para cada agrotóxico/cultura. As culturas de arroz e feijão apresentam uma ampla grade de agrotóxicos autorizados com as mais diferentes indicações de uso¹⁴.

Os resíduos encontrados em alimentos acima dos LMRs estabelecidos pelos órgãos governamentais indicam que a aplicação do agrotóxico não foi realizada de acordo com as Boas Práticas Agrícolas (BPA)¹⁵⁻¹⁷.

Os métodos analíticos multirresíduo possibilitam avaliar se os agrotóxicos nas culturas estão em conformidade com os respectivos LMRs, bem como constatar a presença de i.a. não autorizados e sem permissão de uso no país¹⁵⁻¹⁷.

Os resultados de programas de monitoramento no Brasil têm revelado uma percentagem considerável de resíduos de agrotóxicos não autorizados em vegetais¹⁵⁻¹⁷. Em 2009, foram analisadas 162 amostras de arroz e 164 amostras de feijão no Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) coordenado pela ANVISA/MS, e, em 26,5% e 1,8%, respectivamente, foram detectados agrotóxicos de uso não permitido¹⁷. Em 2008, foram detectados agrotóxicos de uso não permitido em 6 (4%) das 136 amostras de arroz monitoradas¹⁶. O percentual de resultados insatisfatórios indica a necessidade de aplicação das BPA e de uma maior fiscalização em relação ao comércio e à utilização de agrotóxicos, com intuito de oferecer ao consumidor produtos com níveis seguros de resíduos¹⁵⁻¹⁷.

Vários países, incluindo Estados Unidos da América e os da União Europeia, têm implantado programas de análise de resíduos de agrotóxicos nos alimentos. Nos Estados Unidos, destacam-se o programa do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), o programa da Associação Nacional dos Alimentos Processados (NFPA) e o programa da Administração de Drogas e Alimentos (FDA), nos quais são analisadas amostras de leite, grãos, carnes, ovos, frutas e outros vegetais, produzidos nos mercados interno e externo. A União Europeia analisa amostras dos países membros, quanto à presença de resíduos de agrotóxicos.

Com os objetivos de implantar e avaliar o método multirresíduo de agrotóxicos em arroz e feijão, pesquisar os resíduos em amostras comercializadas em São Paulo em 2009, avaliar os resultados e estimar a contribuição de risco à população consumidora, realizou-se o presente estudo.

MATERIAL E MÉTODOS

O plano de amostragem adotado foi o descrito pelo Manual do Codex Alimentarius e a coleta de 1 kg por amostra foi efetuada no último local antes do consumidor final (supermercados e outros)¹⁸.

Foram coletadas 44 amostras de arroz (polido) de 24 diferentes marcas, 19 provenientes da capital e 25 do interior do estado de São Paulo no período de maio a junho de 2009 (Tabela 1).

No período de julho a dezembro de 2009 foram coletadas 44 amostras de feijão de 34 diferentes marcas, 22 da capital e 22 do interior do estado de São Paulo.

As coletas foram realizadas pelas vigilâncias sanitárias municipais, conforme estabelecido pelo Programa Paulista de Análise Fiscal de Alimentos¹⁹.

A amostragem foi realizada em 41 municípios do estado de São Paulo, distribuídos conforme Tabela 1, de acordo com o Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados para Análise Fiscal de Alimentos²⁰.

Amostras controle

Amostras de produção orgânica de arroz e feijão foram adquiridas em supermercados em embalagens próprias para comercialização.

As amostras foram trituradas e reduzidas a subamostras para análise e armazenadas em freezer à temperatura de -20 °C.

Tabela 1. Distribuição das coletas de amostras de arroz e feijão nas cidades do Estado de São Paulo

Municípios (41)	arroz	feijão
Araraquara, Campinas, Conchas, Fernandópolis, Franco da Rocha, Jacareí, Lins, Martinópolis, Mirandópolis, Mogi das Cruzes, Ourinhos, Pindamonhangaba, Pitangueiras, Presidente Venceslau, São Caetano do Sul, São Sebastião, São Vicente, Tupã	x	
Andradina, Bauru, Descalvado, Franca, Garça, Guarujá, Guarulhos, Hortolândia, Jaboticabal, Laranjal Paulista, Mairiporã, Presidente Prudente, São Bernardo do Campo, São João de Iracema, Sorocaba		x
Barretos, Caçapava, Leme, Osasco, Registro, São José do Rio Preto, Vargem Grande do Sul, São Paulo (capital)	x	x

Método analítico

O método utilizado foi o descrito no Analytical Methods for Pesticide Residues in Foodstuffs do Ministry of Health of Netherlands²¹, com adaptações²², e a análise qualitativa e quantitativa foi feita por cromatografia a gás com detectores de captura de elétrons (ECD) e fotométrico de chama pulsante (PFPD). Foram analisados 34 i.a. de resíduos de agrotóxicos nas amostras de arroz e 40 i.a. nas amostras de feijão, totalizando 3256 determinações.

Pesou-se 25 g da amostra triturada, à qual foram adicionados 100 mL de uma mistura de solventes (acetona e diclorometano, 1:1 v/v), e manteve-se em contato por uma noite. Após centrifugação, foi retirada uma alíquota de 0,2 mL do extrato sobrenadante para frasco de vidro, concentrou-se sob fluxo de nitrogênio até à secura e ressuspendeu-se a 1 mL com n-hexano. Foram injetados 2 µL em cromatógrafo a gás com microdetector de captura de elétrons (µECD) para determinação dos i.a. organohalogenados. Para determinação dos organofosforados, foi transferida uma alíquota de 5 mL do extrato sobrenadante para um frasco de vidro graduado, concentrou-se sob fluxo de nitrogênio até quase à secura e ressuspendeu-se a 1 mL com uma mistura de solventes isoctano: tolueno (9:1 v/v). Foram injetados 2 µL em cromatógrafo a gás com detector fotométrico de chama pulsante (PFPD).

As condições cromatográficas para determinação dos organohalogenados estão relacionadas a seguir: cromatógrafo a gás com µECD: dimensões da coluna:

30 m x 0,25 mm x 0,25 µm; fase estacionária: 5% fenil 95% dimetilsiloxano; temperatura do injetor: 250 °C; temperatura do detector: 310 °C; temperatura programada do forno: 60 °C (1 min), 10 °C/min, 190 °C (6 min), 3 °C/min, 280 °C (15 min); fluxo do gás de arraste: N₂: 1 mL/min; modo e volume de injeção: *splitless* e 2 µL.

Para confirmação dos resultados foi utilizado um cromatógrafo a gás com ECD: dimensões da coluna: 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm; fase estacionária: 35% fenil 65% dimetilsiloxano; temperatura do injetor: 250 °C; temperatura do detector: 320 °C; temperatura do forno programada: 60 °C (1min), 10 °C/min, 220 °C (6min), 3 °C/min, 280 °C (17min); fluxo do gás de arraste: N₂: 1,4 mL/min; modo e volume de injeção: *splitless* e 2 µL.

As condições cromatográficas para determinação dos organofosforados estão relacionadas a seguir: cromatógrafo a gás com PFPD e filtro de fósforo: dimensões da coluna: 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm; fase estacionária: 14% fenilcianopropil, 86% dimetilsiloxano; temperatura do injetor: 220 °C; temperatura do detector: 300 °C; temperatura programada do forno: 80 °C (0 min), 20 °C/min, 160 °C (5 min), 3 °C/min, 190 °C (10 min), 10 °C/min, 270 °C (30 min); fluxo do gás de arraste: N₂: 2 mL/min; modo e volume de injeção: *splitless* e 2 µL.

Quantificação

A quantificação dos agrotóxicos foi efetuada pelo método de padronização externa para cada ingrediente ativo.

Curvas analíticas

Após otimização das condições de análise, foram construídas curvas analíticas para cada ativo, com, no mínimo, cinco níveis de concentração. Misturas de padrões foram preparadas em hexano para determinação dos organohalogenados e isoctano:tolueno (9:1 v/v) para organofosforados.

Avaliação do método

Os parâmetros utilizados para avaliação do método foram: seletividade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), exatidão e precisão²³⁻²⁶. Os parâmetros foram verificados em matriz de arroz e feijão controle para os princípios ativos estudados, incluindo a análise do branco e estudos de recuperações, totalizando 975 determinações.

Para os estudos de recuperação foram preparadas amostras controle com adição de solução-padrão no nível do LQ, em cinco replicatas. Os LD e LQ do método foram calculados a partir das concentrações recuperadas

conforme as recomendações estabelecidas pela Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas²⁵, ou seja, três e dez vezes o desvio-padrão de uma série de replicatas. O efeito matriz foi considerado por análises de amostras controle de arroz e feijão de produção orgânica.

A faixa de trabalho incluiu o LQ e o maior valor não superior a dez vezes o LQ, com exatidão e precisão aceitáveis²⁵.

Periodicamente foram injetadas soluções-padrão para checagem das curvas analíticas e foram considerados aceitáveis valores iguais ou inferiores a 15% do resultado obtido anteriormente²⁵.

Para avaliação da exatidão do método foi considerado o intervalo de recuperações entre 70 a 120% e, para a precisão, coeficientes de variação percentual (CV%) ou desvios-padrão relativos (DPR) de até 20%^{24,26}.

Estimativa de risco de exposição a resíduos de agrotóxicos pela ingestão de arroz e feijão

As contribuições de risco à saúde pelo consumo foram calculadas considerando 60 kg e 15 kg de peso corpóreo (p.c.) para as populações adulta e infantil, respectivamente, com a suposição de que todo o arroz e feijão consumidos tivessem os maiores níveis de resíduos de agrotóxicos encontrados e considerando a média de consumo anual *per capita* para o arroz (12,719 kg) e feijão (5,241 kg) adquiridos em domicílio para as regiões metropolitanas (IBGE)¹¹. Os dados obtidos foram comparados com as respectivas Ingestões Diárias Aceitáveis (IDA) de 0,04 mg/kg p.c. para propiconazol¹⁴ e de 0,1 mg/kg p.c. para procimidona¹⁴, expressos em percentagem.

Controle de qualidade interno/carta controle:

O princípio ativo clorpirifós metílico foi selecionado para controle do procedimento nas etapas de extração e determinação por CG/ECD ou CG/µECD e por CG-PFPD. A cada 10 amostras analisadas, foi adicionado em uma delas 1 mL de uma solução de clorpirifós metílico na concentração de 25 µg/mL. Os resultados foram reportados em porcentagens de recuperação e avaliados de acordo com a faixa aceitável de 50 a 150%²⁷.

Controle de qualidade externo

O laboratório tem participado de programas de ensaio de proficiência para determinação de agrotóxicos em alimentos nos âmbitos internacional e nacional, como o Food Analysis Performance Assessment Scheme (FAPAS) da Food

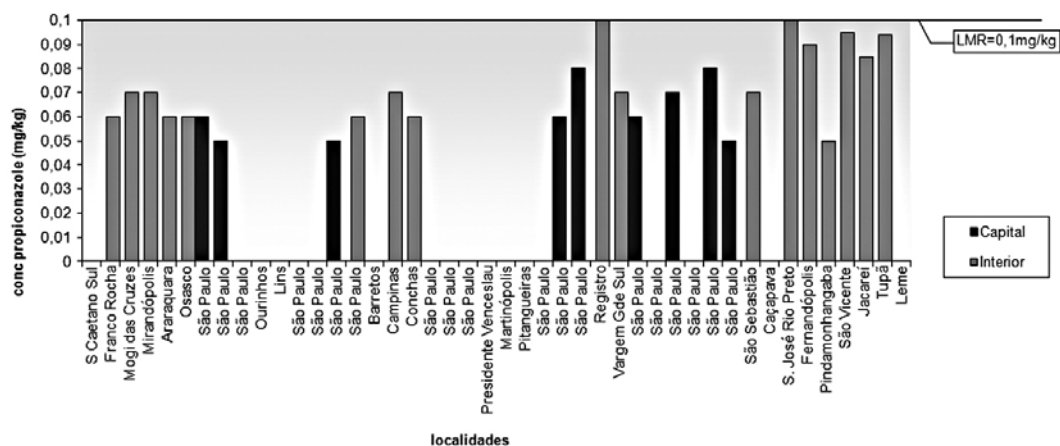


Figura 1. Distribuição dos resultados de resíduos de propiconazol encontrados nas amostras de arroz, em ordem cronológica de coleta de amostras, 2009

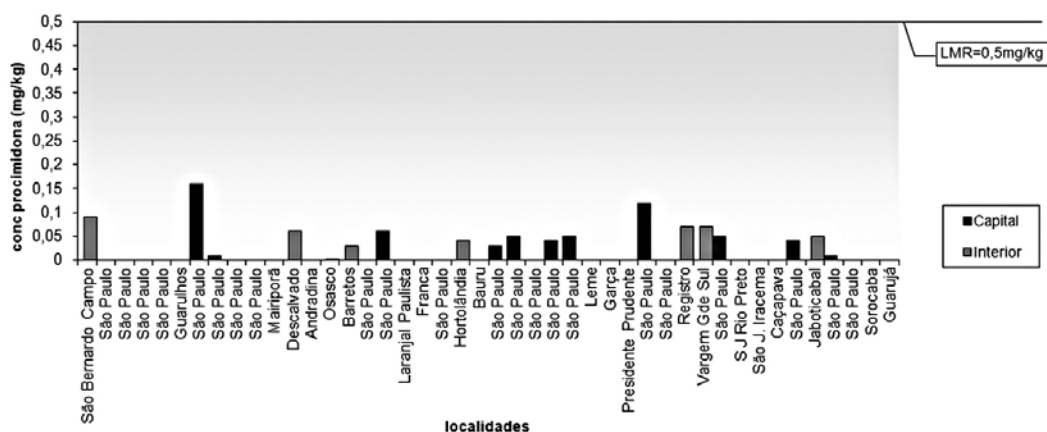


Figura 2. Distribuição dos resultados de resíduos de propiconazol encontrados nas amostras de feijão, em ordem cronológica de coleta de amostras, 2009

and Environment Research Agency (FERA)²⁸ e do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método multirresíduo apresentou uma boa exatidão para os i.a. estudados, com recuperações entre 71% e 115%, no nível do LQ. Os DPR variaram de 7 a 20% e estão de acordo com o estabelecido, segundo o qual o DPR esperado deve ser no máximo de 20%^{24,26}, exceto para trifluralina que foi de 22%. Os LD e LQ dos analitos estudados variaram de 0,02 a 0,5 mg/kg e de 0,05 a 1,0 mg/kg, respectivamente. Os valores do LD e LQ do método, LMR e as faixas de trabalho dos i.a. de agrotóxicos estudados encontram-se nas Tabelas 2 e 3.

Com relação ao controle de qualidade interno, os valores das recuperações de clorpirifós metílico apresentaram-se dentro da faixa aceitável de 50-150%²⁷.

Foram encontrados resíduos de propiconazol em 26 (59%) das amostras de arroz, sendo 10 (53%) da capital e 16 (64%) do interior do estado de São Paulo (Figura 1). Os níveis de propiconazol, fungicida altamente tóxico, variaram de 0,05 a 0,1 mg/kg, dentro do LMR permitido em arroz, que é de 0,1 mg/kg¹⁴ (Figura 1). Nos resultados do PARA de 2009¹⁷, das 162 amostras de arroz analisadas provenientes de outros estados brasileiros foram encontradas seis com resíduos de propiconazol em níveis entre 0,02 e 0,1 mg/kg e somente uma amostra com nível acima do LMR.

O arroz industrializado passa por processo de retirada da casca e polimento, podendo o tipo I também receber uma pré-lavagem. Porém, resíduos de i.a. de agrotóxicos que apresentem ação sistêmica, como o propiconazol, uma vez utilizados, têm maior probabilidade de remanescerem pelo fato de que, quando aplicados nas plantas, circulam através da seiva por todos os tecidos vegetais e se distribuem uniformemente.

As estimativas de risco à saúde pela exposição ao propiconazol pela ingestão de arroz representam 0,15 e 0,58% da Ingestão Diária Aceitável (IDA) de 0,04 mg/kg p.c.¹⁴ para as populações adulta e infantil, respectivamente.

No feijão, foram encontrados resíduos de procimidona em 11 (25%) das amostras, sendo 6 (27%) da capital de São Paulo e 5 (23%) de outros municípios do estado de São Paulo, em níveis entre 0,05 e 0,1 mg/kg, abaixo do LMR permitido de 0,5 mg/kg (Figura 2). A procimidona usada como fungicida, grupo químico dicarboximida, classe toxicológica IV (pouco tóxico), é autorizada na forma de uso foliar em feijão¹⁴.

Os demais agrotóxicos permitidos não apresentaram resíduos e não foram detectados i.a. de uso não autorizado (Tabelas 2 e 3).

As estimativas de risco à saúde pela exposição à procimidona por meio da ingestão de feijão representam 0,02% e 0,1% da IDA de 0,1 mg/kg p.c.¹⁴ para as populações adulta e infantil, respectivamente.

No relatório do Programa Paulista realizado em São Paulo no ano de 2002, não foram detectados resíduos agrotóxicos organofosforados, organoclorados e piretroides em 43 amostras de arroz destinado ao consumo doméstico e 45 amostras de feijão²⁹.

Souza³⁰ investigou alimentos cozidos no Restaurante Universitário, em Brasília (Brasil), e não detectou organofosforados em arroz ou feijão.

De acordo com os resultados de monitoramento divulgados pelo PARA 2009¹⁷, foram quantificados 9 i.a. de uso autorizado em arroz, abaixo dos respectivos LMR e detectados 19 i.a. de uso não autorizado, pelas técnicas de cromatografia a líquido e a gás, ambas acopladas à espectrometria de massas (LC/MS/MS e CG/MS/MS). Para feijão, foram encontrados resíduos acima do LMR em 2 (1,2%) das 164 amostras, uma com clorpirifós e uma com tebuconazol, além de seis outros i.a. de uso não autorizado.

No Japão, Otake et al.³¹ realizaram um estudo de 10 i.a. de agrotóxicos em 54 amostras de arroz comercial e detectaram ferinzone em apenas uma amostra de arroz não polido.

Lee et al.³², na República da Coreia, quantificaram 47 resíduos de pesticidas em arroz polido e obtiveram a presença de triclozole e fenobucarbe, mas nenhuma amostra apresentou resíduos acima dos LMR estabelecidos.

Outro estudo foi realizado no Japão por Kobayashi et al.³³ em 343 amostras de arroz adquiridas

Tabela 2. Resultados dos agrotóxicos analisados nas amostras de arroz (N=44) e os respectivos LD, LQ, LMR e faixa de trabalho

Resíduo de Agrotóxico	Faixa trabalho (pg/µL)	LD (mg/kg)	LQ (mg/kg)	LMR (mg/kg)	Resultado (N=44) (mg/kg)
Alacloro	1,25-20	0,02	0,05	NA	ND
Aldrin	2,5-25	0,02	0,05	NA	ND
Azoxistrobina	2,5-50	0,05	0,1	0,1	ND
Betacipermetrina	12,5-125	0,1	0,3	0,3	ND
Bifentrina	1,25-12,5	0,02	0,05	0,7	ND
Bioletrina	5-60	0,05	0,1	NA	ND
Carbofenotiona	40-1200	0,2	0,5	NA	ND
Clorotalonil	2,5-25	0,02	0,05	2,0	ND
Clorpirifós metílico	100-1200	0,2	0,5	NA	ND
Deltametrina	12,5-200	0,2	0,5	1,0	ND
Diazinona	40-1200	0,2	0,5	NA	ND
Dieldrin	2,5-40	0,02	0,05	0,05	ND
Diclorvos	20-1200	0,2	0,5	NA	ND
Difeconazole	25-250	0,5	1,0	1,0	ND
Endrin	2,5-40	0,05	0,1	NA	ND
Esfenvalerato	12,5-200	0,2	0,5	1,0	ND
Fenitrotiona	100-1200	0,2	0,5	NA	ND
Fentiona	40-1200	0,2	0,5	NA	ND
Fentoato	100-1200	0,2	0,5	NA	ND
Forato	20-1200	0,2	0,5	NA	ND
HCH alfa	2,5-25	0,02	0,05	NA	ND
HCH beta	5-50	0,05	0,1	NA	ND
Hexaclorobenzeno (HCB)	1,25-20	0,02	0,05	NA	ND
Lindano (gama HCH)	1,25-20	0,02	0,05	NA	ND
Malationa	50-1000	0,2	0,5	8,0	ND
Metoxicloro	1,25-20	0,02	0,05	NA	ND
Parationa metílica	50-1000	0,1	0,3	0,1	ND
Permetrina	2,5-50	0,1	0,3	0,1	ND
Pirimifós metílico	40-1200	0,2	0,5	10,0	ND
Procimidona	1,25-20	0,02	0,05	NA	ND
Propiconazol	2,5-25	0,02	0,05	0,1	0,05-0,1 (N=26) vide Fig. 1
Triazofós	40-1200	0,2	0,5	NA	ND
Trifluralina	1,25-20	0,02	0,05	0,05	ND
Vinclozolina	2,5-25	0,03	0,05	NA	ND

LD: Limite de Detecção; LQ: Limite de Quantificação; LMR: Limite Máximo de Resíduo; NA: Não autorizado; ND: Não detectado, menor que o LD; HCH: Hexaclorociclohexano

Tabela 3. Resultados dos agrotóxicos analisados nas amostras de feijão (N=44) e os respectivos LD, LQ, LMR e faixa de trabalho

Resíduo de Agrotóxico	Faixa trabalho (pg/µL)	LD (mg/kg)	LQ (mg/kg)	LMR (mg/kg)	Resultado (N=44) (mg/kg)
Alacloro	1,25-20	0,02	0,05	NA	ND
Aldrin	2,5-25	0,02	0,05	NA	ND
Azoxistrobina	2,5-50	0,05	0,1	0,1	ND
Betacipermetrina	12,5-125	0,1	0,3	NA	ND
Bifentrina	1,25-12,5	0,02	0,05	0,02	ND
Bioletrina	5-60	0,05	0,1	NA	ND
Carbofenotona	40-1200	0,2	0,5	NA	ND
Clortalonil	2,5-25	0,02	0,05	0,1	ND
Clorpirifós etílico	40-1200	0,1	0,5	0,1	ND
Deltametrina	12,5-200	0,2	0,5	0,2	ND
Diazinona	40-1200	0,2	0,5	NA	ND
Dieldrin	2,5-40	0,02	0,05	NA	ND
Diclorvos	20-1200	0,2	0,5	NA	ND
Difenoconazole	25-250	0,5	1,0	0,5	ND
Dissulfoton	40-1200	0,2	0,5	NA	ND
Endrin	2,5-40	0,05	0,1	NA	ND
Etoprofós	2,5-50	0,2	0,5	NA	ND
Fenamifós	50,0-1000	0,2	0,5	NA	ND
Fenitrotona	100-1200	0,2	0,5	NA	ND
Fentiona	40-1200	0,2	0,5	NA	ND
Fentoato	100-1200	0,2	0,5	NA	ND
HCH alfa	2,5-25	0,02	0,05	NA	ND
HCH beta	5-50	0,05	0,1	NA	ND
Hexaclorobenzeno (HCB)	1,25-20	0,02	0,05	NA	ND
Lambdacialotrina	25-250	0,02	0,05	0,05	ND
Lindano (gama HCH)	1,25-20	0,02	0,05	NA	ND
Malationa	50-1000	0,2	0,5	8,0	ND
Metoxicloro	1,25-20	0,02	0,05	NA	ND
Parationa metílica	50-1000	0,02	0,1	0,05	ND
Permetrina	2,5-50	0,1	0,3	NA	ND
Pirimifós etílico	100-1000	0,2	0,5	NA	ND
Pirimifós metílico	40-1200	0,2	0,5	0,5	ND
Procimidona	1,25-20	0,02	0,05	0,5	0,05-0,1 (N=11)
Propiconazole	2,5-25	0,05	0,1	0,05	ND
Profenofós	40-1200	0,05	0,1	0,1	ND
Protiofós		0,2	0,5	NA	ND
Trifluralina	1,25-20	0,03	0,05	0,05	ND
Vinclozolina	2,5-25	0,03	0,05	0,5	ND

LD: Limite de Detecção; LQ: Limite de Quantificação; LMR: Limite Máximo de Resíduo; NA: Não autorizado; ND: Não detectado, menor que o LD

em supermercados de Tóquio, no período de abril de 1995 a março de 2005. Foram encontrados resíduos de agrotóxicos em 79 (23%) das amostras, todas consideradas seguras para o consumo humano.

Com o avanço tecnológico e o uso de técnicas mais sensíveis, torna-se cada vez mais possível analisar um maior número de agrotóxicos, em níveis de detecção e de quantificação cada vez menores.

Destacamos a importância da continuidade de pesquisas na área de resíduos de agrotóxicos para conhecimento dos níveis nos alimentos e em outras amostras, como água, de consumo e ambientais para subsidiar ações que eliminem ou minimizem o risco à saúde humana e ao meio ambiente.

CONCLUSÃO

Conclui-se que a exposição ao propiconazol, por meio da ingestão de arroz, e à procimidona, pela ingestão de feijão, representam valores abaixo das IDAs estabelecidas para as populações adulta e infantil e que os demais agrotóxicos pesquisados não apresentaram resíduos iguais ou maiores que o LD do método utilizado. Esta pesquisa contribui com dados de resíduos de agrotóxicos em arroz e feijão, escassos no país, que subsidiam avaliações para prevenção de riscos à saúde da população pelo consumo de alimentos.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Irani Cristiane da Silva, ao Reinaldo Amauri Ribeiro e à Antonia de Lima Silva pelo apoio técnico na realização das análises.

REFERÊNCIAS

1. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA, Agência de Informação Embrapa, CNPTIA. Cultivos Arroz. [acesso 2011 mai 31]. Disponível em: [http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/arroz/Abertura.html].
2. Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB. Acompanhamento da safra brasileira: Grãos. Safra 2010/2011. Quarto levantamento. Janeiro 2011, Brasília. [acesso 2011 mai 31]. Disponível em: [http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_01_06_08_41_56_boletim_graos_4o_leve_safra_2010_2011.pdf].

3. Gomes AS et al. Cultivo do Arroz Irrigado no Brasil, Importância Econômica, Agrícola e Alimentar do Arroz. *Sist Prod*. 2005; 3. *In*: Gomes AS et al. Cultivo de arroz irrigado no Brasil. [acesso 2011 mai 31]. Disponível em: [http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrrigadoBrasil/cap01.htm].
4. Abreu AFB. Cultivo do Feijão da Primeira e Segunda Safra na Região Sul de Minas Gerais, Introdução e Importância Econômica. *Sist Prod*. 2005; 6. [acesso 2011 mai 31]. Disponível em: [http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoPrimSegSafraSulMG/index.htm].
5. Machado JLA. Feijão: O Alimento do Povo. [acesso 2011 mai 31]. Disponível em: [http://www.cifeijao.com.br/index.php?p=artigo&idA=103].
6. Aidar H. Feijão, Sistemas de Produção, Cultivo do feijoeiro comum. *Sist Prod*. 2003; 2. [acesso 2011 mai 31]. Disponível em: [http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/CultivodoFeijoeiro/index.htm].
7. Ferreira CM. Sustentabilidade de sistemas de produção de grãos: caso do arroz de terras altas [tese de doutorado]. Brasília (DF): Universidade de Brasília; 2007.
8. Paula Jr TJ, Venzon M. 101 Culturas. Manual de Tecnologias Agrícolas. Belo Horizonte (MG): Epamig; 2007.
9. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. Arroz e feijão, composição nutricional. [acesso 2011 jun 31]. Disponível em: [http://www.cnpaf.embrapa.br/parperfeito/feijao/composicao.htm].
10. Pereira RC. Feijão com arroz: a combinação perfeita. *Rev Saúde* [acesso 2011 mai 31]. Disponível em: [http://saude.abril.com.br/edicoes/0294/nutricao /conteudo_266006.shtml].
11. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009 (POF). Tabela 1.4 - Aquisição alimentar domiciliar per capita anual, por Unidades da Federação, segundo os produtos - Região Sudeste - período 2008-2009. [acesso 2011 mai 31]. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_aquisicao/tabelas_pdf/tab14.pdf].
12. Alonço AS et al. Cultivo do Arroz Irrigado no Brasil, Uso de Agrotóxicos. *Sist Prod*. 2005; 3. [acesso 2011 mai 31]. Disponível em: [http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrrigadoBrasil/cap14.htm].
13. Klaassen CD. Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. 7th ed. New York: McGraw-Hill Companies; 2008.
14. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 165, de 29 de agosto de 2003. Determina a publicação do "Índice das monografias dos ingredientes ativos de agrotóxicos, domissanitários e preservantes de madeira", cujo emprego encontra-se autorizado conforme descrito no Anexo I. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília DF, 02 set 2003. p.48-50 e atualizações. [acesso 2011 mai 31]. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/home/agrotoxicotoxicologia/tut/p/c5].
15. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasília, Brasil). Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Relatório de Atividades de 2001-2007. Gerência Geral de Toxicologia. Brasília (DF): ANVISA; 16 jun 2008; 21p. [acesso 2011 mai 31]. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/587f64804745787985d4d53fbc4c6735/relatorio+2001+2007.pdf?MOD=AJPERES].
16. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasília, Brasil). Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Nota Técnica para divulgação dos resultados do PARA de 2008. Gerência Geral de Toxicologia. Brasília (DF): ANVISA; 15 abr 2009; 12p. [acesso 2011 mai 31]. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/c66e25804067a87e8345eb137b78f2dc/nota+tecnica+-+resultados+para+2008.pdf?MOD=AJPERES].
17. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasília, Brasil). Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Relatório de Atividades de 2009. Gerência Geral de Toxicologia. Brasília (DF): ANVISA; 22 jun 2010; 22p. [acesso 2011 mai 31]. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d214350042f576d489399f536d6308db/RELAT%C3%93RIO+DO+PARA+2009.pdf?MOD=AJPERES].
18. Food and Agriculture Organization of the United Nations. World Health Organization. Food Standards Programme. Codex Alimentarius Commission. Pesticide Residues in Food. Methods of Analyses and Sampling. 2nd ed. 2000: 2(A), Part.1.
19. Centro de Vigilância Sanitária (CVS). Programa Paulista de Análise Fiscal de Alimentos 2009. [acesso 2011 mai 31]. Disponível em: [http://www.cvs.saude.sp.gov.br/pdf/pp2009.pdf].
20. São Paulo. Secretaria de Estado da Saúde. Centro de Vigilância Sanitária. Portaria nº 21, de 28 de novembro de 2003. Aprova o regulamento técnico de procedimentos operacionais padronizados para análise fiscal de alimentos. Diário Oficial [do] Estado de São Paulo, São Paulo, SP, 29 nov. 2003. [acesso 2011 Mai 31]. Disponível em: [http://www.cvs.saude.sp.gov.br/download.asp?tipo=zip&arquivo=03pcvsial.zip].
21. Inspectorate for Health Protection, Ministry of Public Health, Welfare and Sports, The Hague/Rijswijk, The Netherlands. Analytical methods for pesticide residue in foodstuffs. 6^a ed. Netherlands; 1996. Part 1 - Multiresidue methods.
22. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo - Brasil). Resíduos de Pesticidas. *In*: Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4^a ed. Brasília (DF): ANVISA; 2005. p. 683-701.
23. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial - INMETRO. Orientações sobre validação de Métodos de Ensaio Químicos. DOC-CGCRE-008. Revisão 02. Brasília (DF): INMETRO; 2007.
24. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 216, de 15 de dezembro de 2006. Estabelece parâmetros mínimos para validação de método analítico para estudos de resíduos de agrotóxicos e afins em produtos de origem vegetal e em cogumelos *in natura* destinados ao consumo humano e/ou animal. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília DF, 21 ago 2006. [acesso 2011 mai 31]. Disponível em: [http://www.brasilsus.com.br/legislacoes/rdc/16887-216.html].
25. Toledo HHB et al. Manual de Procedimentos: Estudo dos Resíduos em Plantas, Parte A. Associação GARP; 2002.
26. European Commission. National Food Administration. Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed. Document nº SANCO/10684/2009 (01/01/2010). [acesso 2011 mai 31]. Disponível em: [http://www.crl-pesticides.eu/library/docs/allcrl/AqcGuidance_Sanco_2009_10684.pdf]

27. United States Department of Agriculture, Agricultural Marketing Service, Science & Technology, Pesticide Data Program. PDP-QC: Chemical Compounds, PDP Commodity Grouping, Method Validation and Quality Control; Rev.1. 2010. [acesso 2011 mai 31]. Disponível em: [<http://www.ams.usda.gov/AMSV1.0/getfile?dDoc Name=STELPRDC5077864>].
28. The Food and Environment Research Agency - FERA. Food Analysis Performance Assessment Scheme (FAPAS). [acesso 2011 mai 31]. Disponível em: [<http://www.fapas.com/proficiency-testing-schemes/fapas/>].
29. São Paulo. Secretaria de Estado da Saúde. Centro de Vigilância Sanitária. Comunicado Conjunto CVS/IAL nº 01/03, de 15/01/2003. Resultado do Programa de Análise Fiscal de Alimentos – Programa Paulista 2002. Diário Oficial [do] Estado de São Paulo. São Paulo, SP, 01 fev. 2003. Seção I, Suplemento.
30. Souza MV. Resíduos de agrotóxicos ditiocarbamatos e organofosforados em alimentos consumidos no restaurante universitário UnB: Avaliação da exposição humana [dissertação de mestrado]. Brasília (DF): Universidade de Brasília; 2006.
31. Otake T, Aoyagi Y, Yarita T. Multiresidue analysis and monitoring of pesticides in rice by pressurized liquid extraction. *J Environ Sci Health B*. 2009; 44(5):423-7.
32. Lee SJ, Park HJ, Kim W, Jin JS, Abd El-Atya M, Shin SC. Multiresidue analysis of 47 pesticides in cooked wheat flour and polished rice by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Biom Chromat*. 2009;23(4):434-42.
33. Kobayashi M, Takano I, Tamura Y, Tomizawa S, Teteichi Y, Sakai N et al. Survey of pesticide residues in rice (April, 1995 March, 2005). *J Food Hyg Soc Jpn*. 2007;48(2):35-40.

Otimização e validação de metodologia analítica para determinação de flavonóis e flavonas por CLAE em pólen apícola utilizando-se Análise de Superfície de Resposta

Optimization and validation of HPLC methodology for determining flavonols and flavones in bee pollen by surface methodology

RIALA6/1353

Márcia Cristina Teixeira MARTINS^{1,2*}, Delia RODRIGUEZ-AMAYA², Marcelo Antonio MORGANO³, Maria Isabel RODRIGUES⁴

*Endereço para correspondência: ¹Centro Universitário Adventista de São Paulo, Estr. Itapecerica, 5.898, São Paulo/SP, Brasil. CEP 05858-001. Tel.: 11 2128-8000. E-mail: marciactm@yahoo.com.br.

²Laboratório de Carotenoides, Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

³Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos, Instituto de Tecnologia de Alimentos.

⁴Departamento de Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

Recebido: 04.02.2011 – Aceito para publicação: 01.06.2011

RESUMO

Foi otimizada a metodologia analítica para determinar quatro flavonóis: miricetina (M), quercetina (Q), kanferol (K) e isoramnetina (I); e duas flavonas: luteolina (L) e apigenina (A) em amostras de pólen apícola desidratado produzidas em três estados brasileiros: Bahia (BA), São Paulo (SP) e Santa Catarina (SC). Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) foi utilizado para investigar os efeitos da concentração de HCl e do tempo de hidrólise sobre a concentração de cada flavonoide. A condição ótima encontrada para extração/hidrólise dos flavonoides estudados foi: 1,0M HCl/30 minutos. A melhor separação dos flavonoides foi conseguida com a coluna de fase reversa Symmetry C18 e fase móvel de metanol:tetrahidrofurano:água (26:57:17), acidificados com 0,3% de ácido fórmico em corrida isocrática (CLAE). As curvas-padrão apresentaram coeficientes de correlação superiores a 0,99. Os limites de detecção foram de 1,04, 0,88, 0,89, 1,64, 0,82 e 1,19 µg/mL respectivamente para M, L, Q, A, I e K.

Palavras-chave. flavonoides, pólen apícola, CLAE, delineamento estatístico de experimentos.

ABSTRACT

The analytical methodology for the determination of four flavonols: myricetin (M), quercetin (Q), kanferol (K), isoramnetin (I); and two flavones: luteolin (L) and apigenin (A) in samples of dehydrated bee pollen produced in three Brazilian states: Bahia (BA), São Paulo (SP) and Santa Catarina (SC) was optimized. Central Composite Rotational Design was used to investigate the effects of HCl concentration and hydrolysis time on the concentration of each flavonoid. The optimum condition found for extraction/hydrolysis of the flavonoids studied was 1.0M HCl/30 minutes. The best separation of the flavonoids was achieved with a reverse phase Symmetry C18 column with methanol:tetrahydrofuran:water (26:57:17) acidified with 0.3% formic acid as mobile phase in isocratic elution (HPLC). The standard curves presented coefficients of correlation superior to 0.99. The limits of detection were 1.04, 0.88, 0.89, 1.64, 0.82 and 1.19 µg/mL for L, Q, A, I and K, respectively.

Keywords. flavonoids, bee pollen, HPLC analysis, statistical experimental design.

INTRODUÇÃO

O pólen apícola tem atraído a atenção de pesquisadores devido às suas propriedades bioativas e às possibilidades do seu emprego medicinal na prevenção e tratamento de algumas patologias¹. Estudos têm apontado para as propriedades bioativas do pólen apícola, bem como de seus extratos, devido ao considerável conteúdo de compostos fenólicos (tais como flavonoides, ácidos fenólicos e diterpenos fenólicos)²⁻⁴, que, dentre outras propriedades biológicas, possuem ação antioxidante investigada em experimentos realizados *in vitro*³⁻⁵, em culturas de células⁶ e em animais de laboratório⁷.

Flavonoides estão presentes em pólen apícola na forma livre ou como glicosídeos e são em geral altamente hidroxilados, tal como o kanferol^{1,8}. Esses compostos são reconhecidos como potenciais marcadores taxonômicos^{9,10}. Assim, diversos estudos relacionam o conteúdo de flavonoides do pólen com a sua origem floral⁹⁻¹⁵.

Sete agliconas (isoramnetina, kanferol, luteolina, miricetina, quercetina, selagina e tricetina) e ao redor de quarenta glicosídeos já foram identificados no pólen apícola^{2,10,11,13-19}.

Poucos trabalhos investigaram o teor de flavonoides no pólen apícola. Campos et al.²⁰ observaram que o conteúdo de flavonoides alcançou 5.000 µg/g, enquanto Serra-Bonvehi et al.² encontraram valores médios de 5.100 µg/g de flavonoides totais em 11 amostras de pólen espanhol. Oitenta e dois por cento das amostras de pólen apícola analisadas por Serra-Bonvehi et al.² continham no mínimo 14 componentes fenólicos, primariamente rutina, quercetina, miricetina e ácidos cinâmicos. Recentemente, LeBlanc et al.⁵ determinaram o teor de flavonóis e flavonas (expresso em equivalentes de quercetina) em 6 amostras de pólen apícola coletadas no deserto de Sonora (Arizona, EUA), tendo encontrado valores entre 2.660 e 5.480 µg/g. Analisando amostras de pólen apícola provenientes da Romênia, Marghitas et al.²¹ encontraram teores de flavonoides totais (expressos em equivalentes de quercetina) que variaram entre 600 e 13.600 µg/g.

Três trabalhos estudaram os flavonoides presentes em amostras de pólen apícola brasileiras^{4,17,22}. Freire et al.¹⁷ avaliaram o perfil cromatográfico de flavonoides e sua correlação com a origem botânica de amostras do nordeste brasileiro. Carpes et al.²² determinaram o teor de compostos fenólicos totais em extratos etanólicos de pólen apícola por método espectrofotométrico, tendo encontrado níveis superiores a 10.000 µg/g em extratos a

60, 70 e 80%. Em outro estudo, Carpes et al.⁴ encontraram teores de compostos fenólicos totais variando entre 19.280 e 48.900 µg/g (expressos em equivalente de ácido gálico) em extratos etanólicos a 70% preparados com amostras de pólen da região sul do Brasil. O teor de rutina foi determinado em duas amostras (841 e 991 µg/g) e o teor de miricetina em uma amostra (695 µg/g).

Nos primeiros estudos realizados com o objetivo de identificar os flavonoides presentes em pólen os compostos geralmente extraídos com metanol foram isolados e purificados por técnicas cromatográficas, tais como: cromatografia em camada delgada, cromatografia dimensional em papel, cromatografia de coluna aberta e CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) semipreparativa. A identificação foi realizada por métodos clássicos de espectrofotometria de UV ou por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), com ou sem hidrólise prévia. A identificação também foi feita por comparações com padrões e por reações químicas específicas^{10,11,14,15,20}.

Serra Bonvehí et al.² identificaram e quantificaram agliconas livres presentes em amostras de pólen apícola espanhol por CLAE/DAD (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos). Freire et al.¹⁷ também identificaram os flavonoides por CLAE/DAD. Um pico desconhecido foi isolado por cromatografia de coluna e identificado por RMN. No trabalho de Arráez-Román et al.¹⁶ os compostos foram isolados e identificados por eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas com ionização por *eletrospray* e nos trabalhos de Carpes et al.^{4,22} e Guo et al.¹⁸ os compostos foram isolados e identificados por CLAE/DAD. Mais recentemente, Ferreres et al.¹⁹ empregaram CLAE/DAD associada a um espectrômetro de massas acoplado a um *ion trap* com interface de ionização por *eletrospray* para identificação dos flavonoides não coloridos de pólen apícola unifloral.

A determinação quantitativa de glicosídeos de flavonoides individuais em materiais vegetais é difícil devido ao seu grande número e pela dificuldade de obter todos os seus padrões. Foram descritos mais de cinquenta diferentes glicosídeos dos flavonoides mais comuns²³. Por esse motivo, na maior parte dos procedimentos analíticos desenvolvidos para quantificar os flavonoides, os glicosídeos são hidrolisados e as agliconas resultantes são identificadas e quantificadas. A hidrólise dos glicosídeos oferece um método prático empregado principalmente quando se requer dados para um grande número de flavonoides²⁴ ou quando se deseja quantificar um grande

número de amostras. Essa estratégia já foi empregada no nosso laboratório para alimentos, como frutas e hortaliças *in natura* e processadas, chás, erva-mate e bebidas²⁵⁻²⁸.

Os glicosídeos são hidrolisados por concentrações relativamente altas de ácidos (geralmente HCl) numa mistura de metanol aquoso (50:50, V/V)^{29,30}. Esforços têm sido realizados para desenvolver ou otimizar procedimentos de hidrólise e extração que garantam uma extração eficiente sem resultar na degradação de agliconas, a fim de obter uma recuperação quantitativa desses compostos^{26,27,31}.

Embora seja possível otimizar processos (tais como as condições de extração e hidrólise dos flavonoides) por métodos empíricos que avaliam um fator de cada vez, estes demandam muito tempo e podem ignorar as interações entre os fatores. Por outro lado, os métodos estatísticos de otimização consideram as interações entre os fatores estudadas³². Um dos métodos que permite avaliar os efeitos dos muitos fatores e suas interações sobre as variáveis de resposta é a Análise de Superfície de Resposta (ASR), originalmente descrita por Box et al.³³ e empregada com êxito em nosso laboratório para análise de flavonoides em frutas e hortaliças *in natura* e processadas^{26,27}.

A cromatografia líquida de alta eficiência tem sido utilizada maciçamente para quantificação das agliconas dos flavonoides. A eletroforese capilar apresenta resultados promissores, mas o número de trabalhos é muito menor em relação à CLAE. A separação dos flavonoides por CLAE emprega, na maior parte das análises, colunas de fase reversa e detector de arranjo de diodos²⁴.

Diante desse contexto e considerando a necessidade de maior informação sobre os flavonoides do pólen apícola nacional, o objetivo do presente estudo foi otimizar através de delineamento estatístico as condições para extração e hidrólise, bem como estabelecer as melhores condições cromatográficas para separação de quatro flavonóis (miricetina, quercetina, kanferol e isoramnetina) e duas flavonas (luteolina e apigenina) usando CLAE/DAD em amostras de pólen apícola brasileiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Foram realizados três estudos de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para amostras de pólen apícola adquiridas diretamente dos produtores e provenientes de três estados brasileiros (Bahia, Santa Catarina e São Paulo). Foram selecionadas três amostras, sendo uma de cada estado. As amostras estavam prontas

para serem comercializadas (produto desidratado, limpo e embalado). O estado de São Paulo é um dos principais estados consumidores de pólen no Brasil no qual o preço de venda do produto é mais elevado. Os estados de Santa Catarina e Bahia representam dois importantes polos produtores de pólen no Brasil, além de distintas condições climáticas, a saber: clima mesotérmico (subtropical úmido) em Santa Catarina e tropical ou tropical semiárido na Bahia³⁴. A região do município de Canavieiras (BA) produz mensalmente até uma tonelada de pólen desidratado para consumo no mercado nacional¹⁷.

As amostras (com peso variando entre 200 e 300 g) foram enviadas no mesmo mês da coleta em sacos plásticos, sendo que todas se apresentavam granuladas. Imediatamente ao receber as amostras, essas foram seladas a vácuo usando um filme de poliamida e polietileno para evitar absorção de umidade e oxigênio e armazenadas em freezer a -16 °C até o momento das análises, quando foram quarteadas em quarteador de inox e, em seguida, trituradas em moinho refrigerado, com hélice de tungstênio (M20, IKA Labortechnik, Staufen, Baden, Ge). Em seguida, as amostras foram tamisadas usando-se malhas de 30 mesh (600 µm) para padronizar o tamanho das partículas de pólen.

Reagentes e Padrões

As fases móveis e as amostras foram preparadas utilizando-se água purificada em sistema Milli-Q (Millipore, Bellerica, EUA). Os solventes metanol e tetrahidrofurano (THF) grau cromatográfico foram adquiridos da Mallinckrodt (Philipsburg, EUA). Ácido ascórbico, ácido fórmico e ácido clorídrico de grau analítico foram adquiridos da Labsynth Ltda. (São Paulo, Brasil). As fases móveis foram filtradas em filtros politetrafluoroetileno (PTFE) da Millipore (Bellerica, EUA), com poros de 0,45 µm de diâmetro.

Os padrões de miricetina (M), quercetina (Q), luteolina (L), kanferol (K), apigenina (A) e isoramnetina (I) foram adquiridos da Sigma Chemicals Co. (St. Louis, EUA). Soluções estoque dos padrões foram preparadas pela dissolução de cada flavonoide em metanol grau cromatográfico, em concentração de aproximadamente 500 µg/mL e conservadas a -18 °C protegidas da luz. As soluções estoque apresentaram estabilidade superior a 2 meses nessas condições.

Equipamento e condições cromatográficas

As condições de análise cromatográfica foram desenvolvidas com base em trabalhos anteriores^{25-27,35} e adaptadas ao pólen apícola. As análises foram conduzidas

em um módulo de separação a líquido Waters (modelo 2690), (Milford, EUA), equipado com injetor manual Rheodyne (modelo 7725i), DAD da Waters (modelo 996), controlado pelo Software Millennium 32 (Scientific Equipment Source, Pickering, Canada). A vazão da fase móvel foi de 0,2 mL/min e o volume de injeção de 5 µL. A quantificação foi fixada em 370 nm.

Para separação dos flavonoides agliconas foi empregada uma coluna Symmetry C18 (2,1 x 150 mm, 3,5 µm) da Waters. As condições cromatográficas foram definidas após a realização de testes com uma mistura de padrões dos seis compostos em estudo, M, Q, L, K, A e I, dissolvidos em metanol, adicionado de ácido clorídrico e ácido ascórbico, conforme o procedimento empregado para as amostras. Neste estudo, duas combinações de fases móveis foram testadas em várias proporções, em gradientes diversos e em corridas isocráticas: 1) água e metanol e 2) água, metanol e THF, ambas acidificadas com 0,3% de ácido fórmico. Posteriormente, extratos hidrolisados das amostras de pólen, com ou sem cocromatografia com padrões, foram injetados no cromatógrafo sob as melhores condições conseguidas para os padrões, fazendo os ajustes necessários para a melhor resolução dos picos.

A identificação dos flavonóis e flavonas foi feita por comparação dos tempos de retenção, cocromatografia e pelos espectros obtidos através do detector de arranjo de diodos, utilizando-se padrões.

A quantificação foi realizada por padronização externa. As curvas de calibração foram construídas pela injeção em triplicata de soluções-padrão em cinco concentrações diferentes, cobrindo a faixa de concentração esperada nas amostras e simulando as condições de hidrólise. Alíquotas da solução estoque de cada padrão foram diluídas em 1,5 mL de água purificada em Mili-Q com ácido ascórbico (0,04% na solução de injeção). A esta solução foi adicionado 1 mL de HCl 5M (equivalente a 1,0 M na solução de injeção) e o volume foi completado a 5 mL com metanol.

Extração e hidrólise dos flavonoides

A extração e a hidrólise dos flavonoides foram baseadas no método de Hertog et al.²⁹ que empregou solução aquosa a 50% de metanol em meio acidificado com HCl em condições de refluxo. Ácido ascórbico foi utilizado como antioxidante, conforme a recomendação de Häkkinen et al.³⁶ para prevenir a degradação de miricetina.

Amostras homogêneas de pólen foram pesadas, adicionadas de quantidade conhecida de água (em proporções de 1:3,5) e ácido ascórbico e homogeneizadas

durante 2 minutos na velocidade 15 em homogeneizador do sistema Polytron MR2100, Kinematica-AG (Luzern, Suíça). Foram tomados 7,5 g desse homogeneizado, acrescidos de 12,5 mL de metanol e 5 mL de HCl em diferentes concentrações molares iniciais. As soluções de extração assim obtidas consistiram-se em diferentes concentrações molares finais de HCl em solução aquosa de metanol 50% (v/v), com 0,04% de antioxidante (ácido ascórbico). Esses extratos foram levados a refluxo a 90°C durante diferentes períodos. Em seguida, foram resfriados e filtrados em funil de Buchner com placa porosa de vidro sinterizado, número 2. O volume foi completado a 50 mL com metanol e as soluções foram homogeneizadas manualmente. Alíquotas médias de 2 mL foram filtradas em filtro de PTFE (Millipore, Bellerica, EUA) de 0,45 µm de diâmetro, antes da análise por CLAE.

Planejamento experimental e análise de superfície de resposta

A otimização das condições de extração e hidrólise dos flavonóis e flavonas de três amostras de pólen (uma amostra de cada estado – Bahia, São Paulo e Santa Catarina) foi realizada por meio da Análise de Superfície de Resposta, com o objetivo de obter eficiência máxima de extração e hidrólise sem promover degradação dos flavonoides. A avaliação dos efeitos da concentração do ácido (0 a 2 M) e do tempo de hidrólise (0 a 60 minutos) sobre a eficiência da extração e hidrólise dos flavonoides foi realizada através de três DCCRs³⁷, ou seja, planejamentos 2², incluindo 4 ensaios nas condições axiais e 4 repetições no ponto central, totalizando 12 experimentos conduzidos aleatoriamente.

A Tabela 1 apresenta a matriz do planejamento com as distintas condições de hidrólise para determinação das concentrações de flavonoides nas amostras de pólen estudadas. Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando-se o pacote *Statistics for Windows*, versão 6.0 da Statsoft South America (São Caetano do Sul, Brasil). Verificou-se a possibilidade de ajuste de modelos codificados de segunda ordem através da Equação 1.

A análise de variância (ANOVA) foi realizada para cada flavonoide extraído das amostras de pólen, verificando-se a adequação dos modelos para obtenção e análise das superfícies de resposta:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_{12} + b_{22}x_{22} + b_{12}x_1x_2 \quad \text{Equação (1)}$$

Onde b_0 , b_1 , b_2 , b_{11} , b_{22} e b_{12} representam os coeficientes de regressão, x_1 a concentração molar de HCl e x_2 o tempo de hidrólise nos valores codificados.

Validação da extração e método cromatográfico

A faixa linear foi verificada para flavonóis e flavonas estudados. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados como a mínima concentração correspondente a $3,3 \times (SD/S)$ e $10 \times (SD/S)$, respectivamente, sendo SD o desvio-padrão do branco e S a inclinação da curva analítica³⁸. Para comprovação prática dos valores calculados, estes foram injetados nas condições estabelecidas para a análise por CLAE.

Para verificar precisão do método, valores de sete repetições foram obtidos para uma amostra de pólen apícola contendo cinco dos seis flavonoides estudados. Esse experimento foi realizado na condição ótima de hidrólise: 1,0 M de HCl, durante 30 minutos.

Para verificar a exatidão do método, foram realizados testes de recuperação (em triplicata) com adição de padrão em níveis de concentração de 250, 350, 470, 280, 360 e 260 $\mu\text{g/g}$ de pólen para os flavonoides M, L, Q, I, K e A, respectivamente. Esses níveis correspondem a respectivamente 14%, 34%, 46%, 46% e 30% dos valores médios dos flavonoides M, L, Q, I e K, obtidos nas amostras de pólen estudadas. Para as amostras fortificadas, o padrão foi adicionado à amostra homogeneizada, que foi misturada e deixada por 20 minutos para acomodação do padrão na matriz. As amostras sem ou com adição de padrões foram, então, submetidas à extração/hidrólise otimizadas neste estudo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Condições cromatográficas

Com a fase móvel água e metanol, acidificados com 0,3% de ácido fórmico, não foi possível uma boa separação entre os picos de isoramnetina e apigenina. Conseguiu-se uma boa separação dos compostos em estudo adicionando-se o solvente THF à fase móvel. Para facilitar e sistematizar a otimização da separação cromatográfica, inicialmente a força cromatográfica ótima para a separação dos compostos foi selecionada empiricamente, por tentativa e erro até a obtenção de uma fase móvel de força cromatográfica elevada, de modo que todos os componentes eluíram com tempo de retenção semelhante ao de um composto não retido (Figura 1-A). A composição dessa fase móvel foi 50:33:17 (v/v) de metanol:THF:água, acidificados com 0,3% de ácido fórmico. A seguir, sucessivamente, a composição da fase móvel foi modificada de modo a diminuir a força cromatográfica até conseguir a separação dos compostos

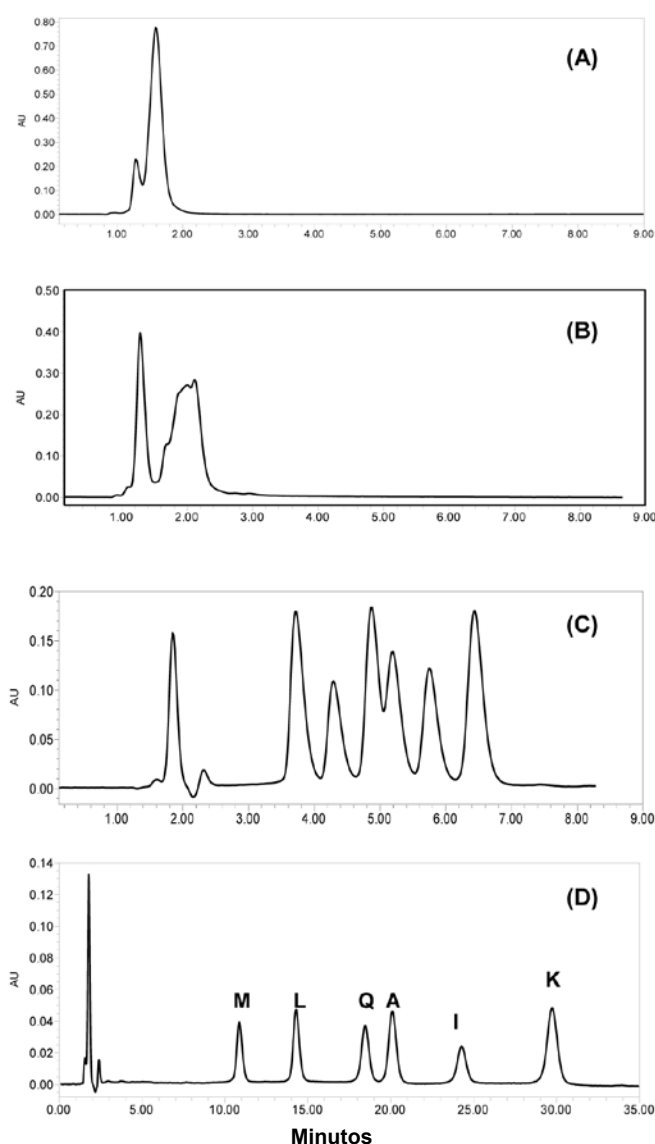


Figura 1. Método empírico para obtenção de fase móvel com a força cromatográfica ótima para separação de flavonoides agliconas (M: miricetina, L: luteolina, Q: quercetina, A: apigenina, I: isoramnetina e K: kanferol): (A) Fase móvel (FM): Metanol:THF:H₂O 50:33:17, (B) FM: Metanol:THF:H₂O 42:28:30, (C): FM: Metanol:THF:H₂O 35:23:42; (D) FM: Metanol:THF:H₂O 26:17:57. Coluna: Symmetry C18 (2,1 x 150 mm, 3,5 μm). FMs acidificadas com 0,3% de ácido fórmico), Condições cromatográficas: vazão 0,2 mL min⁻¹; volume de injeção: 5 μL ; detecção: UV, 370 nm

no intervalo de tempo desejado, sempre com corrida isocrática (Figuras 1-B, C e D). O fluxo da fase móvel foi de 0,2 mL/min e o volume de injeção foi de 5 μL . O cromatograma típico dos flavonoides agliconas obtidos (fase móvel: Metanol:THF:H₂O 26:17:57) (Figura 1-D) mostra que os flavonoides M, L, Q, A, I e K eluíram nesta

sequência nos tempos de retenção de 10,9 minutos, 14,3 minutos, 18,5 minutos, 20,1 minutos, 24,3 minutos e 29,8 minutos, respectivamente.

Análise dos resultados dos DCCRs utilizados na otimização da extração/hidrólise das agliconas

Observa-se na Tabela 1 que as três amostras revelaram diferenças qualitativas e quantitativas nos flavonoides estudados. A amostra do estado da Bahia apresentou os flavonóis quercetina, isoramnetina e miricetina. A amostra do estado de São Paulo teve os flavonóis quercetina, isoramnetina e kanferol, enquanto que a amostra do estado de Santa Catarina continha os flavonóis quercetina, miricetina e kanferol, além da flavona luteolina. Apigenina não foi encontrada em nenhuma das amostras investigadas. Analisando as respostas de cada flavonoide, há uma grande amplitude de concentrações nas amostras estudadas, o que dificulta o estabelecimento de uma condição única (de concentração de ácido e de tempo de hidrólise) que otimize a extração e hidrólise simultânea de todos os flavonoides e garanta respostas máximas. A concentração de quercetina, por exemplo, variou de menor que LD a $60,6 \pm 3,9 \mu\text{g/g}$, de 422 a 2640

$\pm 50 \mu\text{g/g}$ e de 36 a $2715 \pm 30 \mu\text{g/g}$, respectivamente, nas amostras dos estados da BA, SP e SC.

Na etapa de hidrólise e extração, os açúcares devem ser liberados para identificação e quantificação das agliconas. Para tanto, as condições de hidrólise devem proporcionar a ruptura completa das ligações glicosídicas, mas ao mesmo tempo ser suficientemente brandas de modo a evitar a degradação das agliconas. Altas concentrações de ácido durante um longo período podem promover uma hidrólise completa, porém podem acelerar degradação. Baixas concentrações de ácido por curto período de tempo, por outro lado, podem resultar na hidrólise incompleta. Deste modo, as melhores condições devem ser alcançadas quando se utiliza uma baixa concentração de ácido durante maior período de tempo ou um tempo de hidrólise mais curto com concentração mais elevada de ácido. Essas condições dependem dos tipos de glicosídeos presentes na amostra e do tipo de matriz analisada^{27,28}.

Tais considerações foram confirmadas no presente trabalho, como se observa na Figura 2 contendo os cromatogramas obtidos da amostra de pólen do estado da Bahia submetida a diferentes condições de extração/

Tabela 1. Condições experimentais do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) e as respostas para os flavonoides analisados nas amostras de pólen apícola

Ensaio	Valores codificados		Valores reais		Concentração de flavonoides ($\mu\text{g/g}$)									
	x_1	x_2	X_1	X_2	Pólen BA			Pólen SP			Pólen SC			
					Q	I	M	Q	I	K	M	L	Q	K
			(M)	(min.)										
1	-1	-1	0,3	9	nd	45,50	3796,17	996,42	nd	nd	602,82	392,18	235,75	nd
2	-1	+1	0,3	51	54,40	1408,13	2983,41	2468,98	88,51	159,39	546,39	408,48	575,71	81,36
3	+1	-1	1,7	9	27,02	608,66	3733,97	2442,32	55,77	91,17	1025,19	577,37	2297,28	910,13
4	+1	+1	1,7	51	22,34	921,99	1891,86	1610,50	103,26	124,13	447,21	560,88	1627,68	737,91
5	-1,41	0	0	30	nd	<LD	3332,08	481,20	nd	nd	734,05	504,25	36,03	nd
6	+1,41	0	2,0	30	48,48	1157,13	871,28	758,81	57,67	84,12	493,24	551,02	1558,80	693,07
7	0	-1,41	1,0	0	nd	nd	2952,10	422,16	nd	nd	675,32	527,97	185,49	nd
8	0	+1,41	1,0	60	62,11	1567,88	3074,06	2483,47	156,33	216,49	876,61	639,92	2431,68	1112,81
9	0	0	1,0	30	65,16	1378,13	3366,07	2697,17	128,91	245,42	971,60	612,85	2695,66	1210,95
10	0	0	1,0	30	59,69	1404,21	3373,10	2661,01	136,86	232,12	943,06	627,94	2689,27	1245,52
11	0	0	1,0	30	61,73	1405,53	3434,53	2622,65	128,41	248,57	977,83	622,38	2721,35	1234,82
12	0	0	1,0	30	55,66	1325,22	2972,44	2580,94	141,28	218,63	1012,56	605,24	2754,21	1208,98
Média \pm Desvio-padrão das condições dos pontos centrais					60,56	1378,27	3286,54	2640,44	133,87	236,19	976,26	617,10	2715,12	1225,07
					$\pm 3,97$	$\pm 37,55$	$\pm 211,64$	$\pm 49,99$	$\pm 6,28$	$\pm 13,70$	$\pm 28,54$	$\pm 10,07$	$\pm 29,52$	$\pm 18,00$

BA: Bahia; SC: Santa Catarina; SP: São Paulo. X_1 = concentração molar de HCl, X_2 = tempo de hidrólise (minutos), M = miricetina, L = luteolina, Q = quercetina, I = isoramnetina, K = kanferol, nd = não detectado (>LD); LD = Limite de Detecção: miricetina = 1,04; luteolina = 0,88; quercetina = 0,89; isoramnetina = 0,82; kanferol = 1,19 $\mu\text{g/mL}$, LQ = Limite de Quantificação: miricetina = 3,70; luteolina = 3,16; quercetina = 3,19; isoramnetina = 2,95; kanferol = 4,25 $\mu\text{g/mL}$

Tabela 2. Equações que representam os teores de agliconas (Y) em função da concentração molar de HCl (x_1) e tempo de hidrólise (x_2) presentes nas amostras de pólen analisadas

Origem	EQUAÇÃO Y = (μg Flavonoide aglicona / g pólen)		R^2	F_{CAL}	F_{TAB}
	(Valores de x_1 e x_2 codificados)				
BA	Q	$Y = 60,56 + 14,79 x_1 - 18,59 x_1^2 + 10,35 x_2 - 15,18 x_2^2 - 14,7 x_1 x_2$	0,85	6,70	3,11
	I	$Y = 1378,27 + 414,05 x_1 - 383,65 x_1^2 + 286,79 x_2 - 280,96 x_2^2 - 262,32 x_1 x_2$	0,86	7,22	3,11
	M	$Y = 3285,95 - 766,87 x_1 - 456,28 x_1^2$	0,81	19,35	3,01
SP	Q	$Y = 2640,44 - 799,43 x_1^2 + 437,82 x_2 - 383,03 x_2^2 - 576,10 x_1 x_2$	0,76	5,67	2,96
	I	$Y = 133,87 + 27,20 x_1 - 50,42 x_1^2 + 36,45 x_2 - 25,76 x_2^2$	0,90	15,50	2,96
	K	$Y = 236,19 + 38,91 x_1 - 92,43 x_1^2 + 45,26 x_2 - 59,34 x_2^2$	0,87	12,01	2,96
SC	M	$Y = 976,26 - 121,87 x_1 - 191,16 x_1^2 + 75,98 x_2 - 109,99 x_2^2 - 130,39 x_1 x_2$	0,90	10,65	3,11
	L	$Y = 617,10 - 62,5 x_1^2 + 61,99 x_2 - 34,34 x_2^2$	0,79	9,95	2,92
	Q	$Y = 2715,12 + 227,99 x_1 - 926,08 x_1^2 + 786,26 x_2 - 670,49 x_2^2$	0,92	20,45	2,96
	K	$Y = 1225,07 + 111,16 x_1 - 444,05 x_1^2 + 392,55 x_2 - 339,11 x_2^2$	0,95	32,70	2,96

BA: Bahia; SC: Santa Catarina; SP: São Paulo; R^2 =coeficiente de determinação; $F_{\text{CAL}} = (QM_{\text{Regressão}}/QM_{\text{Resíduo}})$; M = miricetina, L = luteolina, Q = quercetina, I = isoramnetina, K = kanferol, α = nível de significância (15%); VR = graus de liberdade da regressão; vr = graus de liberdade dos resíduos

hidrólise: (A) sem HCl por 30 minutos, onde pode-se observar a presença de glicosídeos, indicando a ausência de hidrólise dos mesmos a agliconas; (B) com HCl 1,0M por 30 minutos, condição ótima, obtida a partir das superfícies de resposta, onde pode-se verificar que os glicosídeos foram hidrolisados; e (C) com HCl 1,7M por 51 minutos, condição na qual os compostos de interesse já sofreram degradação, apresentando teores menores ou inexistentes. Para algumas amostras e condições de hidrólise observou-se a presença de picos de degradação.

A Tabela 2 apresenta as equações codificadas com os parâmetros estatisticamente significativos, os coeficientes de determinação (R^2), F calculados e F tabelados obtidos para as agliconas extraídas de amostras de pólen dos estados da Bahia, São Paulo e Santa Catarina. Para elaboração dos modelos, em função das variáveis estudadas, adotou-se 15% de significância na avaliação estatística dos coeficientes de regressão obtidos, devido à variabilidade da amostra em estudo.

Pelos coeficientes de determinação (R^2) e F calculados obtidos, observa-se que os resultados experimentais tiveram um bom ajuste aos modelos propostos (R^2 entre 0,85 e 0,95) com exceção da extração/hidrólise de quercetina em pólen do estado de São Paulo, luteolina em pólen do estado de Santa Catarina e miricetina em pólen do estado de São Paulo com R^2 de 0,76; 0,79 e 0,81. Estes valores mais baixos podem ser considerados estatisticamente aceitáveis, tendo-se em vista a heterogeneidade das amostras de pólen. Assim, as análises

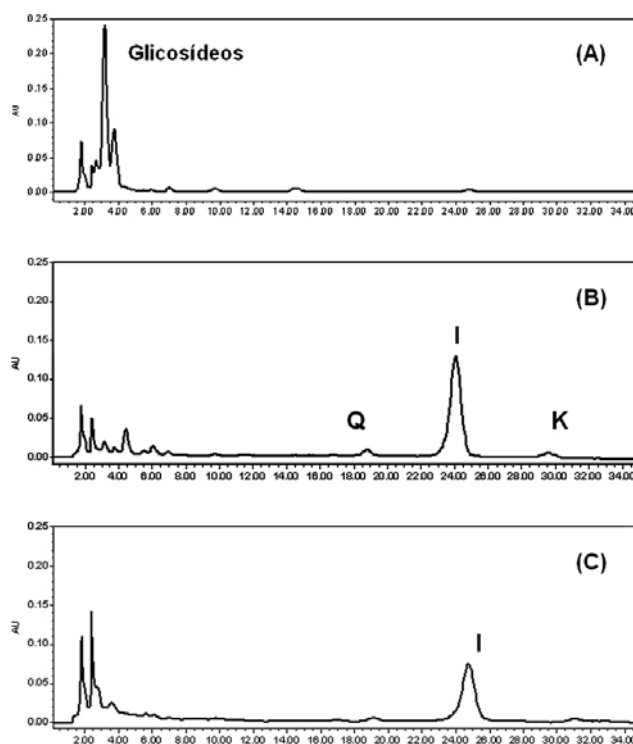


Figura 2. Cromatogramas dos flavonoides agliconas Q = quercetina, I = isoramnetina, K = kanferol dos extratos hidrolisados de pólen do estado da Bahia, obtidos após diferentes condições de hidrólise (A) sem HCl por 30 minutos, (B) com HCl 1,0M por 30 minutos e (C) com HCl 1,7M por 51 minutos. Coluna: Symmetry C18 (2,1 x 150 mm, 3,5 μm), fase móvel Metanol:THF:H₂O 26:17:57 (acidificados com 0,3% de ácido fórmico) em corrida isocrática. Condições cromatográficas: vazão 0,2 mL min⁻¹; volume de injeção: 5 μL ; detecção: UV, 370 nm

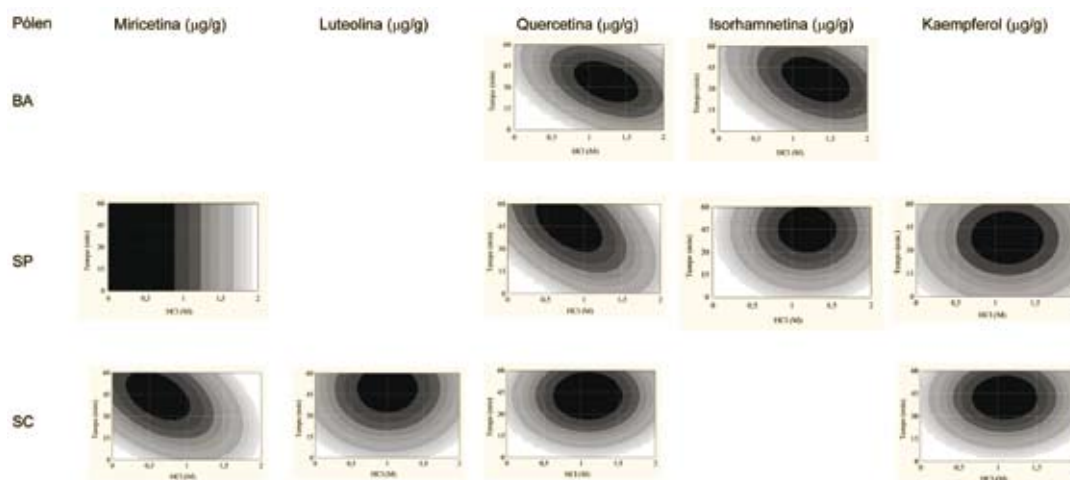


Figura 3. Curvas de contorno para a concentração das agliconas miricetina, luteolína, quercetina, isorhamnetina e kanferol como uma função do tempo (minutos) e da concentração de ácido clorídrico (M) em amostras de pólen apícola provenientes dos estados: Bahia (BA), São Paulo (SP) e Santa Catarina (SC)

de superfície de resposta foram realizadas e apresentadas pelas curvas de contorno da Figura 3 para se determinar as faixas da concentração molar de HCl e tempos de hidrólise e obter a indicação das condições ideais de hidrólise.

A condição que maximiza a quantificação de todas as agliconas presentes nas amostras estudadas simultaneamente é 1,0M de HCl por 30 minutos, que corresponde aos valores definidos no ponto central do planejamento experimental, condição esta realizada em quadruplicata para cada amostra de pólen. Assim, as concentrações máximas de flavonoides em $\mu\text{g/g}$ obtidas para as três amostras analisadas estão apresentadas na Tabela 1, com os valores médios e seus respectivos erros-padrão.

Nos estudos qualitativos, visando ao isolamento e à identificação dos flavonoides presentes em pólen apícola, foram usadas distintas condições de tempo, concentração de ácido e temperatura para hidrólise dos mesmos. Tomás-Barberán et al.⁹ e Tomás-Lorente et al.¹⁵ procederam com a hidrólise em HCl 2M a 85 °C, durante 45 min, enquanto Dauguet et al.¹⁴ utilizaram H_2SO_4 2M a 100 °C, durante 30 min. Outros autores empregaram metanol:HCl 3M 1:1, a 100 °C durante 10 min¹³ ou 15 min.¹¹ Nestes trabalhos a hidrólise foi feita como parte do método de identificação dos flavonoides e sem investigação da melhor condição do binômio tempo/concentração de ácido para maximizar a hidrólise dos glicosídeos. Os resultados obtidos no presente estudo evidenciam a necessidade de proceder com tal análise para

obter valores confiáveis destes compostos em trabalhos quantitativos, confirmando a observação dos autores que avaliaram o teor de flavonoides em outras matrizes^{26,27}.

Avaliação da metodologia analítica

As curvas-padrão passaram pela origem e apresentaram boa linearidade nas faixas de concentração estabelecidas (M: 5,3 – 159 $\mu\text{g/mL}$; L: 0,9 – 141 $\mu\text{g/mL}$; Q: 1,1 – 106 $\mu\text{g/mL}$; A: 4,7 – 94 $\mu\text{g/mL}$; I: 0,3 – 75 $\mu\text{g/mL}$; K: 0,4 – 38 $\mu\text{g/mL}$). Os coeficientes de correlação obtidos foram superiores a 0,99 (M = 0,9962; L = 0,9996; Q = 0,9985; A = 0,9991; I = 0,9992; K = 0,9878) e os coeficientes de variação entre as triplicatas foram inferiores a 2,4 (M = 1,4; L = 1,1; Q = 1,0; A = 2,4; I = 2,4; K = 2,4). Os limites de detecção obtidos para M, L, Q, A, I e K foram de 1,04; 0,88; 0,89; 1,64; 0,82 e 1,19 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. A precisão (repetitividade) do método foi demonstrada pelos coeficientes de variação de sete replicatas de uma amostra de pólen do estado de São Paulo (M: 2,33%, L: 1,77%; Q: 1,97%; I: 1,45%; K: 1,36%). As quantidades adicionadas de flavonoides para o estudo de recuperação foram: M = 246,95 $\mu\text{g/g}$, L = 350,39 $\mu\text{g/g}$, Q = 468,74 $\mu\text{g/g}$; A = 262,79 $\mu\text{g/g}$; I = 279,56 $\mu\text{g/g}$ e K = 363,43 $\mu\text{g/g}$. As taxas de recuperação para os diferentes flavonoides presentes em uma amostra de pólen do estado da Bahia foram: M: 99% (CV = 4,7%), L: 98% (CV = 0,8%), Q: 95% (CV = 3,5%), A: 97% (CV = 0,4%), I: 90% (CV = 5%), K: 90% (CV = 3,3%). Essas características comprovam o bom desempenho do método analítico.

CONCLUSÃO

A análise por superfície de resposta foi imprescindível na otimização do método de extração e hidrólise dos flavonóis e flavonas, sendo possível estabelecer as condições ótimas de concentração molar de HCl e tempo de hidrólise para amostras de pólen apícola (1,0 M durante 30 minutos). A melhor condição cromatográfica para a determinação de flavonóis e flavonas nas amostras de pólen estudadas foi obtida com o uso de coluna de fase reversa C18 Symmetry C18 (2,1 x 150 mm, 3,5 µm) e fase móvel de metanol:tetrahidrofurano:água (26:57:17) acidificados com 0,3% de ácido fórmico em corrida isocrática. As condições estabelecidas para a determinação de flavonóis e flavonas em pólen apícola permitiram uma quantificação rápida e confiável dos flavonoides miricetina, luteolina, quercetina, isoramnetina e kanferol das amostras estudadas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Centro Universitário Adventista de São Paulo (UNASP) pelo apoio logístico.

REFERÊNCIAS

- Margaoan R, Marghitas LAI, Dezmirean D, Mihai CM, Bobis O. Bee collected pollen – General aspects and chemical composition. *Bull UASVM Animal Sci Biotechnol*. 2010;67:254-9.
- Serra-Bonvehí J, Soliva-Torrentó M, Centelles-Lorente E. Evaluation of polyphenolic and flavonoid compounds in honeybee-collected pollen produced in Spain. *J Agric Food Chem*. 2001;49:1848-53.
- Leja M, Mareczek A, Wyzgolik G, Klepacz-Baniak J, Czekonska K. Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. *Food Chem*. 2007;100: 237-40.
- Carpes ST, Prado A, Moreno IAM, Mourão GB, Alencar SM, Masson ML. Avaliação do potencial antioxidante do pólen apícola produzido na região sul do Brasil. *Quím Nova*. 2008;31:1660-4.
- LeBlanc BW, Davis OK, Boue S, DeLuca A, Deeby T. Antioxidant activity of Sonoran Desert bee pollen. *Food Chem*. 2009;115:1299-305.
- Aliyazicioglu Y, Deger O, Ovali E, Barlak Y, Hosver I, Tekelioglu Y et al. Effects of Turkish pollen and propolis extracts on respiratory Bursa for K-562 cell lines. *Int Immunopharmacol*. 2005;5:1652-7.
- Saric A, Balog T, Sobocanec S, Kusic B, Sverko V, Rusak G et al. Antioxidant effects of flavonoids from Croatian *Cystus incannus* L. rich bee pollen. *Food Chem Toxicol*. 2008;47:547-54.
- Ferreres F, Ortiz A, Silva C, Garcia-Viguera C, Tomás-Barberán FA, Tomás-Lorente F. Flavonoids of “La Alcarria” honey – A study of their botanical origin. *Z Lebensm Unters Forsch*. 1992;194:139-43.
- Tomás-Barberán FA, Tomás-Lorente F, Ferreres F, Garcia-Viguera C. Flavonoids as biochemical markers of the plant origin of bee pollen. *J Sci Food Agric*. 1989;47:337-40.
- Campos M, Markham KR, Mitchell KA, Cunha APD. An approach to the characterization of bee pollens via their flavonoid/phenolic profiles. *Phytochem Anal*. 1997;8:181-85.
- Markham KR, Campos M. 7- and 8-O-methylherbacetin-3-O-sophorosides from bee pollens and some structure/activity observations. *Phytochem*. 1996;43:763-7.
- Ferreres F, Juan T, Pérez-Arquillué C, Herrera-Martache A, Garcia-Viguera C, Tomás-Barberán FA. Evaluation of pollen as a source of kanferol in rosemary honey. *J Sci Food Agric*. 1998;77:506-10.
- Markham KR, Mitchell KA, Campos M. An unusually lipophilic flavonol glycoside from *Ranunculus sardous* pollen. *Phytochem*. 1997;45:203-4.
- Dauguet JC, Bert M, Dolley J, Bekaert A, Lewin G. 8-Methoxykanferol 3-neohesperidoside and other flavonoids from bee pollen of *Crataegus monogyna*. *Phytochem*. 1993;33:1503-5.
- Tomás-Lorente F, Garcia-Grau MM, Nieto JL, Tomás-Barberán FA. Flavonoids from *Cistus Ladanifer* bee pollen. *Phytochem*. 1992;31:2027-9.
- Arráez-Román D, Zurek G, Bäßmann C, Almaraz-Abarca N, Quirantes R, Segura-Carretero A, et al. Identification of phenolic compounds from pollen extracts using capillary electrophoresis-electrospray time-of-flight mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 2007;389:1909-7.
- Freire KRL, Silva TMS, Santos FAR, Dórea MC, Câmara CA. Estudo químico de pólen apícola (*Apis mellifera*) do nordeste brasileiro. In: Anais da 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (CD-Rom). Águas de Lindóia: Sociedade Brasileira de Química; 2007.
- Guo J, Zhang P, Zhang Z. Studies on chemical constituents from bee-collected rape pollen. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2009;34:1235-7.
- Ferreres F, Pereira DM, Valentão P, Andrade PB. First report of non-coloured flavonoids in *Echium plantagineum* bee pollen: differentiation of isomers by liquid chromatography/ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2010;24:801-6.
- Campos M, Sabatier S, Amiot MJ, Aubert S. Characterization of flavonoids in three hive products: bee pollen, propolis, and honey. *Planta Med*. 1990;56:580-1.
- Marghitas LA, Oltica GS, Dezmirean DS, Bobis O, Popescu O, Bogdanov S, Campos MG. *In vitro* antioxidant capacity of honeybee-collected pollen of selected floral origin harvested from Romania. *Food Chem*. 2009;115:878-3.
- Carpes ST, Begnini R, Alencar SM, Masson ML. Study of preparations of bee pollen extracts, antioxidant and antibacterial activity. *Cienc Agrotec*. 2007;31(6):1818-25.
- Herrmann K. On the occurrence of flavonols and flavone glycosides in vegetables. *Z Lebensm Unters Forsch* 1988;186:1-5.
- Merken HM, Beecher GR. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. *J Agric Food Chem*. 2000;48:577-99.
- Matsubara S, Rodriguez-Amaya DB. Conteúdo de miricetina, quercetina e kanferol em chás comercializados no Brasil. *Ciênc Tecnol Alim*. 2006;26:380-5.

26. Huber LS, Rodriguez-Amaya DB, Rodrigues MI. Otimização e validação de metodologia analítica para determinação de flavonóis e flavonas por CLAE em hortaliças. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2007;66:143-52.
27. Hoffmann-Ribani R, Rodriguez-Amaya DB. Otimização de método para determinação de flavonóis e flavonas em frutas por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando delineamento estatístico e análise de superfície de resposta. *Quím Nova*. 2008;31:1378-84.
28. Huber LS, Hoffmann-Ribani R, Rodriguez-Amaya DB. Quantitative variation in Brazilian sources of flavonols and flavones. *Food Chem*. 2009;113:1278-82.
29. Hertog MGL, Hollman PCH, Venema DP. Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. *J Agric Food Chem*. 1992;40:1591-8.
30. Crozier A, Jensen E, Lean MEJ, McDonald MS. Quantitative analysis of flavonoids by reversed-phase high performance liquid chromatography. *J Chromatog A*. 1997;761:315-21.
31. Nuutila AM, Kammiorvirta K, Oksman-Caldentey K-M. Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis. *Food Chem*. 2002;76:519-25.
32. Haaland PO. *Experimental design in biotechnology*. New York: Marcel Dekker; 1989.
33. Box GEP, Hunter WG, Hunter JS. *Statistics for experimenters: an introduction to design, data analysis and model building*. New York: Wiley; 1978.
34. Barreto LMRC, Funari SRC, Orsi RO. Pólen apícola: perfil da produção no Brasil. *In: Anais do I Congresso de Apicultura del Mercosur*. Punta del Este; 2005. Disponível em: [<http://www.culturaapicola.com.ar>].
35. Tonin FG. *Análise de flavonoides por cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar – otimização de separação e aplicações tecnológicas* [tese de doutorado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2006.
36. Häkkinen S, Kärenlampi S, Heinonen M, Mykkänen HM, Törrönen AR. HPLC method for screening of flavonoids and phenolic acids in berries. *J Sci Food Agric*. 1998;77:543-51.
37. Rodrigues MI, Iemma AF. *Planejamento de experimentos e otimização de processos*. 2ª edição. Campinas: Cárita Editora Espírita; 2009.
38. Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSE, Melo LFC. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim Nova*. 2004;27:771-80.

Análise físico-química de méis de abelhas africanizada e nativa

Physical-chemical analysis of honeys from africanized and native bees

RIALA6/1354

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, Campina Grande/PB, Brasil. CEP 58109-970. Tel.: 83 3310-1055. E-mail: emanuelnetoliveira@ig.com.br.

Recebido: 27.11.2010 – Aceito para publicação: 13.05.2011

RESUMO

O estudo relata as análises comparativas realizadas entre a composição físico-química de amostras de mel de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) e amostras de mel de abelhas sem ferrão (*Scaptotrigona bipunctata* H.). As amostras de mel de *S. bipunctata* foram colhidas em Mauriti-CE e as de *A. mellifera* foram coletadas em Limoeiro do Norte-CE. Os parâmetros analisados foram: hidroximetilfurfural, sólidos insolúveis em água, açúcares redutores, sacarose aparente, cinzas, acidez livre, umidade, Brix e pH. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a comparação de médias foi feita pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade. As amostras analisadas apresentaram diferença significativa em alguns parâmetros avaliados, destacando-se a umidade, açúcares redutores e hidroximetilfurfural. O pH foi o único parâmetro que não apresentou diferença estatisticamente significativa. Este estudo ressalta a necessidade de efetuar a implementação de uma legislação específica que trate da qualidade dos méis de abelhas nativas, uma vez que diferenças significativas foram verificadas em alguns parâmetros físico-químicos entre as amostras analisadas.

Palavras-chave. *Apis mellifera* L., *Scaptotrigona bipunctata* H., controle de qualidade.

ABSTRACT

This study aimed at performing the comparative analysis on the physical-chemical composition between the honey from Africanized bees (*Apis mellifera* L.) and the honey from stingless bees (*Scaptotrigona bipunctata* H.). The *S. bipunctata* honeys were collected in Mauriti-CE and the *A. mellifera* honeys were from Limoeiro do Norte-CE. The parameters analyzed were: hydroxymethylfurfural, solid insoluble in water, reducing sugars, apparent sucrose, ash, acidity, moisture, pH and Brix. The results were examined by analysis of variance (ANOVA), and the comparison of the means was done by Tukey test at 5% probability. The honeys samples showed significant differences in some parameters, especially on moisture, reducing sugars and hydroxymethylfurfural. The pH was the unique parameter which showed no statistically significant difference. This study evidenced the need in implementing a specific legislation to deal with the quality of the honey from native bees, since significant differences were observed in some physiochemical parameters in the analyzed samples.

Keywords. *Apis mellifera* L., *Scaptotrigona bipunctata* H., quality control.

INTRODUÇÃO

Segundo Rossi et al.¹, o mel é apreciado por seu sabor característico e pelo seu considerável valor nutritivo. A sua matéria-prima, monossacarídeos de moléculas simples, é o néctar das flores ou exsudatos sacarídeos das partes vivas das plantas, que é coletado pelas abelhas melíferas, desidratado e armazenado em alvéolos nas suas colmeias.

A composição do mel depende, basicamente, da composição do néctar da espécie vegetal produtora e da espécie de abelha que o produz, conferindo-lhe características específicas enquanto que as condições edafoclimáticas e o manejo do apicultor têm menor influência nesta composição².

Embora produza mel em menor quantidade, as abelhas sem ferrão (nativa) fornecem um produto diferenciado do mel de *Apis mellifera*, possuindo consumidores distintos, dispostos a pagar altos preços pelo produto³. Segundo Souza et al.⁴, o mel das abelhas sem ferrão (nativa) é um produto que tem apresentado uma demanda crescente de mercado, obtendo preços mais elevados que o das abelhas do gênero *Apis* em diferentes regiões do Brasil.

De maneira geral, o mel das espécies nativas tem como principal característica a diferenciação nos teores da sua composição, destacando-se a umidade, que o torna menos denso que o mel das abelhas africanizadas (*A. mellifera*), exigindo maiores cuidados quanto a sua conservação^{5,6}.

Diversos trabalhos vêm sendo desenvolvidos no tocante à investigação das características físico-químicas de méis de abelhas africanizada e nativa: Souza et al.⁴ estudaram as características físico-químicas de amostras de mel de *Melipona asilvai* provenientes da região semiárida do Estado da Bahia; Rodrigues et al.⁷ analisaram físico-quimicamente méis das abelhas *Apis mellifera* e *Melipona scutellaris* produzidos em duas regiões no Estado da Paraíba; Alves et al.⁸ estudaram as características físico-químicas de amostras de mel de *Melipona mandacaia* provenientes do município de São Gabriel, região semiárida do Estado da Bahia; Welke et al.⁹ caracterizaram físico-quimicamente méis de *Apis mellifera* L. da região noroeste do Estado do Rio Grande do Sul; Moreti et al.¹⁰ estudaram as características físico-químicas de amostras de méis de *Apis mellifera* L. do Estado do Ceará; Silva et al.¹¹ analisaram a composição físico-química de amostras de mel de abelhas zamboque

(*Frieseomelitta varia*) da região do Seridó do Rio Grande do Norte; Anacleto et al.¹² pesquisaram a composição de amostras de mel de abelha Jataí (*Tetragonisca angustula*) do município de Piracicaba/SP; Freitas et al.¹³ pesquisaram parâmetros físico-químicos do mel de abelha sem ferrão (*Melipona subnitida*) do município de Limoeiro do Norte/CE, após tratamento térmico; Abadio Finco et al.¹⁴ estudaram as propriedades físicas e químicas do mel de *Apis mellifera* da região sul do Estado do Tocantins.

Existe no Brasil uma legislação específica para mel, a qual estabelece parâmetros de controle de qualidade para o produto, com indicação das análises e métodos a serem empregados¹⁵, mas essa regulamentação, baseada em legislações europeias, só atende às características do mel de *A. mellifera* L., não contemplando o mel das abelhas sem ferrão, nativas do país, como os da *Scaptotrigona bipunctata* H., que apresentam diferenças em alguns parâmetros físico-químicos.

O mel de *A. mellifera* e os seus produtos são amplamente comercializados em todo o mundo. A composição do mel dessa espécie já é conhecida, assim como os fatores que podem afetar a sua qualidade. O mesmo não ocorre com o mel de abelhas sem ferrão. Como são quase uma exclusividade dos trópicos, o mel dessas abelhas demorou a ser conhecido pelo restante do mundo. Por essa razão, o estudo teve por objetivo realizar análises comparativas entre a composição físico-química de méis de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) e méis de abelhas sem ferrão (*Scaptotrigona bipunctata* H.), contribuindo como fonte de dados no possível desenvolvimento de uma legislação específica para o mel desse tipo de abelha.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de realização dos experimentos

A pesquisa foi realizada nas cidades de Mauriti e Limoeiro do Norte-CE no primeiro semestre de 2007. O município de Mauriti está localizado na região do Cariri cearense, distante 491 km de Fortaleza pela BR-116. Faz divisa com os municípios de Barro, Milagres e Brejo Santo e com os estados da Paraíba e Pernambuco. Apresenta coordenadas de 7°23'S e 38°46'O. O município de Limoeiro do Norte está localizado na região do Vale do Jaguaribe, distante 205 km de Fortaleza. Faz divisa com os municípios de Quixeré, Russas, Morada Nova, São João do Jaguaribe e Alto Santo e com o Estado do Rio

Grande do Norte. Apresenta como vias de acesso a CE-377 e a BR-116 e coordenadas de 5°09'S e 38°06'O.

Coleta das amostras

Os méis de *Scaptotrigona bipunctata* foram coletados em Mauriti/CE, diretamente dos potes de alimento presentes no interior das colônias, por meio de seringas, para que não ocorresse prejuízo às abelhas e aos próprios potes de alimento. As amostras foram acondicionadas em frascos de vidro esterilizados e mantidas sob refrigeração para a posterior realização das análises físico-químicas.

Os méis de *Apis mellifera* utilizados nos ensaios foram coletados em Limoeiro do Norte/CE, de pontos que comercializam produtos apícolas, como lojas de produtos naturais, farmácias e supermercados.

Foram analisadas 16 amostras de méis das duas espécies de abelha, onde 8 amostras correspondiam a méis de *A. mellifera* e 8 amostras correspondiam a méis de *S. bipunctata*.

Os méis de abelha sem ferrão foram conduzidos ao Laboratório de Química de Alimentos da FATEC/Cariri-CE e os méis de abelha africanizada foram direcionados ao Laboratório de Bromatologia da FATEC/Limoeiro do Norte-CE, para análises.

Análises físico-químicas

Os procedimentos analíticos nos méis de abelhas africanizada e nativa foram realizados conforme segue:

Hidroximetilfurfural: A determinação do hidroximetilfurfural utilizada foi a quantidade, na qual, em meio ácido o ácido barbitúrico condensa-se com o HMF formando um composto de coloração vermelha¹⁶.

Sólidos Insolúveis em Água: O teor de sólidos insolúveis em água do mel foi determinado por gravimetria¹⁷.

Açúcares Redutores: Os açúcares redutores foram determinados de acordo com Lanara¹⁶. Esse método, conhecido como Lane e Eynon, baseia-se na redução de volume conhecido de reagente de cobre alcalino (Fehling) a óxido cuproso. O ponto final é indicado pelo azul de metileno que é reduzido à sua forma leuco por um pequeno excesso do açúcar redutor.

Sacarose Aparente: Como os grupos redutores aldeído e cetona não se encontram livres na sacarose, efetuou-se uma hidrólise ácida, tendo como resultado duas

moléculas de açúcares redutores, uma de glicose e uma de frutose, que foram determinadas quantitativamente pelo método Lane e Eynon descrito em Lanara¹⁶.

Cinzas: A quantidade de cinzas nos méis foi determinada através da incineração das amostras em mufla aquecida a 600 °C¹⁷.

Acidez Livre: A metodologia utilizada foi baseada numa titulação simples do mel com solução de NaOH a 0,05 Mol/L até atingir pH de 8,5¹⁶.

Umidade: A umidade do mel foi determinada de acordo com a metodologia da AOAC¹⁸. O princípio deste método consiste na determinação do índice de refração do mel a 20 °C, que é convertido para umidade através da tabela de referência de Chataway.

Brix: Foi determinado por leitura direta das amostras em refratômetro de bancada do tipo Abbe.

pH: Foi determinado segundo o método eletrométrico¹⁹.

Análise estatística

O delineamento experimental foi o de blocos inteiramente casualizados com dezesseis tratamentos e três repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a comparação de médias foi feita pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pode-se observar na Tabela 1 os valores médios dos ensaios físico-químicos nos méis de *A. mellifera* e *S. bipunctata*, originários dos municípios de Limoeiro do Norte e Mauriti/CE. Por falta de uma legislação específica, os méis de abelha nativa foram comparados com o especificado para os méis de abelha africanizada.

Verifica-se, nos méis de abelha africanizada, teor médio de HMF de 49,93 ± 61,76 mg/Kg, para uma variação de 6,08 a 194,74 mg/Kg. Já os méis de abelha nativa apresentaram HMF médio de 4,85 ± 0,63 mg/Kg, para uma variação de 4,20 a 5,80 mg/Kg. O baixo teor de HMF observado no mel de *S. bipunctata* já era esperado, pois em méis recentemente colhidos a quantidade de HMF é pequena. Neste quesito, o mel de abelha nativa se enquadrou no estabelecido pela Instrução Normativa¹⁵, no entanto 2 amostras de mel de abelha africanizada

Tabela 1. Valores dos parâmetros físico-químicos nos méis de *Apis mellifera* e *Scaptotrigona bipunctata*

AMOSTRA	HMF (mg/Kg)		Sólidos Insolúveis (%)		Açúcares Redutores (%)		Sacarose Aparente (%)		Cinzas (%)		Acidez Livre (mEq/Kg)		Umidade (%)		pH		°Brix	
	Afrc.	Nat.	Afrc.	Nat.	Afrc.	Nat.	Afrc.	Nat.	Afrc.	Nat.	Afrc.	Nat.	Afrc.	Nat.	Afrc.	Nat.	Afrc.	Nat.
01	19,00 ^d	4,20 ^e	0,46 ^{defg}	0,32 ^{efg}	77,90 ^a	61,35 ^e	0,49 ^h	3,24 ^{ef}	0,25 ^d	0,85 ^a	20,23 ^f	39,35 ^{cd}	18,72 ^d	24,50 ^{abc}	3,53 ^a	3,49 ^a	78,80 ^a	-
02	194,75 ^a	5,80 ^e	1,55 ^a	0,24 ^{fg}	69,55 ^{cd}	58,14 ^e	0,77 ^h	5,54 ^a	0,32 ^{cd}	0,88 ^a	118,41 ^a	37,78 ^{cd}	18,48 ^d	24,50 ^{abc}	3,44 ^a	4,53 ^a	79,05 ^a	-
03	69,35 ^b	4,90 ^e	0,77 ^{bc}	0,20 ^g	67,58 ^d	59,95 ^e	3,59 ^{def}	4,96 ^{abcd}	0,45 ^{cd}	0,79 ^{ab}	79,60 ^b	37,96 ^{cd}	19,24 ^{bcd}	25,00 ^a	3,67 ^a	3,60 ^a	78,28 ^a	-
04	19,00 ^d	4,10 ^e	0,67 ^{bcd}	0,27 ^{fg}	70,31 ^{bcd}	61,06 ^e	3,63 ^{cdef}	5,28 ^{ab}	0,26 ^d	0,81 ^a	20,88 ^{ef}	39,00 ^{cd}	18,88 ^d	24,60 ^{ab}	3,41 ^a	3,67 ^a	78,83 ^a	-
05	6,08 ^e	5,20 ^e	0,91 ^b	0,30 ^{efg}	74,13 ^{abc}	60,93 ^e	1,39 ^{gh}	4,12 ^{abcde}	0,56 ^{bc}	0,84 ^a	24,58 ^{ef}	38,50 ^{cd}	20,40 ^{abcd}	24,67 ^{ab}	3,30 ^a	4,23 ^a	77,39 ^a	-
06	37,05 ^c	5,40 ^e	0,49 ^{def}	0,21 ^g	75,75 ^{ab}	59,43 ^e	2,59 ^{fg}	5,08 ^{abc}	0,42 ^{cd}	0,81 ^a	34,76 ^d	38,99 ^{cd}	19,03 ^{cd}	24,92 ^a	3,57 ^a	3,89 ^a	77,58 ^a	-
07	14,68 ^d	5,00 ^e	0,55 ^{cde}	0,31 ^{efg}	68,01 ^{cd}	60,45 ^e	0,99 ^h	3,99 ^{bdef}	0,34 ^{cd}	0,82 ^a	40,87 ^c	37,80 ^{cd}	18,95 ^d	24,78 ^a	3,45 ^a	4,02 ^a	78,91 ^a	-
08	39,56 ^c	4,20 ^e	0,47 ^{defg}	0,29 ^{efg}	72,95 ^{abcd}	58,79 ^e	1,59 ^{gh}	5,00 ^{abcd}	0,29 ^d	0,87 ^a	25,80 ^e	39,20 ^{cd}	18,88 ^d	24,71 ^{ab}	3,65 ^a	4,35 ^a	79,00 ^a	-
MÉDIA	49,93	4,85	0,73	0,27	72,02	60,01	1,88	4,65	0,36	0,83	45,64	38,57	19,07	24,71	3,5	3,97	78,48	-
DP ¹	61,76	0,63	0,37	0,04	3,75	1,15	1,24	0,78	0,11	0,03	35,22	0,65	0,58	0,18	0,13	0,38	0,66	-
CV ² (%)	123,69	12,99	50,68	14,81	5,21	1,92	65,96	16,77	30,55	3,61	77,17	1,68	3,04	0,73	3,71	9,57	0,84	-
DMS ³	4,55		0,27		6,17		1,45		0,24		5,49		5,48		1,63			-
F calculado	3600,38**		52,60**		38,42**		46,25**		35,22**		630,40**		9,22**		1,59 ^{ns}			-

Afrc. (Mel de abelhas africanizadas); Nat. (Mel de abelhas nativas); ¹Desvio padrão; ²Coefficiente de variação; ³Diferença mínima significativa; Médias seguidas da mesma letra, nas colunas (Afrc. e Nat.), não diferem estaticamente a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey; ^{ns} não significativo, * significativo a 5%, ** significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F

apresentaram teor de HMF superior a 60 mg/Kg⁷ (Tabela 1). De acordo com Silva et al.²⁰, o HMF é um parâmetro de avaliação da qualidade do mel, indicativo do processo de deterioração, pois se o HMF aumenta com o tempo de armazenamento isso, então, significa que o mel está se deteriorando. Durante a estocagem do mel em temperaturas altas ocorre o desdobramento da frutose do mel em 1 molécula de hidroximetilfurfural e 3 moléculas de água, podendo ser criada uma camada superficial líquida e escurecida e, assim, inutilizando o mel para o consumo. Moreti et al.¹⁰, estudando méis de *A. mellifera* do Estado do Ceará, encontraram teor de HMF médio de 15,7 mg/Kg, para uma variação de 1,00 a 126,50 mg/kg. Anacleto et al.¹², pesquisando méis de abelha jataí oriundos de Piracicaba/SP, encontraram valor médio de HMF de 9,39 ± 8,60 mg/Kg, para uma variação de variação de 0,75 a 30,58 mg/Kg.

A porcentagem média de sólidos insolúveis em água para o mel de *A. mellifera* (Tabela 1) foi de 0,73 ± 0,37%, para uma variação de 0,46 a 1,55%. O mel de *S. bipunctata* apresentou teor médio de sólidos insolúveis em água de 0,27 ± 0,04%, para uma variação de 0,20 a

0,32% (Tabela 1). Todas as amostras de méis analisadas apresentaram valores superiores ao especificado pela legislação vigente¹⁵, que estabelece 0,10 g de insolúveis/100 g de mel. Santos et al.²¹, avaliando a qualidade de amostras de méis de abelhas *A. mellifera* da região do Vale do Jaguaribe/CE, também obtiveram valores semelhantes para sólidos insolúveis, estando todas as amostras com valores superiores a 0,10%. De acordo com Silva et al.²², os sólidos insolúveis correspondem aos resíduos de cera, patas e asas das abelhas, além de outros elementos inerentes do mel ou do processamento que este sofreu. A realização desta análise permite detectar as impurezas presentes no mel, tornando-se uma importante medida de controle higiênico. Segundo Santos et al.²¹, o teor de sólidos insolúveis em água em méis é considerado no controle de qualidade como um índice de pureza.

No tocante aos açúcares redutores, os méis de *A. mellifera* revelaram teor médio desse constituinte de 72,02 ± 3,75%, para uma variação de 67,58 a 77,90%. Em contrapartida, os méis de *S. bipunctata* apresentaram valor médio de açúcares redutores de 60,01 ± 1,15%, para uma variação de 58,14 a 61,35%.

Observa-se que todas as amostras de méis de abelha nativa apresentaram valores de açúcares redutores acima do recomendado pela legislação¹⁵, que é de no mínimo 65 g/100 g de mel (Tabela 1). Anacleto et al.¹² evidenciaram em méis de abelha jataí teor médio de açúcares redutores de 55,46%, com variação de 48,66 a 57,97%. Abadio Finco et al.¹⁴, estudando méis de *A. mellifera* do Estado do Tocantins, encontraram teor médio de açúcares redutores de $68,94 \pm 3,65\%$, com variação de 62,70 a 76,20%.

Méis de abelha nativa possuem menor teor em açúcares e gosto mais doce, sendo a glicose e a frutose os principais açúcares encontrados, em proporções quase iguais. Normalmente a frutose é predominante, sendo um dos fatores responsáveis pela doçura do mel e sua alta higroscopicidade²³.

Nos méis de abelha africanizada, observa-se variação no teor de sacarose de 0,49 a 3,63%, com teor médio de $1,88 \pm 1,24\%$, e nos méis de abelha nativa foi verificado variação nesse teor de 3,24 a 5,54%, com teor médio de $4,65 \pm 0,78\%$ (Tabela 1). Verifica-se, então, que todas as amostras analisadas encontram-se dentro do limite especificado pela legislação, que é de no máximo 6 g/100 g de mel. Anacleto et al.¹² encontraram em méis de *Tetragonisca angustula* valor médio de sacarose de 0,95%, com variação de 0,13 a 1,87%. Moreti et al.¹⁰ encontraram em méis de *A. mellifera* valor médio de sacarose de 2,9%, para uma variação de 0,20 a 8,20%. De acordo com Azeredo et al.²⁴, o teor elevado desse açúcar significa na maioria das vezes uma colheita prematura do mel, isto é, um produto em que a sacarose ainda não foi totalmente transformada em glicose e frutose pela ação da invertase.

A porcentagem média de cinzas nos méis de *A. mellifera* foi de $0,36 \pm 0,11\%$, para uma variação de 0,25 a 0,56%. No entanto, a média desse constituinte nos méis de *S. bipunctata* foi de $0,83 \pm 0,03\%$, para uma variação de 0,79 a 0,88%. Observa-se que todas as amostras de méis de abelha nativa apresentaram valores de cinzas acima do especificado pela legislação brasileira¹⁵, que estabelece no máximo 0,60 g de cinzas/100 g de mel (Tabela 1). Abadio Finco et al.¹⁴ encontraram em méis de *A. mellifera* teor médio de cinzas de $0,14 \pm 0,09\%$. Souza et al.⁴, em estudo de méis de abelha sem ferrão, verificaram os seguintes teores de sacarose: $0,20 \pm 0,00$ (*Melipona rufiventris*); $0,03 \pm 0,00$ (*Melipona seminigra*); $0,40 \pm 0,00$ (*Melipona compressipes*). Por meio da análise de cinzas, é possível

determinar algumas irregularidades no mel, como, por exemplo, a falta de higiene e a não decantação e/ou filtração no final do processo de retirada do mel pelo apicultor²⁵.

O teor médio de acidez, nos méis de abelha africanizada, foi de $45,64 \pm 35,22$ mEq/kg (variação de 20,23 a 118,14 mEq/kg) e, nos méis de abelha nativa, o teor médio encontrado foi de $38,57 \pm 0,65$ mEq/kg (variação de 37,78 a 39,35 mEq/kg). Esse parâmetro estava de acordo com a legislação em todos os méis de *S. bipunctata*, entretanto duas amostras de *A. mellifera* encontraram-se fora do limite máximo, que é de 50 mEq/kg. Souza et al.⁴ verificaram em méis de *Melipona asilvai* teor médio de acidez de $41,64 \pm 16,75$ mEq/kg (variação de 21,50 a 80,50 mEq/kg). Welke et al.⁹, pesquisando méis de *A. mellifera* (florada 2006), encontraram teor médio de acidez de $39,80 \pm 7,70$ mEq/kg (variação de 26,00 a 49,20 mEq/kg). A origem da acidez do mel deve-se à variação dos ácidos orgânicos causada pelas diferentes fontes de néctar, pela ação da enzima glicose-oxidase que origina o ácido glucônico e, ainda, pela quantidade de minerais presentes no mel.

A porcentagem média de umidade para o mel de *A. mellifera*, observada na Tabela 1, foi de $19,07 \pm 0,58\%$, para uma variação de 18,72 a 20,40%, no entanto o mel de *S. bipunctata* revelou teor médio de umidade de $24,71 \pm 0,18$, para uma variação de 24,50 a 25,00% (Tabela 1). Somente uma amostra de mel de abelha africanizada foi reprovada quanto ao teor de umidade, porém todas as amostras de méis de abelha nativa apresentaram valores acima do referenciado pela legislação¹⁵, que é de no máximo 20 g de água/100 g de mel. O conteúdo de água no mel é uma das características mais importantes e constitui o segundo componente em quantidade, variando conforme o clima, a origem floral e época de colheita. Silva et al.²⁶, caracterizando méis do Piauí, encontraram teor médio de umidade de 19,40%, para um intervalo de variação de 17,60 a 19,70%. Observa-se no mel maduro teor de umidade menor que 18,50%. Se a quantidade de água presente no mel for superior a esse valor, maior será o risco de fermentação. De acordo com Alves et al.⁸, o excesso de água encontrado em méis de abelhas nativas é devido à baixa taxa de desidratação do néctar durante o processo de transformação em mel. Souza et al.⁴, estudando méis de *Melipona asilvai* do semiárido da Bahia, verificaram teor médio de umidade de $29,49 \pm 1,46\%$, para uma variação de 26,80 a 32,00%.

O pH médio nos méis de *A. mellifera* foi de $3,50 \pm 0,13$ (variação de 3,30 a 3,67) e nos méis de *S. bipunctata* foi de $3,97 \pm 0,38$ (variação de 3,49 a 4,53). Moreti et al.¹⁰ caracterizaram méis de *A. mellifera* e encontraram variação de pH de 3,40 a 5,30, com valor médio de 3,60. Alves et al.⁸ estudaram méis de *Melipona mandacaia* e verificaram valor médio de pH de $3,27 \pm 0,09$ com variação entre 3,16 e 3,54. Anacleto et al.¹² verificaram variação no pH de 3,54 a 4,64 (valor médio de 4,10) em méis de *Tetragonisca angustula*. A legislação brasileira não estabelece limites para os valores de pH no mel. Segundo Crane²³, o valor de pH do mel pode ser influenciado pelo pH do néctar, solo ou associação de vegetais para composição do mel.

Os ensaios de °Brix foram realizados apenas nos méis de *A. mellifera*, sendo revelado teor médio de $78,48 \pm 0,66$ °Brix, para uma variação de 77,39 a 79,05 °Brix (Tabela 1). Tais valores estão próximos aos encontrados por Silva et al.²⁶, que verificaram valor médio de 78,70 °Brix, em uma faixa de variação de 76,07 a 80,80 °Brix.

CONCLUSÃO

Os méis de abelhas africanizada e nativa apresentaram diferença significativa em alguns parâmetros analisados, destacando-se a umidade, onde os méis de *S. bipunctata* revelaram maiores teores que os méis de *A. mellifera*.

Os maiores teores de açúcares redutores, sólidos insolúveis, acidez e HMF foram encontrados em méis de *A. mellifera*, em contrapartida os maiores teores de cinzas e sacarose aparente foram verificados nos méis de *S. bipunctata*.

Os resultados do estudo ressaltam a necessidade de implementação de uma legislação específica que trate da qualidade dos méis de abelhas nativas, uma vez que foram verificadas diferenças significativas em alguns parâmetros físico-químicos entre os méis analisados.

REFERÊNCIAS

- Rossi NF, Martinelli LA, Lacerda THM, Camargo PB, Victória RL. Análise da adulteração de méis por açúcares comerciais utilizando-se a composição isotópica de carbono. *Cienc Tecnol Aliment*. 1999; 19(2):199-200.
- White Júnior JW. Honey. *Adv Food Res*. 1978; 22:287-374.
- Carvalho CAL, Azeredo MAA, Beser LB. Mel de abelha sem ferrão: contribuição para a caracterização físico-química. Cruz das Almas: Universidade Federal da Bahia/SEAGRI-BA, 2005.
- Souza BA, Carvalho CAL, Sodre GS, Marchini LC. Características físico-químicas de amostras de mel de *Melipona asilvai* (Hymenoptera: Apidae). *Ciênc Rural*. 2004; 34(5):1623-4.
- Azeredo LC, Azeredo MAA, Beser LBO. Características físico-químicas de amostras de méis de melíponas coletadas no Estado de Tocantins. In: XIII Congresso Brasileiro de Apicultura, 2000. Anais... Florianópolis-SC: Confederação Brasileira de Apicultura, 2000. CD-ROM.
- Campos G, Modesta RCD. Diferenças sensoriais entre mel floral e mel de melato. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2000; 59(1/2):7-14.
- Rodrigues AE, Silva SEM, Beserra EMF, Rodrigues ML. Análise físico-química dos méis das abelhas *Apis mellifera* e *Melipona scutellaris* produzidos em regiões distintas no Estado da Paraíba. *Ciênc Rural*. 2005; 35(5):1166-71.
- Alves RMO, Carvalho CAL, Souza BA, Sodrê GS, Marchini LC. Características físico-químicas de amostras de mel de *Melipona mandacaia* Smith (Hymenoptera: Apidae). *Cienc Tecnol Aliment*. 2005; 25(4):644-50.
- Welke JE, Reginatto S, Ferreira D, Vicenzi R, Soares JM. Caracterização físico-química de méis de *Apis mellifera* L. da região noroeste do Estado do Rio Grande do Sul. *Ciênc Rural*. 2008; 38(6):1737-41.
- Moreti ACCC, Sodrê GS, Marchini LC, Otsuk IP. Características físico-químicas de amostras de méis de *Apis mellifera* L. do estado do Ceará, Brasil. *Ciênc Agrotec*. 2009; 33 (1):191-9.
- Silva RA, Aquino IS, Rodrigues AE, Souza DL. Análise físico-química de amostras de mel de abelhas zamboque (*Frieseomelitta varia*) da região do Seridó do Rio Grande do Norte. *Rev Verde*. 2009; 4(4):70-5.
- Anacleto DA, Souza BA, Marchini LC, Moreti ACCC. Composição de amostras de mel de abelha Jataí (*Tetragonisca angustula* latreille, 1811). *Cienc Tecnol Aliment*. 2009; 29(3):535-41.
- Freitas WES, Aroucha EMM, Soares KMP, Mendes FIB, Oliveira VR, Lucas CR et al. Parâmetros físico-químicos do mel de abelha sem ferrão (*Melipona subnitida*) após tratamento térmico. *Acta Vet Brasília*. 2010; 4(3):153-7.
- Abadio Finco FDB, Moura LL, Silva IG. Propriedades físicas e químicas do mel de *Apis mellifera* L. *Cienc Tecnol Aliment*. 2010; 30(3):706-12.
- Brasil. Ministério da Agricultura. Instrução normativa nº11, de 20 de outubro de 2000. Estabelece o regulamento técnico de identidade e qualidade do mel. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 out. 2000.
- Brasil. Laboratório Nacional de Referência Animal. Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. II - Métodos físicos e químicos. Mel. Ministério da Agricultura. Brasília: v. 2, cap. 25, 1981. p.1-15.
- Codex Alimentarius Commission. Official methods of analysis. v.3, Supl.2, 1990. p.15-39.
- Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of AOAC international. 16. ed. Maryland: AOAC, 1997. 1141p.
- 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.

20. Silva KFNL, Queiroz AJM, Figueiredo RMF, Silva CTS, Melo KS. Características físico-químicas de mel produzido em Limoeiro do Norte durante o armazenamento. *Rev Caatinga* 2009; 22(4):246-54.
21. Santos DC, Moura Neto LG, Martins JN, Silva KFNL. Avaliação da qualidade físico-química de amostras de méis comercializadas na região do Vale do Jaguaribe-CE. *Rev Verde*. 2009; 4(4):21-6.
22. Silva RA, Rodrigues LMF, Lima A, Camargo RCR. Avaliação da qualidade do mel de abelha *Apis mellifera* produzido no município de Picos, Estado do Piauí, Brasil. *Hig Aliment*. 2006; 20(144):90-4.
23. Crane E. O livro do mel. 2ª edição. São Paulo: Nobel, 1985. 226p.
24. Azeredo MAA, Azeredo LC, Damasceno JG. Características físico-químicas dos méis do município de São Fidélis -RJ. *Cienc Tecnol Aliment*. 1999; 19(1):3-7.
25. Vilhena F, Almeida-Muradian LB. Análises físico-químicas de méis de São Paulo. *Mensagem doce*. 1999; 53:17-9.
26. Silva CL, Queiroz AJM, Figueirêdo RMF. Caracterização físico-química de méis produzidos no Estado do Piauí para diferentes floradas. *Rev Bras Eng Agríc Ambient*. 2004; 8(2/3):260-5.

Identificação e avaliação da resistência antimicrobiana de leveduras em vegetais minimamente processados

Identification and evaluation of antimicrobial resistance of yeast in minimally processed vegetables

RIALA6/1355

Ana Paula Maciel PEREIRA*, Catherine Hirsch WERLE, Tânia Maria Vinturim GONÇALVES, Fernando Leite HOFFMANN

*Endereço para correspondência: Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rua Imperial, nº. 66, apto 501, bairro Vila Imperial, São José do Rio Preto/SP, Brasil. CEP 15015-610. Tel.: 34 3822-1738. E-mail: anapaula@sjrp.unesp.br.

Recebido: 23.02.2010 – Aceito para publicação: 30.06.2011

RESUMO

O consumo de vegetais minimamente processados vem crescendo devido às exigências dos consumidores por produtos de fácil preparo. Este produto, por ser extremamente manipulado, pode ser contaminado por micro-organismos deteriorantes, como as leveduras, que possuem a capacidade de diminuir a vida útil do alimento. Neste sentido, visando à preocupação com a resistência de micro-organismos aos métodos de sanitização utilizados pelas indústrias de alimentos e diante da necessidade de maiores estudos do poder antimicrobiano do ozônio, este estudo teve por objetivo isolar e identificar as leveduras presentes nos vegetais minimamente processados e verificar sua resistência antimicrobiana frente ao hipoclorito de sódio e ozônio. Foram coletadas 84 amostras de vegetais minimamente processados. Destas, foram isoladas 47 culturas de leveduras que foram submetidas à identificação e ao ensaio de resistência ao hipoclorito de sódio (50, 100, 200 e 400 ppm) e ozônio (0,25 e 0,5 ppm). Do total de leveduras isoladas, 85,1% corresponderam à *Cryptococcus laurentii*, 12,8% à *Arxula adenivorans* e 2,1% à *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii*. Todas elas apresentaram resistência aos sanitizantes hipoclorito de sódio e ozônio em todas as concentrações testadas. Diante destas observações, medidas devem ser adotadas durante o processamento para evitar a contaminação por microbiota deteriorante.

Palavras-chave. vegetais minimamente processados, leveduras, hipoclorito de sódio, ozônio.

ABSTRACT

The consumption of minimally processed vegetables has been growing due to consumer demand for products easy to prepare. As it is extremely manipulated, this product can be contaminated with spoilage organisms such as yeasts, that have the ability to decrease the shelf life of food. In this sense, seeking to concerns about the resistance of microorganisms to sanitation methods for food industries and given the need for more studies of the antimicrobial power of ozone, this study aimed to isolate and identify the yeasts present in minimally processed vegetables, and check their antimicrobial resistance to sodium hypochlorite and ozone. 84 samples of minimally processed vegetables were collected. From them, 47 yeast cultures were isolated and submitted for identification and testing of resistance to sodium hypochlorite sanitizers (50, 100, 200 and 400 ppm) and ozone (0.25 and 0.5 ppm). From the total yeast isolated, 85.1% corresponds to *Cryptococcus laurentii*, 12.8% to *Arxula adenivorans* and 2.1% to *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii*. All of them were resistant to the sanitizers sodium hypochlorite and ozone at all concentrations tested. Given these observations, some actions must be taken during processing to avoid contamination with deteriorative microbiota.

Keywords. minimally processed vegetables, yeast, sodium hypochlorite, ozone.

INTRODUÇÃO

Os vegetais minimamente processados são produtos *in natura*, selecionados, lavados, descascados, cortados, sanitizados, embalados e refrigerados, tornando-se prontos para o preparo e/ou consumo. Surgiram há aproximadamente 30 anos nos Estados Unidos da América (EUA) e, no Brasil, tal tecnologia foi introduzida somente na década de 1990, devido ao crescimento da demanda de produtos considerados de conveniência ou de preparo rápido¹.

Fantuzzi et al.² e Paula et al.³ relataram que, para assegurar a saúde do consumidor, tais produtos devem apresentar boa qualidade microbiológica, que depende da carga microbiana presente na matéria-prima, condições em que cada etapa do processamento foi efetuada até o armazenamento do produto.

Os fungos filamentosos e as leveduras são indicadores de eficiência do processo de sanitização de equipamentos e utensílios durante o processamento de alimentos, pois esses micro-organismos são considerados agentes potenciais de deterioração, com poder de oxidação de diferentes substratos, como os carboidratos⁴.

Bolores e leveduras são micro-organismos provenientes do solo e/ou do ar, resistentes a condições adversas, como pH ácido, baixa atividade de água e temperatura ótima na faixa de 25 a 28 °C, fazendo com que não se desenvolvam em temperaturas de refrigeração^{5,6}.

A água utilizada na lavagem dos vegetais é de grande importância para a garantia de segurança dos alimentos e a adição de antimicrobianos poderia melhorar sua eficiência, reduzindo o risco de desenvolvimento de micro-organismos deteriorantes e/ou patogênicos^{1,7}.

Desta forma, o processamento mínimo objetiva oferecer ao consumidor produtos práticos, semelhantes aos frescos e com vida útil relativamente prolongada, mantendo sua qualidade nutritiva e ainda proporcionando inocuidade do ponto de vista microbiológico³.

Dentre algumas soluções desinfetantes, a mais utilizada é o cloro, em suas várias formas. O hipoclorito de sódio é o sanitizante mais empregado devido a sua rápida ação, fácil aplicação e completa dissociação em água, porém em elevadas concentrações pode ocasionar descoloração em alguns produtos^{8,9}.

O gás ozônio é um antimicrobiano pouco utilizado no Brasil, embora seja eficiente e considerado mais seguro do que os demais sanitizantes comumente utilizados pela

indústria de alimentos. Por esta razão, produtores de vegetais minimamente processados vêm substituindo o hipoclorito de sódio por tal sanitizante¹⁰.

Conforme Lanita e Silva¹¹, o ozônio vem ganhando destaque por ser mais seguro do que os desinfetantes mais comuns, pois não deixa resíduos tóxicos capazes de alterar características como sabor e odor. Dentre suas diversas aplicações destaca-se a desinfecção de equipamentos e embalagens, além de evitar a formação de biofilmes microbianos.

As concentrações de hipoclorito de sódio recomendadas pela legislação na higienização de alimentos variam de 100 a 250 ppm¹². Para o ozônio não existe até o momento uma legislação específica para seu uso em alimentos¹³.

Neste contexto, visando à preocupação com a resistência de micro-organismos aos métodos de sanitização utilizados pelas indústrias de alimentos e diante da necessidade de maiores estudos do poder antimicrobiano do ozônio, este estudo teve por objetivo isolar e identificar as leveduras presentes nos vegetais minimamente processados e verificar sua resistência antimicrobiana frente aos sanitizantes empregados no processamento, hipoclorito de sódio e ozônio.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização deste trabalho, amostras de vegetais minimamente processados foram cedidas por uma microempresa localizada no município de São José do Rio Preto/SP e essas foram encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Estadual Paulista – UNESP. Foram coletadas 12 amostras de acelga, cenoura, couve, milho e vagem e 06 amostras de abóbora, couve-flor, quiabo e repolho, totalizando 84 amostras. Destas, foram isoladas 47 culturas de leveduras.

As maiores porcentagens de positividade de isolamento foram obtidas nas amostras de milho, abóbora, couve-flor e cenoura, com 58,3%, 50%, 50% e 41,6% respectivamente, sendo que nas amostras de couve, quiabo e vagem foram observadas positividade de 33,3% e, nas amostras de acelga e repolho, de 16,6%.

Para o crescimento e isolamento das colônias de leveduras foi utilizado o método de semeadura por profundidade utilizando o Potato Dextrose Agar (PDA) acidificado com ácido tartárico a 10% (pH = 4). Em seguida, cada cultura pura foi previamente submetida

à coloração de Gram e observada sob microscopia óptica, recebendo um código de identificação, ou seja, VMP_cN onde VMP = vegetal minimamente processado, c = número da coleta e N = número da levedura isolada desta amostra, sendo mantida em meio “Gymp” coberto com óleo mineral para evitar ressecamento e mantida a 8 ± 2 °C para posterior identificação.

Nos testes taxonômicos (morfológicos e fisiológicos) foram empregados os métodos descritos por Kreeger Van Rij¹⁴ e Barnett et al.^{15,16}. A identificação das culturas foi realizada segundo chaves descritas por Barnett et al.¹⁶ e Kurtzman e Fell¹⁷.

No ensaio de resistência aos sanitizantes foi utilizado o ágar Sabouraud glicose, no qual foi acrescido o hipoclorito de sódio nas concentrações 50, 100, 200 e 400 ppm e o ozônio aquoso nas concentrações 0,25 e 0,5 ppm. Como controle foi empregado o mesmo meio de cultura, porém sem a adição do sanitizante.

As culturas de 24-48 horas em meio “Gymp” foram transferidas e pré-incubadas durante 3 a 5 dias a 25 °C em *Yeast Nitrogen Base* 0,67% líquido contendo 0,1% de glicose, sendo agitadas periodicamente para o consumo do endógeno. A partir daí, cada inóculo foi transferido assepticamente para um sistema *replica-plate multityped*, que permite a inoculação de vinte e cinco colônias/placa de Petri^{18,19}.

As placas de Petri foram incubadas em estufa a 25 °C com leituras de 7, 14 e 21 dias de incubação.

A resistência antimicrobiana foi verificada de acordo com a presença de crescimento de cada levedura no meio de cultura acrescido com os sanitizantes nas concentrações testadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Identificação das leveduras

As leveduras isoladas das amostras e identificadas estão apresentadas na Tabela 1 de acordo com a sua origem, sendo que os maiores percentuais corresponderam à cenoura, couve, milho e couve-flor, os quais apresentaram boa disponibilidade de nutrientes e umidade para o desenvolvimento de micro-organismos²⁰.

As culturas identificadas corresponderam às espécies *Arxula adenivorans*, *Cryptococcus laurentii* e *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii* (Tabela 2).

A espécie *Cryptococcus laurentii* foi a mais frequente, compreendendo 40 culturas (85,1%), seguida por *Arxula adenivorans* com 6 (12,8%) e *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii* com 1 (2,1%).

A espécie *Arxula adenivorans* fermenta a glicose, galactose, sucrose, maltose, lactose, rafinose e trealose e é proveniente de solos e de insetos. A *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii* possui a capacidade de alterar o sabor do alimento e é comumente encontrada em alimentos ácidos¹⁷.

Cryptococcus laurentii é uma espécie não fermentativa, com capacidade de desenvolvimento em elevadas concentrações de ácido e sal¹⁷. Esta levedura apresenta cor esbranquiçada, vermelha ou laranja e pode ser encontrada em vegetais e solos, peixes marinhos, camarão e carne de gado crua moída²⁰.

Seixas²¹ ao isolar leveduras em saladas de maionese, verificou que 76% correspondiam à *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii*, 16% à *Cryptococcus laurentii*, 4% à *Arxula adenivorans* e 4% à *Candida edax*.

Tabela 1. Distribuição do total das leveduras isoladas de acordo com o vegetal de origem

Vegetais minimamente processados	Códigos das culturas (VMP _c N)*	Número de culturas	Porcentagens (n = 47)**
Acelga	A ₇ 1; A ₇ 2; A ₇ 3; A ₁₁ 1	04	8,5%
Cenoura	B ₇ 1; B ₈ 1; B ₈ 2; B ₉ 1; B ₉ 2; B ₁₁ 1; B ₁₁ 2; B ₁₂ 1; B ₁₂ 2	09	19,2%
Couve	C ₇ 1; C ₇ 2; C ₇ 3; C ₈ 1; C ₉ 1; C ₉ 2; C ₁₁ 1; C ₁₁ 2	08	17,0%
Milho	D ₅ 1; D ₆ 1; D ₇ 1; D ₈ 1; D ₉ 1; D ₉ 2; D ₁₁ 1; D ₁₂ 1	08	17,0%
Quiabo	E ₅ 1; E ₆ 1	02	4,3%
Repolho	F ₅ 1	01	2,1%
Vagem	G ₅ 1; G ₉ 1; G ₁₀ 1; G ₁₁ 1	04	8,5%
Couve-flor	H ₇ 1; H ₇ 2; H ₇ 3; H ₈ 1; H ₁₁ 1; H ₁₁ 2; H ₁₁ 3; H ₁₁ 4	08	17,0%

*VMP_cN: VMP = vegetal minimamente processado; C = número da coleta; N = número da levedura isolada

**n: número total de leveduras isoladas

Tabela 2. Frequência relativa das três espécies de leveduras isoladas

Leveduras	Código das culturas (VMP _C N)*	Número de culturas	Porcentagens (n = 47)**
<i>Arxula adenivorans</i>	B ₇ 1; B ₁₁ 2; D ₅ 1; D ₆ 1; D ₁₂ 1; I ₉ 1 A ₇ 1; A ₇ 2; A ₇ 3; A ₁₁ 1; B ₈ 1; B ₉ 1; B ₉ 2; B ₁₁ 1; B ₁₂ 1; B ₁₂ 2; C ₇ 1; C ₇ 2; C ₇ 3; C ₈ 1; C ₉ 1; C ₉ 2; C ₁₁ 1; C ₁₁ 2;	06	12,8%
<i>Cryptococcus laurentii</i>	D ₇ 1; D ₈ 1; D ₉ 1; D ₉ 2; D ₁₁ 1; E ₅ 1; E ₆ 1; F ₅ 1; G ₅ 1; G ₉ 1; G ₁₀ 1; G ₁₁ 1; H ₇ 1; H ₇ 2; H ₇ 3; H ₈ 1; H ₁₁ 1; H ₁₁ 2; H ₁₁ 3; H ₁₁ 4; I ₇ 1; I ₈ 1	40	85,1%
<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>fabryii</i>	B ₈ 2	01	2,1%

*VMP_CN: VMP = vegetal minimamente processado; C = número da coleta; N = número da levedura isolada

**n: número total de leveduras isoladas

As hortaliças apresentaram uma elevada quantidade de água e nutrientes propiciando o desenvolvimento de micro-organismos, sendo que o *Cryptococcus* sp. é um dos gêneros de leveduras mais encontrados em hortaliças, juntamente com *Rhodotorula* sp., *Candida* sp. e *Kloeckera* sp.. A contaminação pode ocorrer por meio do solo, rico nesses micro-organismos, os quais podem chegar ao alimento pelo vento ou por insetos. A chuva pode arrastar a terra elevando a carga microbiana, além de aumentar a umidade e favorecer o crescimento de fungos em até 72%²².

Ensaio de resistência ao hipoclorito de sódio e ozônio

A microempresa utilizou o hipoclorito de sódio na concentração de 100 ppm no período em que foram realizadas as seis primeiras coletas. Posteriormente, foi instalado um gerador de ozônio no tanque de sanitização e este antimicrobiano passou a ser utilizado na concentração de 0,5 ppm. Desta forma, as leveduras isoladas foram submetidas às concentrações de 50, 100, 200 e 400 ppm de hipoclorito de sódio e 0,25 e 0,5 ppm de ozônio. É válido ressaltar que não foi possível realizar o teste com o dobro da concentração de ozônio, visto que o gerador se encontrava regulado apenas para a concentração de 0,5 ppm.

Todas as leveduras isoladas apresentaram resistência a todas as concentrações testadas de hipoclorito de sódio (50, 100, 200 e 400 ppm) e de ozônio (0,25 e 0,5 ppm). Esses resultados são insatisfatórios, mostrando que as concentrações utilizadas no processamento mínimo são ineficientes para diminuir ou eliminar tais micro-organismos.

Estudos realizados por Galetti et al.²³, ao testarem o perfil de resistência de micro-organismos isolados de manipuladores, superfícies de contato e alimentos, durante

o processo de produção de frango xadrez e alcatra ao molho, verificaram que o hipoclorito de sódio na concentração de 200 ppm não foi eficaz contra nenhuma das cepas testadas.

Pesquisas revelaram que o aumento da concentração de hipoclorito de sódio para 2000 ppm na desinfecção de melões “Cantaloupe” não provocou redução adicional na população de micro-organismos aeróbios mesófilos e de bolores e leveduras durante 20 dias de armazenamento a 2,2 °C²⁴.

Em contrapartida, Both et al.²⁵ constataram que 200 ppm de hipoclorito de sódio foram eficientes para inativação microbiana, com tempo de contato não inferior a 30 minutos.

De acordo com Chiattonne et al.¹³ as concentrações de 0,5 e 1,0 ppm de ozônio são capazes de reduzir consideravelmente a carga microbiana na etapa de sanificação de carne bovina maturada. Já no tratamento de carcaças de frango, a água ozonizada foi eficiente nas concentrações de 3,0 e 3,5 ppm, reduzindo 58,6% de bolores e leveduras.

Cardoso et al.²⁶, ao avaliarem a ação do ozônio no tratamento de água, constataram que a concentração de 4 ppm foi capaz de diminuir grande parte da microbiota contaminante presente.

Por outro lado, Ponce et al.²⁷ verificaram redução significativa de bolores e leveduras em morangos minimamente processados sanitizados com ozônio na concentração de 50 ppm.

A ação germicida do ozônio variou de acordo com o tipo de micro-organismo, sendo mais efetiva contra células vegetativas de bactérias do que esporos ou fungos. Esse sanitizante também combate algumas

espécies de vírus, como o da hepatite A, influenza A, estomatite vesicular e rinotraqueíte²⁶.

Silva et al.²⁸ ressaltaram que é importante considerar o fato de que desinfetantes de marcas comerciais distintas podem apresentar diferenças na eficácia antimicrobiana, tornando necessário o monitoramento da qualidade dos produtos disponíveis no mercado, garantindo, assim, segurança na etapa de sanitização.

Os resultados encontrados permitem inferir que a resistência das leveduras aos sanitizantes é preocupante, pois tais micro-organismos podem deteriorar o alimento, diminuindo sua vida de prateleira. Devem ser adotadas medidas ao longo do processamento com o objetivo de prevenir a contaminação destes micro-organismos, como a aplicação de maiores concentrações de ozônio. Em relação ao hipoclorito de sódio, concentrações mais altas não são permitidas pela legislação, pois, além de oferecerem riscos à saúde humana, podem provocar alterações organolépticas nos alimentos.

REFERÊNCIAS

1. Chitarra MIF. Processamento mínimo de frutos e hortaliças. Viçosa: Centro de Produções Técnicas; 1998.
2. Fantuzzi E, Puschmann R, Vanetti MCD. Microbiota contaminante em repolho minimamente processado. *Ciênc Tecnol Alim*. 2004;24(2):207-11.
3. Paula NRF, Boas EVBV, Rodrigues LJ, Carvalho RA, Piccoli RH. Qualidade de produtos minimamente processados e comercializados em gôndolas de supermercados nas cidades de Lavras-MG, Brasília-DF e São Paulo-SP. *Ciênc Agrotecnol*. 2009;33(1):219-27.
4. Brito CS, Rossi DA. Bolores e leveduras, coliformes totais e fecais em sucos de laranja *in natura* e industrializados não pasteurizados comercializados na cidade de Uberlândia-MG. *Biosc J*. 2005;21(1):133-40.
5. Ferreira MGAB, Bayma AB, Martins AGLA, Garcias Júnior AV, Marinho SC. Aspectos higiênico-sanitários de legumes e verduras minimamente processados e congelados. *Hig Alim*. 2003;17(106):49-55.
6. Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA, Taniwaki MH, Santos RFS, Gomes RAR. Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos. São Paulo: Varela; 2007.
7. Aguila JSD, Sasaki FF, Heiffig LS, Ongarelli MG, Gallo CR. Determinação da microflora em rabanetes minimamente processados. *Hortic Brasil*. 2006;24(1):75-8.
8. Srebernich SM. Utilização de dióxido de cloro e do ácido peracético como substitutos do hipoclorito de sódio na sanitização do cheiro-verde minimamente processado. *Ciênc Tecnol Alim*. 2007;27(4):744-50.
9. Zacari CZ, Shirahigue LD, Gonçalves MFV, Gallo CR, Spoto MHF. Qualidade do repolho minimamente processado, submetido a diferentes concentrações de cloro. *Hig Alim*. 2007;21(155):67-71.
10. Paschoalato CFPR, Trimailovas MR, Bernardo L. Formação de subprodutos orgânicos halogenados nas operações de pré-oxidação com cloro, ozônio e peroxônio e pós-cloração em água contendo substância húmica. *Eng Sanit Ambient*. 2008;13(3):313-22.
11. Lanita CS, Silva SB. Uso de ozônio em câmara industrial para controle de bolores e leveduras durante a maturação de queijo tipo parmesão. *Braz J Food Technol*. 2008;11(3):182-9.
12. Brasil. Centro de Vigilância Sanitária de São Paulo. Portaria 6/99, de 10 de março de 1999. Regulamento técnico sobre os parâmetros e critérios para o controle higiênico-sanitário em estabelecimentos de alimentos. *Diário Oficial [do] Estado de São Paulo*. São Paulo, SP, 12 mar. 1999.
13. Chiattonne PV, Torres LM, Zambiasi RC. Aplicação do ozônio na indústria de alimentos. *Alim Nutr*. 2008;19(3):341-9.
14. Kreger-van Rij NJW. The yeasts: a taxonomy study. Amsterdam: Science Publication; 1984.
15. Barnet JA, Payne RW, Yarrow D. Yeasts: characteristics and identification. Cambridge: Cambridge University Press; 1983.
16. Barnet JA, Payne RW, Yarrow D. Yeasts: characteristics and identification. Cambridge: Cambridge University Press; 1990.
17. Kurtzman CP, Fell JW. The yeasts: a taxonomy study. Oxford: Elsevier; 1998.
18. Lederberg J, Lederberg EM. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *J Bacteriol*. 1952;63:399-406.
19. Sheree Lin CC, Fung DYC, Cox NA. Conventional and rapid methods for yeasts identification. *Crit Rev Microbiol*. 1987;14(4):273-89.
20. Jay JM. Microbiologia dos alimentos. Porto Alegre: Artmed; 2005.
21. Seixas FRF. Verificação das boas práticas de fabricação (BPF) e análise da qualidade microbiológica de saladas adicionadas de maionese comercializadas na cidade de São José do Rio Preto-SP [dissertação de mestrado]. São José do Rio Preto(SP): Universidade Estadual Paulista; 2008.
22. Porte A, Maia LH. Alterações fisiológicas, bioquímicas e microbiológicas de alimentos minimamente processados. *Bol CEPPA*. 2001;19(1):105-18.
23. Galetti FCS, Azevedo AP, Azevedo RVP. Avaliação do perfil de sensibilidade a antissépticos, desinfetantes e antibióticos (resistograma), de bactérias isoladas de manipuladores, superfícies de contato e alimentos, durante o processo de produção de frango xadrez e alcatra ao molho. *Hig Alim*. 2005;19(129):91-9.
24. Ayhan Z, Chism GW, Richter ER. The shelf-life of minimally processed fresh cut melons. *J Food Qual*. 1998;21(1):29-40.
25. Both JMC, Longaray SM, Avancini CAM. O desinfetante hipoclorito de sódio como barreira sanitária: condições de atividade frente ao *Staphylococcus aureus* isolados em alimentos envolvidos em surtos de toxinfecções alimentares. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2009;68(2):254-8.
26. Cardoso CC, Veiga SMOM, Nascimento LC, Fiorini JE, Amaral LA. Avaliação microbiológica de um processo de sanificação de galões de água com a utilização do ozônio. *Ciênc Tecnol Alim*. 2003;23(1):59-61.
27. Ponce AR, Bastiani MID, Minim VP, Vanetti MCD. Características físico-químicas e microbiológicas de morango minimamente processado. *Ciênc Tecnol Alim*. 2010;30(1):113-8.
28. Silva N, Silveira NFA, Yokoya F, Okazaki MM. Ocorrência de *Escherichia coli* O157:H7 em vegetais e resistência aos agentes de desinfecção de verduras. *Ciênc Tecnol Alim*. 2003;23(2):167-73.

Avaliação da qualidade microbiológica de *sashimis* à base de salmão, preparados em restaurantes especializados em culinária japonesa

Microbiological quality of salmon-based sashimi prepared at restaurants specialized in japanese food

RIALA6/1356

Marcelo Jostmeier VALLANDRO^{1*}, Thais de CAMPOS², Daniel PAIM², Marisa CARDOSO², Liris KINDLEIN²

*Endereço para correspondência: ¹Centro Estadual de Vigilância em Saúde, Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul, Rua Fernando Abbott, 455, 901-B, Cristo Redentor, Porto Alegre/RS, Brasil. CEP 91040-360. E-mail: mvallandro@hotmail.com.

²Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Recebido: 02.03.2011 – Aceito para publicação: 30.05.2011

RESUMO

O estudo avaliou a qualidade microbiológica de amostras de *sashimi* à base de salmão e as condições higiênico-sanitárias dos restaurantes especializados em culinária japonesa na cidade de Porto Alegre/Brasil, licenciados pelo órgão específico municipal. Cento e oito amostras coletadas de seis restaurantes foram analisadas seguindo-se os parâmetros microbiológicos estipulados pela RDC 12/01 da ANVISA. Das amostras coletadas de quatro (66,6%) estabelecimentos (B, C, D e F) foram detectados coliformes termotolerantes acima do limite estabelecido pela legislação, respectivamente, em 11,11%, 33,33%, 61,11% e 44,44% do total de amostras. *Staphylococcus* coagulase positiva, *Vibrio parahaemolyticus* e *Salmonella* sp. não foram isolados. Conforme a avaliação global dos itens do check-list, não houve restaurantes com condições higiênico-sanitárias inadequadas, sendo três (A, D, E) considerados adequados e os demais aprovados com restrições. Foram encontradas inconformidades quanto à higiene, manipulação e temperatura de armazenamento. Houve associação positiva entre a temperatura aferida no pescado e o percentual de contaminação por coliformes termotolerantes ($r_s = 0,928$; $p = 0,008$). Das amostras analisadas, 75% foram consideradas em condições sanitárias satisfatórias, mas há necessidade de efetiva aplicação das Boas Práticas de Fabricação, com ênfase nos itens de higiene de superfícies e temperatura de armazenamento.

Palavras-chave. boas práticas de fabricação, coliformes termotolerantes, pescado, restaurantes japoneses, *sashimi*.

ABSTRACT

This study evaluated the microbiological quality of salmon-based *sashimi* and the sanitary-hygienic conditions of restaurants specialized in Japanese food in Porto Alegre city, Brazil, licensed by a municipal agency. One hundred eight samples were collected from six restaurants, and microbiological quality was analyzed according to RDC 12/01 ANVISA. The samples collected from four (66.6%) restaurants (B, C, D and F) were thermotolerant coliforms positive above the limit established by legislation, being 11.11%, 33.33%, 61.11% and 44.44% of the total analyzed samples, respectively. None of the samples showed contamination with coagulase-positive *Staphylococcus*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Salmonella* sp. According to the overall evaluation of checklist items, none of the restaurants showed inadequate sanitary-hygienic conditions; three of them (A, D, E) were considered adequate, and the others were approved with restrictions. Nonconformities were found in hygiene, manipulation, and storage temperature. A statistically positive association between fish temperature and the percentage of contamination by thermotolerant coliforms ($r_s = 0.928$; $p = 0.008$) was found. Of the analyzed samples, 75% showed satisfactory sanitary conditions, but the Good Manufacturing Practices should be applied, especially on items related to surface hygiene and storage temperature.

Keywords. good manufacturing practices, thermotolerant coliforms, fish, Japanese restaurants, *sashimi*.

INTRODUÇÃO

Alimentos produzidos ou manipulados em condições precárias de higiene podem oferecer risco à saúde do consumidor. Alguns micro-organismos que podem contaminar o alimento são patogênicos, enquanto outros não causam enfermidades nos seres humanos, mas são indicadores de condições higiênicas inadequadas, sendo sua presença sugestiva da existência de micro-organismos patogênicos¹. Por ser um alimento de fácil decomposição, o pescado exige cuidados especiais, notadamente os relacionados com a conservação pelo frio. Do mesmo modo, está sujeito à contaminação pelos mais variados micro-organismos, adquiridos já no ambiente aquático ou durante as diferentes etapas de captura, transporte e distribuição^{2,3}.

Algumas bactérias patogênicas estão presentes naturalmente na água e no ambiente, como, por exemplo, as espécies patogênicas de *Vibrio* sp. que podem, portanto, ser encontradas em peixes vivos e em pescados crus⁴. A contaminação com patógenos de reservatórios animal/humano, como *Salmonella* sp. e *Escherichia coli*, pode ocorrer na pré ou pós-captura do pescado, enquanto a manipulação inadequada durante o preparo pode introduzir no alimento *Staphylococcus aureus* de origem humana, dentre outros^{1,3-5}.

Em países onde se mantém o registro das doenças veiculadas por alimentos, o pescado contribui significativamente para os surtos relatados, variando de um país para outro, dependendo do clima, costumes da dieta e outras diferenças sociais⁶. Na Coreia e Japão, por exemplo, peixes e frutos do mar são os principais veículos de transmissão de doenças de origem alimentar⁷.

Nos últimos anos, tem-se observado uma mudança no perfil alimentar da população brasileira, o que, associada à oferta de pescado de qualidade no mercado interno, aumentou seu consumo, em especial pela oferta de novas formas de apresentação desse alimento⁸. Houve uma rápida difusão do consumo de *sushi* e *sashimi*, anteriormente pouco disponíveis. Locais especializados nesse tipo de culinária são cada vez mais frequentados, levando à preocupação crescente dos órgãos ligados à Saúde Pública, principalmente pelo fato de serem alimentos altamente perecíveis, consumidos sem processamento térmico ou fermentativo, demandando condições higiênico-sanitárias adequadas para sua preparação e conservação⁹.

A partir disso, este trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica de *sashimis* à base

de salmão, bem como as condições higiênico-sanitárias de restaurantes especializados em culinária japonesa na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

MATERIAL E MÉTODOS

Para realização deste estudo foram feitas inspeções sanitárias juntamente com a Equipe de Vigilância de Alimentos da Secretaria Municipal de Saúde do município de Porto Alegre em restaurantes licenciados junto ao município, especializados em culinária japonesa, onde foram colhidas amostras de preparações de *sashimi* servidas no estabelecimento e aplicado o *check-list* da legislação sanitária, adaptado por esta equipe. As amostras foram coletadas logo após terem sido preparadas, uma vez que, nesses restaurantes, os *sashimis* são elaborados à medida que o cliente solicita.

Apenas estabelecimentos já licenciados junto ao município foram incluídos na pesquisa. No período do estudo existiam seis restaurantes que obedeciam a esse critério. O salmão foi escolhido devido ao fato de ser o pescado mais empregado na preparação de *sashimi*. As visitas aos estabelecimentos foram realizadas entre os meses de novembro de 2009 e abril de 2010, sempre nas segundas-feiras à noite, entre as dezoito e vinte e uma horas.

Para o cálculo do tamanho das amostras de preparações de *sashimi*, considerou-se uma média estimada de produção de 4000 *sashimis*/dia, uma prevalência de *V. parahaemolyticus* de 15%¹⁰⁻¹³, um erro aceitável de 10% e um intervalo de confiança de 95%. A partir disso, determinou-se que seria necessária a coleta de 18 amostras em cada um dos estabelecimentos. Cada amostra foi composta de três *sashimis* à base de salmão para permitir que se alcançasse a unidade analítica de 25 g. Imediatamente após a coleta, as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis, identificadas e mantidas sob refrigeração (2 ± 2 °C) até serem processadas.

No momento da coleta também foram aferidas as temperaturas de exposição dos alimentos utilizando um termômetro digital com mira infravermelha da marca Minipa MT-350, com faixa de medição de -30 °C a 550 °C e com precisão de ± 2 °C.

Para avaliação das condições higiênico-sanitárias dos estabelecimentos foi aplicado um *check-list* elaborado pela Equipe de Vigilância de Alimentos da Secretaria Municipal de Saúde do município de Porto Alegre, baseado na legislação vigente¹⁴, composto por 91 itens, divididos em oito blocos: *i.* edificação, instalações, equipamentos,

móveis e utensílios; *ii*. higienização de instalações, equipamentos, móveis e utensílios; *iii*. controle integrado de pragas/manejo de resíduos; *iv*. abastecimento de água; *v*. manipuladores; *vi*. controle de temperatura e do tempo, matérias-primas, ingredientes e embalagens/preparação do alimento; *vii*. armazenamento e transporte do alimento preparado; e *viii*. exposição ao consumo do alimento preparado.

Todos os itens foram avaliados de acordo com a adequação/inadequação com a legislação¹⁵. A pontuação de cada bloco foi calculada atribuindo-se 1 (um) ponto para cada item adequado, sobre o total de itens por bloco, e calculou-se o percentual de adequação do estabelecimento. Utilizou-se como critério de classificação: adequado, acima de 75%; adequado com restrição, entre 50% e 75%; e inadequado, abaixo de 50% de adequação¹⁴.

Nas amostras de *sashimi* foram pesquisados todos os micro-organismos citados pela RDC 12/01 da ANVISA¹⁵, para pratos prontos para o consumo à base de pescados e similares crus (*sashimi*). Os valores máximos permitidos, por parâmetro analisado para esse tipo de alimento são: coliformes a 45 °C $\leq 10^2$ UFC/g, estafilococos coagulase positiva $\leq 5 \times 10^3$ UFC/g; *Vibrio parahaemolyticus* $\leq 10^3$ NMP/g e ausência de *Salmonella* sp. em 25 g de alimento.

A preparação e análise das amostras foram realizadas conforme Silva, Junqueira e Silveira¹⁶.

A enumeração de coliformes a 45 °C foi realizada em Ágar Vermelho Violeta Bile (VRBA, Biobrás). Após incubação por 18-24h a 37 °C, as amostras que apresentaram colônias típicas foram confirmadas em caldo EC (*Escherichia coli*, Merck), incubadas em banho-maria a 44,5 °C por 24-48h. Consideraram-se positivas as reações dos tubos que apresentaram turvação do meio e produção de gás.

A contagem de estafilococos coagulase positiva foi conduzida em ágar Baird-Parker (Merck). Após incubação a 37 °C por 48h, as amostras que apresentaram colônias típicas foram selecionadas e submetidas à confirmação pela prova da coagulase.

Para o cálculo do número de coliformes a 45 °C e estafilococos coagulase positiva, multiplicou-se o número de colônias contadas na placa pelo percentual de colônias confirmadas e pelo o inverso da diluição utilizada para contagem.

A pesquisa de *Salmonella* sp. compreendeu etapas de pré-enriquecimento em água peptonada 1% tamponada, incubada a 37 °C durante 18-24h;

enriquecimento seletivo em Caldo Rappaport-Vassiliadis (Merck) e Caldo Tetracionato (Merck) incubados a 42 °C durante 24h; e isolamento em Ágar Verde Brilhante Lactose Sacarose (BPLS, Merck) e Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD, Merck). Os meios foram incubados a 37 °C durante 24-48h. Colônias típicas e suspeitas de *Salmonella* sp. foram confirmadas por testes bioquímicos e aglutinação com antissoro somático (PROBAC).

A estimativa da população de *Vibrio parahaemolyticus* foi realizada por meio da técnica do Número Mais Provável (NMP) em três séries de três tubos contendo água peptonada alcalina (APW - pH 8,5 \pm 0,2, contendo 3% de NaCl). Todos os tubos foram incubados a 37 °C por 24h. Após, alíquotas dos caldos foram semeadas em Ágar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose (TCBS, Merck) e incubadas a 35 \pm 2 °C por 24h. Colônias presuntivas de *V. parahaemolyticus* foram submetidas à prova de oxidase e provas bioquímicas de acordo com Brasil¹⁷.

Os dados obtidos foram analisados por estatística descritiva com distribuição de frequência absoluta e relativa dos micro-organismos pesquisados. Para avaliar a associação entre os restaurantes e o percentual de contaminação por coliformes a 45 °C foi aplicado o teste Qui-quadrado de Pearson, e as associações encontradas foram avaliadas pelo teste dos resíduos ajustados. Além disso, foi aplicado o coeficiente de correlação de Spearman para avaliar as associações entre o percentual de contaminação por coliformes a 45 °C e a temperatura do pescado. O nível de significância adotado foi de 5% ($p \leq 0,05$) e as análises foram realizadas no programa SPSS versão 17.0¹⁸.

RESULTADOS

O percentual de conformidade geral dos restaurantes vistoriados variou de 80,65% (restaurante D) a 60,22% (restaurante C). Nenhum dos restaurantes apresentou condições higiênico-sanitárias inadequadas na avaliação global dos itens, de acordo com a metodologia utilizada. Três deles (A, D e E) foram considerados adequados e os demais (B, C e F) foram aprovados com restrições. Dentre os itens considerados adequados em todos os restaurantes estiveram os relativos ao abastecimento de água e ao armazenamento e transporte do alimento preparado, seguidos dos itens relacionados aos manipuladores e exposição ao consumo dos alimentos preparados, com apenas um restaurante adequado com restrição.

Tabela 1. Escore de adequação das condições higiênico-sanitárias à legislação vigente dos restaurantes japoneses (licenciados) de Porto Alegre, por bloco analisado e temperatura média aferida (°C) no salmão utilizado para as preparações de *sashimi*

Restaurante	Blocos								Temperatura do pescado (°C)
	i	ii	iii	iv	v	vi	vii	viii	
A	I	A	A	A	A	AR	A	A	5,5
B	AR	AR	I	A	AR	AR	A	AR	7,2
C	I	A	AR	A	A	I	A	A	8,6
D	A	A	AR	A	A	A	A	A	12,8
E	A	AR	A	A	A	AR	A	A	7,0
F	A	I	I	A	A	AR	A	A	7,6

Legenda: A - Adequado (>75% itens adequados), AR - Adequado com Restrição (50-75% itens adequados), I - Inadequado (<50% itens adequados)

Blocos: i - edificação, instalações, equipamentos, móveis e utensílios; ii - higienização de instalações, equipamentos, móveis e utensílios; iii - controle integrado de pragas/manejo de resíduos; iv - abastecimento de água; v - manipuladores; vi - controle de temperatura e do tempo, matérias-primas, ingredientes e embalagens/preparação do alimento; vii - armazenamento e transporte do alimento preparado; viii - exposição ao consumo do alimento preparado

A aplicação do *check-list* demonstrou que os blocos onde se verificaram as condições mais deficitárias foram os referentes ao controle da temperatura e do tempo, matérias-primas, ingredientes e embalagens/preparação do alimento; controle integrado de pragas/manejo de resíduos; edificação, instalações, equipamentos, móveis e utensílios; e higienização de instalações, equipamentos, móveis e utensílios.

Todos os restaurantes mantinham o pescado em temperaturas de armazenamento em desacordo com a legislação vigente (≤ 5 °C). A temperatura média encontrada e a análise dos restaurantes quanto à adequação plena, com restrição ou inadequação em cada um dos blocos, pode ser observada na Tabela 1.

Os resultados das 108 análises microbiológicas das amostras de *sashimi* colhidas em restaurantes especializados em culinária japonesa em Porto Alegre indicaram condições microbiológicas satisfatórias para estafilococos coagulase positiva, *Vibrio parahaemolyticus* e *Salmonella* sp.

Vinte e cinco por cento (27/108) das amostras de *sashimis* coletadas nos seis estabelecimentos apresentaram contagem de coliformes a 45 °C acima do limite estabelecido, sendo consideradas em condições microbiológicas insatisfatórias de acordo com a referida legislação¹⁵ e, assim, impróprias para o consumo. Houve diferença significativa ($p < 0,001$) na contagem de coliformes a 45°C nos diferentes estabelecimentos, sendo o restaurante D o que apresentou o maior número de amostras não conformes (Tabela 2).

Houve associação positiva ($r_s = 0,928$; $p = 0,008$) entre a temperatura aferida no pescado com o percentual de amostras com número de coliformes termotolerantes acima do previsto na legislação.

DISCUSSÃO

Os procedimentos adequados observados no bloco v, relativo aos manipuladores, corroboram com a baixa contagem de estafilococos coagulase positiva encontrada nos *sashimis*, provavelmente por reflexo de uma higiene pessoal apropriada. Todo manipulador pode transferir patógenos a qualquer tipo de alimento, mas isso pode ser evitado por meio de higiene pessoal e manipulação adequada¹⁹. O *sashimi* recebe uma intensiva manipulação durante seu preparo, propiciando maior contaminação e relatos da detecção de amostras de alimentos da culinária japonesa com contagens de estafilococos coagulase positiva acima do permitido na legislação são frequentes em nosso país^{3,9,20,21}. Entretanto, nos estudos citados, ao contrário do presente estudo, foram analisadas amostras provenientes de restaurantes não especializados em culinária japonesa e de preparações servidas em *buffet*, o que pode ter propiciado a manipulação inadequada, a contaminação cruzada, a inadequada temperatura de exposição e a proliferação de bactérias.

A mesma situação não foi observada em relação aos coliformes a 45 °C nas amostras de *sashimi* analisadas, uma vez que 25% delas apresentavam contagem acima do permitido pela legislação vigente. Contagens de

coliformes termotolerantes acima do permitido também foram relatadas em *sushis* e *sashimis* comercializados nas cidades de Brasília, Recife e Fortaleza²²⁻²⁴. Outros estudos, também conduzidos no Brasil, relatam percentuais de amostras contaminadas ainda mais elevados, entre 47,5 e 60%^{3,24,25}, evidenciando que existem problemas durante o processo, tanto na qualidade da matéria-prima como no seu preparo e conservação.

Relacionando os resultados laboratoriais com os dados coletados na aplicação do *check-list*, foi possível observar que os itens constantes nos blocos com maior frequência de inadequações foram os relativos ao controle da temperatura do pescado e aqueles referentes à higiene dos estabelecimentos e à adequação no armazenamento das matérias-primas.

Cabe ressaltar que todos os restaurantes mantinham o pescado em temperaturas em desacordo com a legislação vigente, sendo que somente três estabelecimentos possuíam termômetro e apenas um (16,6%) realizava controle das temperaturas nas etapas de recepção e armazenamento, o que caracteriza falhas no controle de qualidade dos estabelecimentos.

Nesse sentido, quando se analisou a relação entre a temperatura aferida no pescado com as amostras com contagem de coliformes a 45 °C acima do previsto na legislação, uma associação positiva ($r_s = 0,928$; $p = 0,008$) pôde ser demonstrada, evidenciando que esse foi o provável fator determinante da alteração no padrão microbiológico. De forma similar, Martins³ também observou associação ($p = 0,0415$) entre a contagem de coliformes termotolerantes e a temperatura de exposição de *sushis* e *sashimis* comercializados em São Paulo.

Tabela 2. Número e percentual de amostras de sashimi, com contagem de coliformes termotolerantes acima do permitido na legislação vigente ($>10^2$ UFC/g), colhidas em seis restaurantes de comida japonesa no município de Porto Alegre/RS, 2009–2010

Restaurante	Número de amostras	% de amostras
	fora dos padrões	fora dos padrões*
A	0	0
B	2	11,11
C	6	33,33
D	11	61,11
E	0	0
F	8	44,44
Total	27/108	25

* *Legenda:* Percentual calculado considerando o total de 18 amostras coletadas por restaurante

A contaminação, inicial ou cruzada, associada ao abuso de temperatura observada, pode resultar no aumento do número de bactérias indicadoras ou patogênicas, uma vez que todas podem se multiplicar em peixes crus. Por essa razão, a conservação do peixe em temperatura menor que 5 °C é essencial, sendo essa uma das medidas mais importantes de prevenção da multiplicação bacteriana⁴.

A contaminação do pescado por coliformes pode ocorrer tanto na captura e transporte, como durante o processamento efetuado nos restaurantes, sendo de grande importância a sua adequada higienização. De acordo com os dados observados no estudo, pôde-se verificar que todos os restaurantes apresentaram itens em desacordo, sendo a higiene deficiente dos móveis, utensílios e equipamentos um ponto frequentemente observado, além do uso de panos não descartáveis pelos “sushimen” durante a manipulação dos alimentos, fato observado em 100% dos restaurantes analisados. Bartz²⁶, avaliando a contaminação microbiológica e métodos de higienização de panos de limpeza utilizados em serviços de alimentação, verificou a presença de bactérias, como coliformes, nesses panos e, ainda, que estes foram capazes de transferir bactérias de forma significativa para superfícies. A ausência de cuidado verificada em relação aos panos, no presente estudo, pode ser mais um fator responsável pela contaminação cruzada no ambiente de manipulação.

Ainda que haja risco, como demonstrado pela presença de indicadores sanitários fora dos parâmetros aceitáveis, não foram encontrados *Salmonella* sp. e *V. parahaemolyticus* nas amostras analisadas. Em relação à *Salmonella* sp., a maioria dos surtos tem sido relacionada ao consumo de ovos e carne de ave²⁷⁻²⁹. Pesquisas dessa bactéria em *sushi* e *sashimi* no Brasil e em outros países^{3,10,29} não revelaram seu isolamento, ou o fizeram em baixa frequência. Por outro lado, relatos apontam a presença de 12,2% de amostras positivas para este patógeno em pescados consumidos crus³⁰ e 18,75% em amostras de *sashimi* colhidas em restaurantes⁹, demonstrando que existe risco de veiculação por esse tipo de alimento.

No caso de *V. parahaemolyticus*, ao contrário, o relato de isolamento é frequente em pescado. Lake¹¹ encontrou positividade em 83% das amostras analisadas na Nova Zelândia, enquanto no Japão 23% de amostras de *sashimi* tiveram isolamento de *V. Parahaemolyticus*³¹. No Brasil, a bactéria vem sendo isolada em frutos do mar, porém relatos em *sashimi* ainda são escassos. Pereira et al.¹² encontraram *V. parahaemolyticus* em 11,6% (10/86) das amostras de mexilhões. Vieira et al.³² encontraram 50%

(45/90) das amostras positivas para *Vibrio* spp. em carne de caranguejos, sendo 8,8% (8/90) delas *V. parahaemolyticus*. Chen³³ isolou o micro-organismo em 2,68% das amostras de pescado coletadas no município de São Paulo. Santos¹³ isolou espécies de *Vibrio* sp. potencialmente patogênicas em 15% das amostras de peixe coletadas em mercados municipais da cidade de São Paulo.

Práticas higiênicas eficientes são necessárias em cada passo da cadeia alimentar, desde a produção até o consumo dos alimentos. Cada etapa pode influenciar a qualidade e a segurança dos alimentos. Ao lado disso, os cuidados com a cadeia fria de conservação de produtos perecíveis são fundamentais para manter as populações bacterianas abaixo das doses infectantes para o consumidor. Nos casos dos alimentos consumidos crus, como aqueles que compõem a culinária japonesa, esses aspectos são ainda mais relevantes e devem ser controlados pela adoção de Boas Práticas de Fabricação e monitorados pelas autoridades sanitárias.

CONCLUSÃO

De acordo com o preconizado pela legislação vigente, 75% das amostras de *sashimis* analisadas foram consideradas em condições sanitárias satisfatórias. As amostras restantes (25%) apresentaram coliformes termotolerantes acima dos limites tolerados, tendo este resultado associação significativa com a temperatura aferida no pescado.

O controle do binômio tempo-temperatura do pescado e a higienização de equipamentos e superfícies apresentaram os maiores índices de inconformidades, portanto recomenda-se que os restaurantes e as autoridades sanitárias reforcem o monitoramento e controle desses itens.

REFERÊNCIAS

1. Basti AA, Misaghi A, Salehi TZ, Kamkar A. Bacterial pathogens in fresh, smoke and salted Iranian fish. *Food Control*. 2006;17:183-8. [acesso 2010 abr 16]. Disponível em: [http://www.sciencedirect.com/science/journal].
2. Germano PML, Germano MIS, Oliveira CAF. Aspectos da qualidade do pescado de relevância em saúde pública. *Rev Hig Aliment*. 1998;12(53):30-7.
3. Martins FO. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de preparações (*sushi* e *sashimi*) a base de pescado cru servidos em bufês na Cidade de São Paulo. [dissertação de mestrado]. São Paulo (SP): Faculdade de Saúde Pública, USP; 2006.
4. Huss HH, Reilly A, Embarck PK. Prevention and control of hazards in seafoods. *Food Control*. 2000;11:149-56.
5. Millard G, Rockliff S. Microbiological quality of *sushi*. In: Health Services – Food Survey Reports 2000- 2003. Austrália, 2003. [acesso 2010 abr 20]. Disponível em: [http://www.health.act.gov.au/c/health?a=da&did=10060511&pid=1094601516].
6. Mohamed Hatha AA, Lakshmanaperumalsamy P. Prevalence of Salmonella in fish and crustaceans from markets in Coimbatore, South India. *Food Microbiol*. 1997;14:111-6.
7. Lee WC, Sakai T, Hamakawa M, Lee SM, Lee IM. An epidemiological study of food poisoning in Korea and Japan. *Int J Food Microbiol*. 1996;29:141-8.
8. Germano PML, Germano MIS. Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos. 3ª ed. Barueri (SP): Manole; 2008.
9. Vieira RHSE, Silva CM, Carvalho FCT, Souza DBR, Menezes FGR, Reis EMF et al. *Salmonella* e *Staphylococcus* coagulase positiva em *sushi* e *sashimi* preparados em dois restaurantes da cidade de Fortaleza, Ceará. *Bol Tecn Cient CEPENE*. 2007;15(1):9-14.
10. Hksar. *Sushi* and *sashimi* in Hong Kong. Food and Environmental Hygiene Department, Risk Assessment Studies, Report n.2, 31 p., Hong Kong, 2000.
11. Lake R, Hudson A, Cressey P. Risk Profile: *Vibrio parahaemolyticus* in seafood. Institute of Environmental Science & Research Limited Christchurch Science Centre. New Zealand Food Safety Authority. 2003. [acesso 2009 set 20]. Disponível em: [www.esr.cri.nz].
12. Pereira CS, Possas CA, Viana CM, Rodrigues DP. Características de *Vibrio parahaemolyticus* isolados de mexilhões (*Perna perna*) comercializados em Niterói, Rio de Janeiro. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007;40(1):56-9.
13. Santos, RM. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de peixes comercializados em mercados municipais da cidade de São Paulo, SP. [dissertação de mestrado]. São Paulo (SP): Faculdade de Saúde Pública, USP; 2006.
14. Bolsson BC, Kindlein L, Vallandro M, Born LC. Avaliação Higiênico-Sanitária de restaurantes japoneses no município de Porto Alegre. *Rev Ciênc Tecnol Prod Orig Anim*. 2009;2(1):10-7.
15. 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. [acesso 2009 mai 25]. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br].
16. Silva N da, Junqueira VCA, Silveira NFA. Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos. 2ª ed. São Paulo (SP): Varela; 2001.
17. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. [acesso 2009 Nov 13]. Disponível em: [http://www.agricultura.gov.br].
18. SPSS 17.0. Statistical Analysis Software. Chicago: SPSS inc, 2007.
19. Organização Pan-Americana da Saúde. HACCP: Ferramentas Essenciais para Inocuidade dos Alimentos. Buenos Aires, Argentina: OPAS/INPPAZ; 2005.
20. Albuquerque WF, Barreto NSE, Silva AIM, Vieira RHSE. Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* e Estafilococos coagulase positivo, em *sushis* comercializados em alguns estabelecimentos de Fortaleza-CE. *Rev Hig Alim*. 2006;20(116):58-61.

21. Resende A, Souza JR, Oliveira YS. Análise microbiológica de *sushis* e *sashimis* comercializados em restaurantes de Brasília no período de 2001 a 2004. *Hig Alim*. 2009;23:164-70.
22. Lima RMT, Shinohara NKS, Siqueira LP, Lima RCT, Pires EF, Ximenes GNC et al. Avaliação microbiológica de *sushis* e *sashimis* comercializados na cidade do Recife-PE. Pernambuco, 2009. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. [acesso 2010 Abr 25]. Disponível em: [<http://www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/resumos/R0620-1.pdf>].
23. Pinheiro HMC, Vieira RHSE, Carvalho FCT, Reis EME, Sousa OV, Vieira GHF, et al. Salmonella sp. e Coliformes Termotolerantes em *Sushi* e *Sashimi* comercializados na cidade de Fortaleza-Ceará. *Bol Tecn Cient CEPENE*. 2006;1(1):23-31.
24. Dias ED. Avaliação microbiológica e análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC) do *sushi* e *sashimi* consumidos nos restaurantes do município do Rio de Janeiro. *Rev Hig Alim*. 1999;13:81.
25. Muratori MCS, Costa Amilton PR, Viana CM. Qualidade sanitária de pescado "in natura". *Hig Alim*. 2004;18:116-7.
26. Bartz S. Contaminação microbiológica e avaliação de métodos de higienização de panos de limpeza utilizados em serviços de alimentação. [dissertação de mestrado]. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2008.
27. Carmo GMI, Dimech CPN, Alves RMS. Vigilância dos surtos de doenças transmitidas por alimentos, Brasil, 1999 – 2006. *Rev Hig Alim*. 2007;21(150):353-4.
28. Costalunga S, Tondo EC. Salmonellosis in Rio Grande do Sul, Brazil, 1997 to 1999. *Braz J Microbiol*. 2002;33:342-6.
29. EFSA (European Food Safety Authority). The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2006. *EFSA J*. 2007:130.
30. Heinitz ML, Rublo RD, Wagner DE, Tatini SR. Incidence of *Salmonella* in fish and seafood. *J Food Prot*. 2000;63(5):579-92.
31. CCFH (Codex Committee on Food Hygiene). Discussion paper on risk management strategies for *Vibrio* spp. in seafood. CX/FH 03/5-Add.3. Orlando, USA, 2002. [acesso 2009 Nov 10]. Disponível em: [<ftp://ftp.fao.org/codex/ccfh35/fh0305ce.pdf>].
32. Vieira RHSE, Lima EA, Souza DBR, Reis EF, Rodrigues DP. *Vibrio* spp. e *Salmonella* spp. em caranguejos, *Ucides cordatus*. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2004b;46(4).
33. Chen J. Pesquisa de *Vibrio parahaemolyticus* em atum (*Thunnus* spp) comercializado na zona sul do município de São Paulo – SP. [dissertação de mestrado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2004.

Avaliação da qualidade microbiológica no processamento de pescados

Evaluation of microbiological quality in fish processing industry

RIALA6/1357

Consuelo Lima SOUSA^{1*}, José de Arimatéia FREITAS², Lúcia de Fátima Henriques LOURENÇO¹, Eder Augusto Furtado ARAUJO¹, Jesus Nazareno Silva de SOUZA¹

*Endereço para correspondência: ¹Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Instituto de Tecnologia, Universidade Federal do Pará, Avenida Perimetral s/n, Guamá, Belém/PA, Brasil. CEP 66075-110. Caixa postal 479. Tel.: 91 3201-1293. Fax: 91 3201-7456. E-mail: sousa@ufpa.br.

²Universidade Federal do Pará – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Universidade Federal Rural da Amazônia.
Recebido: 25.02.2011 – Aceito para publicação: 30.06.2011

RESUMO

Foram avaliadas as condições higiênico-sanitárias de uma indústria de processamento de pescados, analisando-se 170 amostras de superfícies (equipamentos, utensílios e luvas), coletadas por meio de *swab* em dois períodos do dia (no início da manhã e da tarde). Em cada período foram coletadas cinco repetições de amostras em dias diferentes. Foram realizadas contagens de mesófilos aeróbios e de coliformes totais; e a presença ou ausência de coliformes termotolerantes foi posteriormente confirmada. A contagem média de mesófilos aeróbios variou entre amostras de superfícies, e a maioria mostrou diferença significativa ($p < 0,05$) entre o período e dia de coleta. Das amostras coletadas de equipamentos e utensílios, 42% apresentaram resultados não conformes segundo a recomendação da OPAS de 1,70 log UFC/cm² para mesófilos aeróbios e ausência de coliformes a 45°C. Das amostras não conformes, corresponderam àquelas coletadas no turno da tarde. As contagens de mesófilos aeróbios variaram de 3,3 a 6,8 log UFC/amostra de luva, com diferença significativa ($p < 0,05$) entre os dois períodos de coleta; e coliformes totais variaram de 2,6 a 3,8 log UFC/luva. A ausência de higienização adequada detectada no ambiente de processamento de pescado indica que ela seja resultante da incorreta aplicação dos Procedimentos-Padrão de Higiene Operacional.

Palavras-chave. higienização, análise microbiológica, superfícies, manipuladores.

ABSTRACT

For evaluating the sanitary conditions of a fish processing industry 170 samples were collected from surface areas (equipment, utensils and gloves). Samples were collected twice per day, in the morning and in the afternoon. At each period, five samples replicates were collected at different days using swab. Aerobic mesophilic and coliform group countings were performed, and fecal coliform presence or absence was subsequently confirmed. The average counts of aerobic mesophiles varied depending on the surfaces types, mostly showing significant difference ($p < 0.05$) among the period and day of samples collection. Of samples from equipment and utensils surfaces, 42% showed noncompliant results with the PAHO recommendations of 1.70 log CFU/cm² for aerobic mesophiles and coliforms absence at 45°C. Of nonconforming result, 67% were detected in samples collected in the afternoon. Aerobic mesophiles counts ranging from 3.3 to 6.8 log CFU/glove were found in sample from glove, with a significant difference ($p < 0.05$) among those from two collection periods. For total coliforms the variation was from 2.6 to 3.8 log CFU/glove. The inadequate sanitation quality found in this study in a food processing environment implies that it might resulted from not applying the accurate Hygiene Standard Operating Procedures.

Keywords. hygiene, microbiological analysis, surfaces, handlers.

INTRODUÇÃO

Os pescados estão entre os produtos de origem animal mais suscetíveis à deterioração, devido ao pH próximo da neutralidade, à elevada atividade de água nos tecidos e aos altos teores de nutrientes. Além disso, os métodos de captura, que provocam morte lenta, contribuem para a rápida decomposição, ocasionando muitos problemas para a conservação. Outro fator importante que acelera o início da deterioração se refere aos inúmeros micro-organismos presentes na água, bem como a microbiota natural, localizada principalmente nos intestinos, brânquias e muco superficial dos pescados^{1,2}.

Além da contaminação primária do pescado, o manuseio após a captura, representado pelas etapas de beneficiamento, conservação e armazenamento é referido como o fator determinante da qualidade do produto final^{3,4}. Outro fator que corrobora para a ocorrência da contaminação é a deficiência no processo de sanitização dos equipamentos e utensílios utilizados nas diversas etapas do processamento⁵⁻⁷.

A contaminação de equipamentos e utensílios por micro-organismos deve ser causa de preocupação na indústria de alimentos, e isso deve ser um dos argumentos decisivos na escolha do tipo de material que compõe os mesmos. Além das propriedades mecânicas e anticorrosivas, deve ser avaliada a facilidade de higienização⁸⁻¹⁰.

As superfícies em uma indústria de alimentos podem representar fontes de contaminação quando não higienizadas adequadamente, muitas vezes, iniciando processos de adesão a partir de partículas de sujidades e de micro-organismos não removidos pelos procedimentos corretos de higienização, podendo levar à formação de biofilmes¹¹⁻¹³.

Deve-se considerar também, o contato direto dos alimentos com os manipuladores da linha de processamento, que por apresentarem higiene pessoal inadequada podem ser veiculadores de patógenos, fator comumente reportado como causa de doenças transmitidas pelos alimentos^{14,15}. Diversos autores têm reportado a ocorrência elevada de micro-organismos em superfícies de bancadas, equipamentos, utensílios e mãos de manipuladores, em áreas de processamento de alimentos, demonstrando deficiência nos procedimentos de higienização¹⁶⁻²¹.

As operações de limpeza e desinfecção, apesar de serem essenciais para a obtenção de alimentos

inócuos e de boa qualidade, são muitas vezes relegadas para segundo plano, nem sempre sendo reconhecida a relação custo-benefício, dado que os resultados desta atividade não são facilmente mensuráveis em termos de benefícios econômicos. Por isso, este trabalho teve como objetivo avaliar as condições higiênico-sanitárias de diversas superfícies (equipamentos, utensílios e luvas de manipuladores) utilizadas no processamento de peixes em indústria localizada no nordeste do Estado do Pará.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Foram avaliadas superfícies (Tabela 1), utilizadas no processamento de peixe em uma indústria de pescado, situada no Município de São João de Pirabas, localizado no nordeste paraense. A coleta foi realizada em três ambientes de processamento: plataforma de recepção (basquetas em polipropileno); salão de produção (duas máquinas de retirada de pele, cestos em polipropileno, tábuas em polietileno, bandejas em polipropileno, mesa de arrumação em inox, facas em inox e luvas de látex de três manipuladores) e sala de embalagem (filmes em PVC, mesa de embalagem em inox, tanque de embalagem em inox e luvas de látex de três manipuladores).

A amostragem das superfícies foi realizada em dois períodos no mesmo dia: no início do turno da manhã e da tarde, antes de serem utilizadas no processamento, sendo coletadas 170 amostras para avaliação. Estes períodos foram estabelecidos em função de a higienização das áreas de processamento, equipamentos e alguns utensílios da indústria ser realizada duas vezes ao dia, no intervalo das 11h às 13h (almoço) e no final do expediente (18h), para serem utilizados no processamento do turno da manhã seguinte, por equipe específica.

Em cada período foram realizadas cinco coletas de cada superfície, em dias diferentes. Por coleta, as superfícies foram analisadas individualmente (duas máquinas de retirada de pele, duas mesas e um tanque) ou em lotes de cinco unidades por superfície (cestos, tábuas, bandejas, basquetas, filmes em PVC e facas) (Tabela 1). Em relação às luvas de látex, foram avaliados seis pares por coleta, escolhidos de forma aleatória e considerados higienizados pelos próprios manipuladores. Também foi observada a rotina da indústria, o comportamento dos funcionários durante o período de estudo e os Procedimentos-Padrão de Higiene Operacional (PPHO) aplicados.

Tabela 1. Superfícies analisadas, número de amostras, tipo de coleta e área total amostrada para a avaliação microbiológica em uma indústria de processamento de pescados

	Superfícies analisadas	n	Coleta*	Área total amostrada
Equipamentos	Máquina de retirada de pele 1 (inox)	5	Unidade	100 cm ²
	Máquina de retirada de pele 2 (inox)	5	Unidade	100 cm ²
Utensílios	Cesto em polietileno	5	Lote	500 cm ²
	Filme em PVC	5	Lote	150 cm ²
	Tábuas polietileno	5	Lote	500 cm ²
	Bandejas em polietileno	5	Lote	500 cm ²
	Basquetas em polietileno	5	Lote	500 cm ²
	Mesa de embalagem (inox)	5	Unidade	200 cm ²
	Mesa de arrumação (inox)	5	Unidade	200 cm ²
	Tanque de embalagem (inox)	5	Unidade	200 cm ²
	Facas (inox)	5	Lote	Superfície
	Manipulador	Luvas de látex	6	Par

n: nº de amostras por período. * Um lote corresponde à coleta em 5 unidades

Métodos

A técnica do *swab* foi utilizada para a coleta das amostras das superfícies (equipamentos e utensílios), adotando procedimento descrito no Compendium of Methods for the Microbiological Examinations of Foods²². Foram utilizados *swabs* estéreis de algodão de 0,5 cm de diâmetro por 2 cm de comprimento, com haste de 12 cm de comprimento. Após ser umedecido em solução diluente (água peptonada 0,1% estéril), o *swab* foi friccionado por três vezes no sentido vai-e-vem em uma área não inferior a 30 cm² (superfície teste), ou na área total da superfície que entrava em contato com o alimento. Em algumas superfícies (utensílios), a coleta foi feita em lotes de cinco unidades de cada utensílio, e o resultado expresso como a média das cinco unidades, e em outras, em duas áreas de uma mesma superfície (Tabela 1).

Nas luvas a área de análise ocorreu na superfície da palma e das bordas, partindo da região dos punhos. De forma angular, o *swab* foi passado, com movimentos giratórios, da parte inferior da palma até a extremidade dos dedos e voltando ao punho, repetindo-se esse procedimento três vezes na direção de cada dedo. Os movimentos nas bordas foram do tipo vai-e-vem, de modo a avançar em um dos lados da mão onde as linhas dos punhos iniciavam, passando depois entre os dedos e, no final, no outro lado da mão, encontrando-se de novo com as linhas dos punhos^{14,23}.

Após a amostragem, os *swabs* foram colocados em tubos de ensaio contendo 10 mL de água peptonada

com 1% de tiosulfato de sódio a 0,25%. Os tubos foram tampados, identificados e transportados sob refrigeração ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos da UFPA para as análises microbiológicas.

Em todas as amostras, foi realizada a contagem de micro-organismos mesófilos aeróbios em Ágar-Padrão para Contagem (PCA) e de coliformes totais em Ágar Vermelho Violeta Bile (VRB) com posterior confirmação da presença ou ausência de coliformes termotolerantes utilizando a metodologia descrita no Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods²⁴. Todas as análises foram feitas em triplicata.

Os resultados das contagens, expressos em logaritmos de unidade formadora de colônia por cm² ou por superfície (log UFC/cm² ou log UFC/superfície), foram avaliados com o auxílio do programa Statistica® versão 5.025, empregando as seguintes metodologias: Análise de variância (ANOVA), segundo o teste F e Teste de Tukey, todos a p<0,05²⁵.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A Tabela 2 apresenta os resultados das análises microbiológicas realizadas nas superfícies da indústria de processamento de pescados avaliada. Constatou-se que, apesar de a indústria possuir produtos de higienização adequados e todos os Procedimentos-Padrão de Higiene Operacional (PPHO) serem descritos corretamente, estes na maioria das vezes não

Tabela 2. Resultados das análises microbiológicas (contagem de mesófilos aeróbios e presença/ausência de coliformes termotolerantes) realizadas sobre diversas superfícies em uma indústria de processamento de pescados

Superfícies (equipamentos e utensílios)	Mesófilos aeróbios ¹ (log UFC/cm ²)		Coliformes termotolerantes ²	
	Manhã	Tarde	Manhã	Tarde
Máquina de retirada de pele 1	2,52 ± 1,56 ^a	4,15 ± 3,30 ^b	A	P
Máquina de retirada de pele 2	2,54 ± 1,67 ^a	4,18 ± 3,42 ^b	A	P
Cestos	1,49 ± 0,85 ^a	5,32 ± 4,50 ^b	A	A
Filme em PVC	1,56 ± 0,83 ^a	4,98 ± 3,71 ^b	A	P
Tábuas	1,27 ± 0,81 ^a	1,62 ± 0,87 ^a	A	A
Bandejas	0,41 ± 0,40 ^a	1,76 ± 0,68 ^b	A	P
Basquetas	0,38 ± 0,34 ^a	1,17 ± 0,62 ^b	A	A
Mesa de arrumação	0,41 ± 0,32 ^a	0,89 ± 0,62 ^b	A	A
Mesa de embalagem	0,94 ± 0,65 ^a	1,36 ± 0,83 ^b	A	A
Tanque de embalagem	0,51 ± 0,47 ^a	1,00 ± 0,49 ^b	A	A
Facas ³	3,65 ± 2,72 ^a	3,88 ± 2,69 ^a	P	P

¹ média ± desvio-padrão (n = 5). ² P: presença e A: ausência. ³ UFC/utensílio.

Letras minúsculas diferentes na mesma linha têm diferença significativa

eram aplicados de forma adequada, devido à elevada carga de mesófilos aeróbios e à presença de coliformes termotolerantes encontrados em algumas superfícies, na maioria com diferença significativa ($p < 0,05$) entre o período e dia de coleta. A variação nos procedimentos de higienização pode ser a justificativa para os elevados desvios-padrão encontrados nas análises de todas as superfícies, no presente estudo.

O não cumprimento dos PPHO na íntegra pode acarretar na variação da contagem de micro-organismos, podendo comprometer a qualidade higiênico-sanitária dos alimentos^{23,26,27}. Observou-se durante o expediente que, apesar de alguns utensílios, como cestos, filmes de PVC, bandejas e facas, serem higienizados em áreas específicas, o sanitizante não era diluído corretamente ou não era utilizado.

Verificou-se que a higienização no final do expediente seguia os PPHO completos (lavagem + sanitização) para cada tipo de superfície. Entretanto, a higienização no intervalo do almoço consistia apenas na lavagem das superfícies com jato de água. O uso de detergente e sanitizante, neste período, ficava condicionado à ausência de matéria-prima e/ou produtos na linha de processamento, o que raramente acontecia. Provavelmente em função desse procedimento, os maiores níveis de contaminação em todas as superfícies foram encontrados para as amostras coletadas no turno da tarde, sendo significativamente superiores ao período da manhã ($p < 0,05$).

Na legislação brasileira não há parâmetros microbiológicos oficiais para superfícies de equipamentos e utensílios utilizados no processamento de alimentos, bem como para as mãos de manipuladores. Os padrões da American Public Health Association (APHA) consideram como equipamentos e utensílios limpos aqueles que possuem menos de 100 UFC/utensílio ou 2 UFC/cm²¹². Entretanto, em países em desenvolvimento existe uma dificuldade na adequação das indústrias aos padrões americanos. Dessa forma, alguns pesquisadores e instituições, como a Organização Pan-americana da Saúde (OPAS), recomendam contagens de até 50 UFC/cm² para mesófilos aeróbios e ausência de *Bacillus cereus*, de *Salmonella* e de coliformes termotolerantes em superfícies, em razão, principalmente, das temperaturas ambientais desses países^{14,28}. Neste trabalho, para efeito de comparação, foi adotada a recomendação da OPAS de 1,70 log UFC/cm² (50 UFC/cm²), para mesófilos aeróbios, e ausência de coliformes termotolerantes para superfícies de equipamentos e utensílios.

Do total de amostras das superfícies de equipamentos e utensílios analisadas, independentemente do período, 42% estavam fora da recomendação estabelecida pela OPAS, sendo 27% para mesófilos aeróbios e coliformes termotolerantes e 15% somente para mesófilos aeróbios. Dentre as amostras fora do padrão, 67% foram detectadas no período da tarde. Pires et al.¹⁸, Oliveira et al.²⁰ e Coelho et al.²¹ detectaram cerca de 100% de equipamentos e utensílios acima da

recomendação da OPAS quando analisaram fatiadores de frios, máquinas de moer carne e diferentes tipos de superfícies em restaurante comercial.

Contagens elevadas de micro-organismos, após higienização, indicam a deficiência nos PPHO e podem levar à formação de biofilme, que não é eliminado facilmente por um único processo de higienização, mesmo este sendo correto e adequado^{13,15,29}. O contato com superfícies contaminadas pode comprometer a qualidade microbiológica dos alimentos, especialmente se forem consumidos crus ou se o tratamento térmico não for adequado para inativação de células vegetativas ou toxinas bacterianas eventualmente presentes.

A presença de coliformes termotolerantes em ambientes, superfícies ou produtos alimentícios evidencia informações sobre as condições higiênico-sanitárias e pode ser indicadora da possível presença de patógenos¹². Santos et al.³⁰ isolaram e quantificaram bactérias do grupo coliformes de utensílios e equipamentos higienizados e não higienizados, de duas linhas de processamento de pescado em Fortaleza-CE, alertando para a resistência desses micro-organismos, principalmente *E.coli*, para os compostos clorados.

As superfícies dos equipamentos das máquinas de retirada de pele 1 e 2 apresentaram contagens elevadas de mesófilos aeróbios, variando de 2 a 4 log UFC/cm² em todos os dias de coleta; também foi detectada a presença de coliformes a 45 °C nas amostras coletadas no turno da tarde (Tabela 2). Isto pode ter ocorrido nesses equipamentos devido à irregularidade da superfície da lâmina, que exige maiores cuidados durante a higienização por apresentar reentrâncias, que possibilitam o acúmulo de resíduos orgânicos e dificultam a limpeza e a ação do agente sanificante frente aos micro-organismos, podendo proporcionar a formação de biofilmes. Neste caso, antes da limpeza, seria necessário desmontar os equipamentos, com o propósito de uma higienização mais adequada^{26,27}.

Carrillo et al.¹⁷ e Pires et al.¹⁸ encontraram resultados iguais aos desta pesquisa, contagens de aeróbios mesófilos variando de 2 a 4 log UFC/cm², quando analisaram equipamentos de armazenamento de leite e de fatiadores de frios, respectivamente. Valores mais elevados (5 log UFC/cm²) foram obtidos por Oliveira et al.²⁰, quando avaliaram máquinas de moer carne. Esses autores, também, consideraram que os altos níveis de contaminação encontrados estavam relacionados com a dificuldade de realizar a limpeza em razão da dificuldade de desmonte e

de cantos de difícil acesso dos equipamentos, dificultando a retirada dos resíduos.

Segundo Aarnisalo et al.¹⁹, os problemas de higiene com os equipamentos de processamento de alimentos são causados principalmente pelo *design* inadequado. Os equipamentos devem ser projetados de forma que se facilite a limpeza, sanitização, inspeção e manutenção.

Dentre os utensílios analisados, os maiores níveis de contaminação de mesófilos aeróbios e presença de coliformes a 45 °C foram encontrados nos cestos, filmes de PVC, facas e bandejas (Tabela 2), sendo que as facas não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$) para os micro-organismos pesquisados nos dois períodos. Os resultados indicam a inadequação dos métodos de higiene utilizados e/ou a diferença na intensidade da ação mecânica exercida pelos funcionários durante a limpeza. Outro fator que deve ser levado em consideração é que esses utensílios, com exceção das facas, eram feitos totalmente de material plástico, sendo, por isso, mais favoráveis à adesão de micro-organismos, devido à porosidade do material^{8,9} e por apresentarem superfícies desgastadas, dificultando sua higienização.

Dentre as superfícies analisadas, somente para tábuas e basquetas (caixas plásticas tipo monobloco) foi observada a aplicação correta dos PPHO durante todo o período de coleta. Esse comportamento pode explicar os menores níveis de contaminação de aeróbios mesófilos ($< 1,70$ log UFC/cm²), ainda que os utensílios citados fossem de material plástico. Resultados diferentes foram encontrados por Vargas e Quintaes⁶, que detectaram micro-organismos patogênicos e deteriorantes na superfície interna do fundo de caixas plásticas de transporte de pescado.

Nas mesas de arrumação e embalagem e no tanque de embalagem, também, foram detectadas baixas contagens de micro-organismos (Tabela 2), mesmo no segundo período, quando só eram lavadas com jato de água. Esses resultados podem estar relacionados ao tipo de material (aço inoxidável), e às perfeitas condições das superfícies, que permitiam uma higienização ou limpeza mais eficiente¹⁰.

As luvas de látex não descartáveis, usadas por todos os manipuladores na linha de processamento, apresentaram como principal função a proteção térmica, ainda que reduzida, visto que a água, a matéria-prima e os produtos eram mantidos em temperaturas de refrigeração ou de congelamento. As mãos e as luvas

eram lavadas com sabão bactericida antes do início da manipulação, durante a manipulação, quando necessário, e no término das atividades. No entanto, observou-se que as luvas estavam desgastadas e só eram substituídas quando rasgadas, podendo levar à contaminação dos alimentos pelos micro-organismos presentes nas mãos dos manipuladores^{20,23}.

As coletas realizadas nas luvas apresentaram contagens de mesófilos aeróbios variando de 3,3 a 6,8 log UFC/luva, com diferença significativa ($p < 0,05$) entre os dois períodos de coleta. Para coliformes totais, a variação foi de 2,6 a 3,8 log UFC/luva. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) para coliformes totais entre os dois períodos. As coletas realizadas entre os salões de filetagem e de embalagem não mostraram diferenças ($p > 0,05$) nos resultados obtidos para os micro-organismos pesquisados.

Considerando-se a inexistência de padrões ou especificações para contagens microbianas, em mãos ou luvas, Careli et al.¹⁶, em estudo da avaliação de condições higiênicas de manipuladores, citaram a recomendação de limite máximo para mesófilos aeróbios e coliformes totais igual a 2 log UFC/mão. Andrade¹² estabeleceu faixas de contagens para orientar as condições higiênico-sanitárias das mãos: faixa 1 (até 3 log) e faixa 2 (entre 3 a 4 log), expressas em UFC/mão para mesófilos aeróbios e coliformes totais. Os resultados obtidos na presente pesquisa demonstraram que o processo de higienização foi deficiente, indicando que as luvas podem ser fontes de contaminação nessa indústria.

Vários autores^{20,21,23,31} relatam contagens de mesófilos superiores a 5 log UFC/mão quando analisaram mãos de manipuladores em diversos estabelecimentos de processamento de alimentos. Esses estudos também demonstraram a importância dos manipuladores de alimentos como causas potenciais de contaminação dos alimentos nas unidades analisadas.

A forma mais usual para comprovar as condições de higiene dos ambientes, equipamentos, utensílios e manipuladores consiste em analisá-los quanto à contaminação microbiológica, após serem submetidos ao processo de higienização. A visualização da limpeza aparente pode induzir a um erro e dar uma falsa sensação de segurança. Os ensaios microbiológicos não evitam a entrada de bactérias na indústria, mas permitem manter a vigilância sobre perigos bacterianos e alertam quanto à manutenção da higienização nas áreas de produção^{28,32}.

Toda produção de alimentos precisa ser organizada, de modo que os procedimentos de higienização, muitas

vezes relegados ao segundo plano, possam ser realizados de maneira eficaz e sem interrupção. O caráter repetitivo das tarefas e a falta de estímulos favorecem uma redução gradativa da qualidade, aumentando os riscos de contaminação por micro-organismos patogênicos. Assim, é imprescindível que os responsáveis das empresas do setor alimentício reconheçam a importância dessa atividade para a obtenção de produtos de boa qualidade, do ponto de vista higiênico-sanitário.

CONCLUSÃO

Os resultados das análises microbiológicas das diversas superfícies da indústria indicaram higienização inadequada que pode ser consequência da não aplicação correta dos Procedimentos-Padrão de Higiene Operacional (PPHO). Medidas corretivas deverão ser empregadas e os funcionários conscientizados da importância da higienização, para que se possa evitar contaminação nos alimentos. Além disso, a indústria deveria implantar método de avaliação da higienização de superfícies. Verifica-se, ainda, a necessidade de regulamentação no Brasil que estabeleça padrões microbiológicos para as superfícies e mãos de manipuladores em estabelecimentos de processamento de alimentos.

REFERÊNCIAS

1. Feldhusen F. The role of seafood in foodborne diseases. *Microb Infect*. 2000; 2(13):1651-60.
2. Nickelson R, Maccarthy S, Finne G. Fish, crustaceans and precooked seafoods. In: Downes FP, Ito K, editores. *Compendium of methods for the microbiological examinations of foods*. Washington (DC): APHA; 2001. p. 497-505.
3. Belchior SE, Pucci OH. Controles microbiológicos y puntos de control en una planta elaboradora de filete de merluza para exportación. *Arch Latinoam Nutr*. 2000; 50(2):171-6.
4. Farias MCA, Freitas JA. Qualidade microbiológica de pescado beneficiado em indústrias paraenses. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2008;67(2):113-7.
5. Barros GC. Perda de qualidade do pescado, deterioração e putrefação. *Rev Cons Fed Med Vet*. 2003;(3):59-64.
6. Vargas DST, Quintaes KD. Potencial perigo microbiológico resultante do uso de caixas plásticas tipo monobloco, no armazenamento e transporte de pescados em São Paulo. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2003;23(3):517-22.
7. Silva ML, Matté GR, Matté MH. Aspectos sanitários da comercialização de pescado em feiras livres da cidade de São Paulo, SP/Brasil. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2008;67(3):208-14.
8. Carballo J. Adherencia de bacterias a superficies de contacto con alimentos. *Alimentaria*. 2001;320:19-26.

9. Silva CAS, Andrade NJ, Soares NFF, Ferreira SO. Evaluation of ultraviolet radiation to control microorganisms adhering to low density polyethylene films. *Braz J Microbiol*. 2003;34(2):175-8.
10. Quintaes KD, Vargas DST. Comportamento da temperatura de pescados expostos em bandejas de aço inoxidável em feiras livres de São Paulo. *Nutr Bras*. 2004;3(1):34-7.
11. Jullien C, Bénézec T, Carpentier B, Leuret V, Faille C. Identification of surface characteristics relevant to the hygienic status of stainless steel for the food industry. *J Food Eng*. 2002;56:77-8.
12. Andrade NJ. Higiene na Indústria de Alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos. 1a ed. São Paulo: Varela; 2008.
13. Brooks JD, Flint SH. Biofilms in the food industry: problems and potential solutions. *Int J Food Sci Technol*. 2008;43:2163-76.
14. Lues JFR, Van Tonder I. The occurrence of indicator bacteria on hands and aprons of food handlers in the delicatessen sections of a retail group. *Food Control*. 2007;18:326-32.
15. Carrasco L, Mena KD, Mota LC, Ortiz M, Behravesh CB, Bristol JR. Occurrence of fecal contamination in household along the US-Mexico border. *Lett Appl Microbiol*. 2008;46:682-7.
16. Careli RT, Dias AS, Andrade NJ, Antunes MA. Qualidade de água e condições higiênicas de manipuladores, equipamentos e utensílios em micro-indústrias de laticínios. *Rev Inst Latic Candido Tostes*. 2003;58(33):85-8.
17. Carrillo LB, Gonzalez MM, Schobitz TR, Molina LH, Brito CC. Niveles de contaminación microbiológica en equipos de recepción y almacenamiento de leche, en centros de acopio de la provincia de Valdivia. *Agro Sur*. 2004;32(2):45-53.
18. Pires AC, Araújo EA, Camilloto GP, Ribeiro MCT, Soares NFF, Andrade NJ. Condições higiênicas de fatiadores de frios avaliadas por ATP - bioluminescência e contagem microbiana: sugestão de higienização conforme RDC 275 da ANVISA. *Alim Nutr*. 2005;16(2):123-9.
19. Aarnisalo K, Tallavaara K, Wirtanen G, Majjala R, Raaska L. The hygienic working practices of maintenance personnel and equipment hygiene in the Finnish food industry. *Food Control*. 2006;17:1001-11.
20. Oliveira MMM, Brugnera DF, Mendonça AT, Piccolo RH. Condições higiênico-sanitárias de máquinas de moer carne, mãos de manipuladores e qualidade microbiológica da carne moída. *Ciênc Agrotec*. 2008;32(6):1893-8.
21. Coelho AIM, Milagres RCRM, Martins JFL, Azeredo, RMC, Santana, AMC. Contaminação microbiológica de ambientes e de superfícies em restaurantes comerciais. *Ciênc Saúde Colet*. 2010;15(1): 1597-606.
22. Evancho GM, Sveum WH, Moberg LJ, Frank JF. Microbiological monitoring of the foods processing environment. *In: Downes FP, Ito K, editores. Compendium of methods for the microbiological examinations of foods*. Washington (DC): APHA; 2001. p. 25-36.
23. Andrade NJ, Silva RMM, Brabes KCS. Avaliação das condições microbiológicas em unidade de alimentação e nutrição. *Ciênc Agrotec*. 2003;27(3):590-6.
24. Downes FP, Ito K, editores. *Compendium of methods for the microbiological examinations of foods*. Washington (DC): APHA; 2001.
25. Statsoft G. *Statistica for Windows 5.0. Computer program manual*. Tulsa: Statsoft. 1997.
26. Pinto MP, Cardoso, M. Avaliação da eficácia de dois protocolos de higienização em áreas de produção de alimentos de um supermercado. *Hig Aliment*. 2008;22(6):106-11.
27. Ribeiro LR, Siqueira MID. Validação da Higienização em Indústria de Gelados Comestíveis. *Estudos*. 2008;35(2):281-90.
28. Silva Jr. EA. *Manual de Controle Higiênico-Sanitário em Serviços de Alimentação*. 6a ed. São Paulo: Varela; 2008.
29. Menezes LF, Alves GMC, Mello CA, Garcia Jr. JC. Avaliação das condições higiênico-sanitárias de superfícies de equipamentos, em matadouro-frigorífico de bovinos no município de Várzea Grande, MT. *Hig Aliment*. 2007;21(156):80-4.
30. Santos MG, Iaria ST, Souza OV. Coliformes isolados de utensílios e equipamentos, na linha de processamento de camarão, de uma indústria de pescado de Fortaleza – CE. *Hig Aliment*. 2004;16:67-75.
31. Tomich RGP, Tomich TR, Amaral CAA, Junqueira RG, Pereira, AJG. Metodologia para avaliação das boas práticas de fabricação em indústrias de pão de queijo. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2005;25(1):115-20.
32. Salo S, Laine A, Alanko T, Sjöberg A, Wirtanen G. Validation of the microbiological methods hygcult dipslide, contact pate, and swabbing in surface hygiene control: a nordic collaborative study. *J AOAC Int*. 2000;83(6):1357-65.

Avaliação das características físico-químicas e colorimétricas de vinhos finos de duas principais regiões vinícolas do Brasil

Evaluation of physicochemical and colorimetric characteristics of fine wines from two main vineyards regions of Brazil

RIALA6/1358

Luisa Costa DE OLIVEIRA, Sara Oliveira DE SOUZA, Maria Eugênia de Oliveira MAMEDE*

*Endereço para correspondência: Departamento de Análises Bromatológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Rua Barão de Jeremoabo s/n, Ondina, Salvador/BA, Brasil. CEP 40170-115. Tel.: 71 3283-6929. E-mail: mmamede@ufba.br.

Recebido: 21.12.2010 – Aceito para publicação: 09.05.2011

RESUMO

Com o objetivo de avaliar as características físico-químicas e colorimétricas de vinhos finos tintos e brancos produzidos no Brasil, foram determinados diversos parâmetros exigidos pela legislação brasileira, além de compostos fenólicos totais, antocianinas, L^* , a^* , b^* , C^* e h . Apesar dos valores relativamente altos de pH e da acidez volátil de algumas amostras, todos os vinhos apresentaram os parâmetros analíticos dentro dos limites fixados pela legislação brasileira para bebidas alcoólicas, exceto o teor de açúcar residual total das amostras de vinho tinto analisadas. Com relação às amostras de vinho branco, a amostra C_b (Vale do São Francisco) foi a única que apresentou alteração na relação álcool em peso/extrato seco reduzido. As amostras de vinhos tintos apresentaram boa saturação da cor (C^*), enquanto as amostras de vinhos brancos alcançaram níveis elevados de luminosidade (L^*). Não foi possível obter uma discriminação das amostras com base apenas na variedade de uva utilizada ou na sua procedência geográfica através da Análise de Componentes Principais.

Palavras-chave. vinho branco, vinho tinto, qualidade, físico-química, colorimetria, Brasil.

ABSTRACT

In order to evaluate the physicochemical and colorimetric characteristics of fine red and white wines produced in Brazil, were determined various parameters required by Brazilian legislation, besides total phenols compounds, anthocyanins, L^* , a^* , b^* , C^* and h . Despite the relatively high values of pH and volatile acidity of some samples, all wines present the analytical parameters within the limits set by Brazilian legislation for alcoholic beverages, except the residual total sugar content of wine samples analyzed. In the samples of white wine, sample C_b (São Francisco Valley) was the only one that showed a change in alcohol in weight / reduced dry extract. The red wine samples showed good color saturation (C^*), while samples of white wines have achieved high levels of brightness (L^*). Unable to get a breakdown of the samples based only on the grape variety used or their geographic origin by Principal Components Analysis.

Keywords. white wine, red wine, quality, physicochemical, colorimetry, Brazil.

INTRODUÇÃO

A qualidade final do sabor, do aroma, da consistência e da aparência do vinho também é dependente dos constituintes químicos existentes, da interação entre eles e de suas quantidades. Em geral, os trabalhos que buscam avaliar a composição físico-química de vinhos nacionais são baseados nas análises exigidas pela legislação brasileira e relacionados ao Padrão de Identidade e Qualidade da bebida. Segundo a Portaria nº 229/88 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento¹, os vinhos de mesa finos são aqueles elaborados exclusivamente a partir de uvas viníferas (*Vitis vinifera*) frescas, sãs e maduras e devem obedecer a certos limites fixados quanto à sua composição para serem classificados como tal. As análises físico-químicas compreendem, portanto, a determinação de importantes parâmetros de qualidade do vinho, pois podem avaliar o controle a que foram submetidos durante a sua elaboração e ser relacionadas aos principais fatores tecnológicos empregados².

Embora não seja exigido pela legislação brasileira, a cor é um dos atributos mais importantes em vinhos, já que está diretamente relacionada à aparência do produto. Através da cor é possível especular sobre sua idade ou observar possíveis defeitos existentes na bebida, além de ser a primeira avaliação que um consumidor de vinho faz. Meléndez et al.³ evidenciaram a relevância da cor em vinhos ao afirmarem que esse atributo é um fator fundamental para a tipificação dessas bebidas. Morrot et al.⁴ e o estudo de revisão de Duran e Costell⁵ também destacaram a forte influência que a cor exerce sobre a percepção de outros atributos sensoriais, como o aroma e o gosto doce.

Os vinhos tintos exibem tonalidades que variam do púrpura ao alaranjado, passando por fases rubi, bordô e terracota ao longo do tempo. A coloração púrpura está relacionada comumente aos vinhos jovens, enquanto cores rubis e bordôs aos vinhos maduros. Os tons de vermelho terracota ou alaranjado são frequentemente associados aos vinhos envelhecidos⁶. Já a aparência de vinhos brancos deve ser clara, límpida e não apresentar indícios de oxidação precoce⁷. Sua cor varia do amarelo-esverdeado ao amarelo-palha, dourado, amarelo-âmbar ou alaranjado e, quando muito jovens, apresentam tonalidades verdes⁶.

A região do “Vale do São Francisco”, situada no planalto nordestino entre os estados da Bahia e de Pernambuco, tem mostrado nos últimos anos grande

potencial vinícola, quebrando um grande paradigma da enologia mundial. Embora seja detentora de condições edafoclimáticas incomuns ao processo de vinificação quando comparadas às regiões tradicionais, possui condições adequadas para a aclimação de diversas castas europeias, como Moscatéis, Cabernet Sauvignon e Shiraz⁷. Essa região é citada por Santos² como a segunda maior produtora de uvas finas do país. Em 2006, sua produção anual respondeu por mais de 7 milhões de litros de vinhos finos e espumantes, ou seja, cerca de 15% da produção nacional⁷. Apesar disso, a região da “Serra Gaúcha”, localizada no Sul do Brasil, ainda é responsável pela maior produção de vinhos finos do país e se constitui em uma das mais tradicionais regiões vitivinícolas brasileiras.

Segundo Miele et al.⁸, através da tipicidade e de melhorias na qualidade é possível alcançar uma maior competitividade dos vinhos nacionais e evitar a desvalorização da indústria vinícola brasileira. Entretanto, há poucos estudos científicos relacionados às características físico-químicas e colorimétricas dos vinhos brasileiros. Assim, este trabalho teve por objetivo caracterizar vinhos finos produzidos em duas regiões brasileiras, principalmente no “Vale do São Francisco”, contribuindo para o fortalecimento da tipificação do produto nacional e sendo útil nos processos de busca de identidade geográfica ou denominação de origem.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de vinho

Foram analisadas em triplicata dez marcas comerciais de vinhos de mesa finos (*Vitis vinifera* L.) tintos e brancos (safra 2006). Um total de 20 garrafas de vinho foi analisado. As amostras foram provenientes das regiões do “Vale do São Francisco” (Juazeiro, BA e Petrolina, PE) e da “Serra Gaúcha” (Bento Gonçalves, RS). Para sua codificação, adotou-se a letra “t” para identificar os vinhos tintos, enquanto os vinhos brancos receberam a letra “b”. Desta forma, as amostras provenientes do “Vale do São Francisco” foram as seguintes: A_t (Cabernet Sauvignon/Shiraz), B_t (Cabernet Sauvignon), C_t (Cabernet Sauvignon), D_t (Cabernet Sauvignon/Shiraz), A_b (Moscatel), B_b (Moscatel), C_b (Moscatel) e D_b (Moscatel/Canelli/Chenin Blanc). As amostras oriundas da “Serra Gaúcha” foram: E_t (Cabernet Sauvignon) e F_t (Merlot). O número do lote em todas as garrafas pertencentes à mesma marca foi idêntico.

Determinações físico-químicas e análise instrumental de cor

Todas as determinações físico-químicas e colorimétricas foram realizadas em triplicata. As amostras foram analisadas imediatamente após a abertura das garrafas a fim de se determinar, de acordo com as metodologias oficiais propostas pela Instrução Normativa nº 24/05 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento⁹, os seguintes parâmetros: densidade relativa a 20°C; grau alcoólico; pH (a 25°C em potenciômetro Quimis Q400AS, calibrado com soluções-padrão de pH 4,01 e 6,86); acidez total titulável; acidez volátil corrigida; acidez fixa; extrato seco total; extrato seco reduzido; relação álcool em peso/extrato seco reduzido; anidrido sulfuroso total e teor de açúcares residuais totais.

A extração dos compostos fenólicos totais ocorreu a partir da adaptação da metodologia desenvolvida por Maraschin¹⁰ a fim de isolar os analitos de interesse e excluir possíveis interferentes na determinação, como açúcares redutores. Aos 20 mL de amostra foi adicionado igual volume de acetato de etila. Esta mistura foi incubada no escuro por 24h e a fase orgânica coletada em funil de separação. O solvente foi então removido por evaporação e o resíduo foi dissolvido em metanol/clorofórmio 1:1 (extrato). A exatidão dessa extração foi avaliada em termos de porcentagem de recuperação a partir da adição de ácido gálico (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) como padrão analítico, variando de 82,94 a 100,85%.

Após a extração, a quantificação dos compostos fenólicos totais foi realizada através do método clássico descrito por Singleton e Rossi¹¹ utilizando Espectrofotômetro UV-Visível Femto 800XI (Tecnal, Brasil). A curva-padrão analítica ($R^2 = 0,9996$) foi obtida a partir de 5 concentrações (0 a 1000 mg.L⁻¹) de uma solução de ácido gálico. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes em ácido gálico (GAE) por litro de vinho. O teor de antocianinas monoméricas totais foi determinado segundo as recomendações de Lee et al.¹², onde também foi usado Espectrofotômetro UV-Visível Femto 800XI (Tecnal, Brasil). Os resultados foram expressos como mg de antocianinas totais em equivalentes de cianidina-3-glucosídeo por litro de vinho.

As medidas dos parâmetros colorimétricos foram feitas em colorímetro portátil Konica Minolta® CR400 (Osaka, Japão) após calibração com placa de porcelana branca (CR-A43). O equipamento é programado para executar leituras considerando o observador-padrão 2° e o iluminante D₆₅ (correspondente à luz do dia) padronizados

pela Commission Internationale de L'Éclairage em 1931. Os valores de L*, a*, b*, C* e h dados pelo equipamento foram mensurados e o espaço de cor adotado para a interpretação dos resultados foi o CIELAB.

No sistema de cor CIELAB, L* representa a luminosidade, onde os valores variam do 0 (preto) ao 100 (branco). Além disso, -a* (verde), a* (vermelho), -b* (azul) e b* (amarelo) são as coordenadas de cor. Os parâmetros C* e h são derivados das coordenadas colorimétricas anteriormente citadas, onde C* é a cromaticidade ou saturação da cor ("vivacidade") e h indica a tonalidade da cor, cuja medida é dada em graus. O centro do espaço de cor CIELAB é acromático e a saturação da cor vai aumentando à medida que os valores se afastam da origem.

Análise estatística

Os resultados das análises físico-químicas e colorimétricas foram submetidos ao Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com comparações múltiplas de grupos pelo Teste de Dunn ao nível de 5% de significância. O programa utilizado para o tratamento estatístico foi o GraphPad InStat®, v.3.10. Apenas para a Análise de Componentes Principais (ACP) foi utilizado o *software* Minitab¹⁵ para Windows versão 2006.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados analíticos obtidos para as amostras de vinhos tintos estão apresentados na Tabela 1 e os obtidos para as amostras de vinhos brancos, na Tabela 2. A densidade do vinho está relacionada principalmente ao seu teor alcoólico e de açúcares residuais. Assim, os valores médios de densidade das amostras de vinhos tintos se mantiveram entre 0,9961 (amostra F₁) e 0,9981 (amostra D₁). As amostras de vinho branco Ab e Bb apresentaram as maiores médias (1,0042 e 1,0080, respectivamente) para esse parâmetro.

Com relação ao grau alcoólico, todas as amostras apresentaram valores dentro dos intervalos de referência descritos pela Lei nº 10970/04¹³, onde a amostra B₆ obteve menor média (8,63%vol.) para esse parâmetro e a amostra A₇ a maior média (13,17%vol) (Tabelas 1 e 2). O etanol, principal álcool encontrado em vinhos, é fundamental para as propriedades sensoriais, envelhecimento e estabilidade dos vinhos, uma vez que limita o crescimento microbiano e suprime o desenvolvimento de micro-organismos responsáveis por odores indesejáveis¹⁴. Além disso, o grau alcoólico e o teor de açúcares residuais evidenciam

Tabela 1. Avaliação dos parâmetros físico-químicos e colorimétricos das amostras de vinhos tintos

	Amostras (<i>n experimental = 3</i>)					
	A _t	B _t	C _t	D _t	E _t	F _t
Densidade relativa a 20°C	0,9963 ^b	0,9977 ^{ab}	0,9967 ^{ab}	0,9981 ^a	0,9968 ^{ab}	0,9961 ^b
Grau alcoólico (%vol.)	13,17 ^a	11,77 ^b	12,23 ^{ab}	12,80 ^{ab}	12,93 ^{ab}	12,93 ^{ab}
pH	3,78 ^{ab}	3,93 ^a	3,85 ^{ab}	3,83 ^{ab}	3,89 ^{ab}	3,71 ^b
Acidez total (meq.L ⁻¹)	73,10 ^b	85,80 ^{ab}	87,40 ^a	84,50 ^{ab}	78,17 ^{ab}	75,90 ^{ab}
Acidez volátil (meq.L ⁻¹)	9,72 ^{ab}	12,11 ^{ab}	12,45 ^{ab}	12,69 ^a	9,26 ^{ab}	7,93 ^b
Acidez fixa (meq.L ⁻¹)	63,38 ^b	73,69 ^{ab}	74,95 ^a	71,81 ^{ab}	68,91 ^{ab}	67,97 ^{ab}
Extrato seco total (g.L ⁻¹)	34,67 ^{ab}	33,97 ^{ab}	32,90 ^b	38,37 ^a	35,17 ^{ab}	33,60 ^{ab}
Extrato seco reduzido (g.L ⁻¹)	30,07 ^a	28,83 ^a	28,33 ^a	29,05 ^a	28,83 ^a	27,75 ^a
Relação A/ESR	3,51 ^{ab}	3,26 ^b	3,45 ^{ab}	3,52 ^{ab}	3,59 ^{ab}	3,73 ^a
SO ₂ total (g.L ⁻¹)	0,03 ^a	0,03 ^a	0,10 ^a	0,04 ^a	0,04 ^a	0,07 ^a
Açúcares totais (g.L ⁻¹)	5,60 ^b	6,13 ^{ab}	5,57 ^b	10,31 ^a	7,33 ^{ab}	6,85 ^{ab}
Fenólicos totais (MG.L ⁻¹)	1410,83 ^b	3718,70 ^a	2252,07 ^{ab}	1798,70 ^{ab}	1763,57 ^{ab}	1542,93 ^{ab}
Antocianinas monoméricas totais (mg.L ⁻¹)	156,48 ^a	16,73 ^{ab}	14,09 ^b	22,02 ^{ab}	82,50 ^{ab}	62,53 ^{ab}
L*	26,29 ^{ab}	24,10 ^b	37,30 ^a	32,03 ^{ab}	32,73 ^{ab}	35,63 ^{ab}
a*	35,00 ^{ab}	23,30 ^b	32,56 ^{ab}	33,62 ^{ab}	36,13 ^a	35,50 ^{ab}
b*	13,33 ^{ab}	11,05 ^b	25,75 ^a	20,89 ^{ab}	19,77 ^{ab}	22,03 ^{ab}
C*	37,46 ^{ab}	25,79 ^b	42,13 ^a	39,59 ^{ab}	41,17 ^{ab}	41,80 ^{ab}
h	20,84 ^b	25,37 ^{ab}	39,40 ^a	31,86 ^{ab}	28,63 ^{ab}	31,83 ^{ab}

Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Dunn; A/ESR = relação álcool em peso/extrato seco reduzido; L* = luminosidade; a* = componente verde-vermelho; b* = componente azul-amarelo; C* = cromaticidade da cor; h = ângulo da tonalidade da cor; Amostras: A_t = Cabernet Sauvignon (50%) + Shiraz (50%) (“Vale do São Francisco”); B_t = Cabernet Sauvignon (“Vale do São Francisco”); C_t = Cabernet Sauvignon (“Vale do São Francisco”); D_t = Cabernet Sauvignon (50%) + Shiraz (50%) (“Vale do São Francisco”); E_t = Cabernet Sauvignon (“Serra Gaúcha”); F_t = Merlot (“Serra Gaúcha”)

o controle do estágio de maturação da uva e do processo fermentativo empregado².

Quanto ao pH, todas as amostras de vinhos tintos apresentaram médias relativamente altas (Tabela 1), considerando a faixa ideal de pH para vinhos tintos (3,1-3,6) reportada por Mota et al.¹⁵. Os valores médios de pH variaram de 3,71 (amostra F_t, Merlot) a 3,93 (amostra B_t, Cabernet Sauvignon). Níveis muito elevados de pH podem desestabilizar o vinho tanto biologicamente como do ponto de vista físico-químico, uma vez que o torna mais propenso à oxidação e à proliferação microbiana¹⁶ e compromete, portanto, a sua vida útil.

Também foi observado que as amostras elaboradas exclusivamente com uvas Cabernet Sauvignon apresentaram as maiores médias de pH (B_t, C_t e E_t), independentemente da região geográfica de produção (Tabela 1). Essa é uma característica comumente encontrada em vinhos dessa variedade devido à acentuada extração de potássio da película da uva para o mosto durante a maceração¹⁷. O valor médio de pH encontrado em vinhos tintos secos Cabernet Sauvignon produzidos e comercializados no nordeste do Brasil foi

de 3,98¹⁸. No entanto, as condições edafoclimáticas da região do “Vale do São Francisco” prevalecem sobre a extração do potássio, favorecendo pH elevado em vinhos elaborados também com outras variedades de uva nessa região. De modo geral, têm sido observados valores de pH entre 3,6 a 4,5, o que pode ser atribuído às adubações massivas do solo com fertilizantes à base de potássio ou mesmo à alta concentração natural desse elemento nos solos da região⁷.

Os valores de pH das amostras de vinho branco variaram de 3,25 (amostra B_b, Moscatel) a 3,63 (amostra A_b, Moscatel), onde as amostras A_b e C_b apresentaram médias relativamente altas (Tabela 2), visto que Jackson¹⁴ refere valores de pH entre 3,1 e 3,4 como adequados para a maioria dos vinhos brancos.

Dentre as amostras de vinhos tintos, a acidez total foi maior nas amostras do “Vale do São Francisco”, exceto a amostra A_t (Cabernet Sauvignon/Shiraz), que apresentou a menor média desse parâmetro (73,10meq.L⁻¹) quando comparada às demais e diferiu significativamente (p<0,05) apenas da amostra C_t (Cabernet Sauvignon) (Tabela 1). Mesmo assim, todas as amostras de vinhos

Tabela 2. Avaliação dos parâmetros físico-químicos e colorimétricos das amostras de vinhos brancos

	Amostras (<i>n</i> experimental = 3)			
	A _b	B _b	C _b	D _b
Densidade relativa a 20°C	1,0042 ^{ab}	1,0080 ^a	0,9907 ^b	0,9919 ^{ab}
Grau alcoólico (%vol.)	11,03 ^{ab}	8,63 ^b	11,37 ^{ab}	12,27 ^a
pH	3,63 ^a	3,25 ^b	3,52 ^{ab}	3,34 ^{ab}
Acidez total (meq.L ⁻¹)	83,30 ^{ab}	77,67 ^b	87,37 ^{ab}	99,53 ^a
Acidez volátil (meq.L ⁻¹)	6,95 ^{ab}	2,58 ^{ab}	1,66 ^b	9,28 ^a
Acidez fixa (meq.L ⁻¹)	76,07 ^{ab}	74,73 ^b	85,63 ^{ab}	90,25 ^a
Extrato seco total (g.L ⁻¹)	48,73 ^{ab}	51,20 ^a	13,90 ^b	20,93 ^{ab}
Extrato seco reduzido (g.L ⁻¹)	23,73 ^a	19,47 ^{ab}	11,33 ^b	15,20 ^{ab}
Relação A/ESR	3,72 ^{ab}	3,55 ^b	8,03 ^a	6,46 ^{ab}
SO ₂ total (g.L ⁻¹)	0,08 ^b	0,09 ^{ab}	0,13 ^a	0,12 ^{ab}
Açúcares totais (g.L ⁻¹)	26,00 ^{ab}	32,73 ^a	3,57 ^b	6,40 ^{ab}
Fenólicos totais (mg.L ⁻¹)	548,42 ^a	523,58 ^{ab}	369,63 ^{ab}	278,73 ^b
L*	80,23 ^{ab}	79,22 ^b	80,18 ^{ab}	80,76 ^a
a*	-2,70 ^b	-2,01 ^{ab}	-1,48 ^a	-1,90 ^{ab}
b*	11,22 ^{ab}	11,62 ^a	5,16 ^b	7,05 ^{ab}
C*	11,54 ^{ab}	11,81 ^a	5,37 ^b	7,30 ^{ab}
h	103,52 ^{ab}	99,80 ^b	106,02 ^a	105,13 ^{ab}

Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Dunn; A/ESR = relação álcool em peso/extrato seco reduzido; L* = luminosidade; a* = componente verde-vermelho; b* = componente azul-amarelo; C* = cromaticidade da cor; h = ângulo da tonalidade da cor; Amostras: A_b = Moscatel (“Vale do São Francisco”); B_b = Moscatel (“Vale do São Francisco”); C_b = Moscatel (“Vale do São Francisco”); D_b = Chenin Blanc (60%) + Moscato Canelli (40%) (“Vale do São Francisco”)

tintos se encontraram dentro dos intervalos de referência preconizados pela legislação brasileira, que é de 55 a 130meq.L⁻¹. Os valores de acidez total alcançados nas amostras tintas estão relativamente próximos aos obtidos por outros autores em vinhos tintos brasileiros das mesmas variedades de uva, isto é, em média 72,00meq.L⁻¹ em vinhos Cabernet Sauvignon¹⁷, de 86,70 a 88,00meq.L⁻¹ em vinhos Shiraz (safra 2005)¹⁵ e em média 70,30meq.L⁻¹ em vinhos Merlot¹⁹.

Quanto às amostras de vinho branco, D_b apresentou a maior média de acidez total, diferindo significativamente apenas de B_b (p<0,05). Provavelmente, a sua maior acidez está relacionada à utilização de Chenin Blanc em sua composição, já que esta variedade de uva é considerada como detentora de elevada acidez⁷. Além disso, as demais amostras compostas apenas por uvas Moscatéis apresentaram níveis de acidez total superiores aos encontrados em vinhos Moscato Giallo (76,0meq.L⁻¹) produzidos no Rio Grande do Sul²⁰. Entretanto, todos os

vinhos brancos também obedeceram aos limites fixados pela legislação brasileira¹ para esse parâmetro.

A acidez total do vinho é composta por duas categorias: volátil e fixa. Assim, quanto aos níveis de acidez volátil nas amostras tintas, foi verificado que B_b, C_t e D_t provenientes do “Vale do São Francisco” apresentaram os valores médios mais elevados (12,11meq.L⁻¹, 12,45meq.L⁻¹ e 12,69meq.L⁻¹, respectivamente). A menor média desse parâmetro foi obtida na amostra F_t (Tabela 1), que diferiu significativamente apenas da amostra D_t. Os valores de acidez volátil obtidos nas amostras, produzidas na região da “Serra Gaúcha”, E_t (9,26meq.L⁻¹) e F_t (7,93meq.L⁻¹) estão abaixo da média obtida (10meq.L⁻¹) por outros autores em vinhos tintos *V. vinifera* elaborados nessa mesma região brasileira^{17,21}. Quanto às amostras de vinhos brancos, as médias de acidez volátil foram relativamente baixas, onde a amostra D_b obteve a maior média (Tabela 2).

Altas concentrações de acidez volátil em vinhos não são desejáveis, pois podem denotar uma possível contaminação da bebida já que esse parâmetro está relacionado à presença de ácido acético². Embora algumas amostras tenham apresentado valores de acidez volátil relativamente altos, nenhuma das dez marcas analisadas ultrapassou o limite máximo estabelecido pela legislação brasileira (20meq.L⁻¹)¹.

Com relação à acidez fixa, também foram observadas as maiores médias nas amostras B_b, C_t, D_t e D_b (73,69meq.L⁻¹, 74,95meq.L⁻¹, 71,81meq.L⁻¹, 90,25meq.L⁻¹, respectivamente) (Tabelas 1 e 2), indicando a maior quantidade de ácidos orgânicos não voláteis presentes nessas amostras.

Quanto ao extrato seco total, dentre os vinhos tintos, a amostra D_t apresentou a maior média (38,37g.L⁻¹) em relação às demais (Tabela 1), enquanto, dentre as amostras de vinhos brancos, B_b obteve a maior média (51,20g.L⁻¹) (Tabela 2). A percepção sensorial de “corpo” também está relacionada ao teor de extrato seco total do vinho² e esse parâmetro é aumentado conforme a quantidade de açúcares acrescentados ao mosto durante a fermentação (chaptalização).

Por outro lado, não houve diferença significativa (p<0,05) entre todas as amostras de vinhos tintos analisadas com relação ao extrato seco reduzido (Tabela 1) e, dentre as amostras brancas, A_b diferiu significativamente (p<0,05) apenas de C_b (Tabela 2). Esse parâmetro é determinado principalmente para o cálculo posterior da relação álcool em peso/extrato seco reduzido, exigido pela legislação.

A Portaria nº 229/88¹ preconiza que a relação álcool em peso/extrato seco reduzido não deve ultrapassar 5,2 e 6,7 para vinhos de mesa finos tintos e brancos, respectivamente. Foi observado que todas as amostras se encontram abaixo do limite máximo estabelecido pela legislação, exceto a amostra de vinho branco C_b. Isso pode indicar uma correção excessiva do grau alcoólico, prejudicando a sua qualidade final.

Da mesma forma, os níveis de SO₂ total das amostras tintas e brancas não ultrapassaram o limite máximo (0,35g.L⁻¹) fixado pela referida Portaria¹, sendo as menores médias apresentadas pelas amostras de vinho tinto At e Bt, ambas com 0,03g.L⁻¹. O anidrido sulfuroso, empregado como agente antimicrobiano e antioxidante na produção de vinhos, tem sido associado com processos alérgicos e, portanto, há uma tendência na redução das quantidades utilizadas desse aditivo no vinho²².

Quanto ao conteúdo de açúcares residuais totais, as quantidades obtidas permitem classificar todos os vinhos tintos analisados como do tipo “meio-seco”, ao contrário do declarado nos seus rótulos (secos), principalmente a amostra D_b, que apresentou a maior média (10,31g.L⁻¹). Já para os vinhos brancos, as amostras A_b e B_b podem ser classificadas como do tipo “doce” ou “suave” e a amostra C_b como do tipo “seco”. No entanto, a amostra D_b também deveria ser classificada como do tipo “meio-seco”, contradizendo o seu rótulo (seco). Para ser considerado um vinho do tipo seco, é necessário que os níveis de açúcares residuais totais presentes estejam iguais ou abaixo de 5 g de glicose por litro de vinho¹.

Para os compostos fenólicos totais, as amostras de vinhos tintos que continham apenas Cabernet Sauvignon eram produzidas no “Vale do São Francisco” (B_t e C_t) alcançaram as médias mais elevadas (Tabela 1). Esse fato poderia indicar um maior potencial antioxidante dessas amostras em relação às demais. Outros autores também encontraram resultados semelhantes quanto à superioridade das concentrações de compostos fenólicos totais de vinhos Cabernet Sauvignon em detrimento de outras variedades, como a Merlot²³. Lucena et al.²⁴ analisaram amostras de vinhos do “Vale do São Francisco”, onde seus teores variaram de 3,2 a 5,9g.L⁻¹ e a amostra composta por uvas Shiraz (safra 2005) alcançou a maior média. Estes autores citam a influência que a forte exposição solar nas uvas típicas dessa região do país exerce sobre o conteúdo fenólico nos vinhos. Uvas expostas à luz solar poderiam conter cerca de 10 vezes mais compostos fenólicos totais que as cultivadas sob a sombra.

As diferenças na quantidade de compostos fenólicos presentes nos vinhos não depende apenas do tipo de uva utilizada e das condições de cultivo, mas também de vários fatores relacionados ao processamento. Presença de sementes e engaços no mosto, tempo e temperatura de maceração, número de trasfegas realizadas e outras etapas tecnológicas interferem diretamente no seu conteúdo fenólico. Talvez por esse motivo, a amostra A_t tenha apresentado a menor média de compostos fenólicos totais (Tabela 1), mesmo sendo elaborada na região do “Vale do São Francisco” com alta exposição solar. Dentre as amostras da “Serra Gaúcha”, a amostra E_t (Cabernet Sauvignon) apresentou maior conteúdo fenólico que a amostra F_t (Merlot). Em virtude dos fatores acima mencionados, a quantidade de compostos fenólicos pode variar consideravelmente nos vinhos tintos, mas em geral valores entre 1000mg.L⁻¹ e 4000mg.L⁻¹ são obtidos (revisado por Mamede e Pastore²⁵). O conteúdo de compostos fenólicos totais de diversos vinhos tintos brasileiros variou de 1041,63mg.L⁻¹ a 1958,78mg.L⁻¹ no estudo de Granato et al.²⁶, enquanto Minussi et al.²⁷ obtiveram em média 1920mg.L⁻¹.

As amostras de vinhos brancos compostas apenas por Moscatéis (A_b, B_b e C_b) alcançaram as maiores médias de compostos fenólicos totais (Tabela 2). Em especial, as amostras A_b e B_b apresentaram médias muito elevadas desses compostos, considerando o valor médio normalmente reportado para vinhos brancos (200-300mg.L⁻¹)²⁵. Estes resultados estão superiores à máxima concentração de fenólicos totais encontrada por Minussi et al.²⁷ (353mg.L⁻¹) em vinhos brancos brasileiros da variedade Riesling e provavelmente ocorreram devido à alta exposição solar da região. Talvez as características genéticas da variedade Chenin Blanc utilizada na amostra D_b não tenha favorecido a produção de altos níveis de compostos fenólicos nessa amostra.

Dentre as amostras produzidas no “Vale do São Francisco”, a amostra A_t produzida com uvas Cabernet Sauvignon/Shiraz apresentou a maior média com relação às concentrações de antocianinas totais, seguida pela amostra D_t composta pelas mesmas variedades de uva. As amostras elaboradas na região da “Serra Gaúcha” também apresentaram médias elevadas para antocianinas monoméricas totais, diferindo significativamente (p<0,05) apenas da amostra C_t (Tabela 1). Os resultados de antocianinas monoméricas encontram-se próximos aos reportados por trabalhos recentes envolvendo vinhos brasileiros, variando de 9,35 a 237,71mg.L⁻¹²⁶ e de 5,2 a 20,7mg.L⁻¹²⁴. Assim como Lucena et al.²⁴ verificaram, os

resultados mostraram que as quantidades de antocianinas monoméricas provavelmente não foram responsáveis pelo alto conteúdo fenólico das amostras do “Vale do São Francisco”, já que suas concentrações estavam dentro do reportado na literatura para vinhos tintos nacionais.

Os parâmetros de cor das amostras de vinhos tintos indicaram que as amostras A_t e B_t apresentaram os menores índices de L^* (luminosidade), sendo, portanto, as mais escuras, enquanto a amostra C_t foi a mais clara com a maior luminosidade (Tabela 1). A amostra B_t apresentou os menores valores de a^* , b^* e C^* , ou seja, menos cor vermelha e amarela e menor saturação da cor (Tabela 1). Possivelmente, este fato está relacionado ao seu elevado pH (3,93), uma vez que Jackson¹⁴ cita que vinhos com $pH > 3,9$ estão mais susceptíveis à oxidação dos compostos fenólicos e, portanto, à perda de sua cor jovem. O alto valor de pH também foi atribuído como um dos fatores responsáveis pelos baixos índices de C^* e a^* observados em vinhos Tempranillo²⁸.

Já as amostras de vinhos brancos apresentaram altos índices de luminosidade (L^*), ou seja, se mostraram claras e luminosas com valores próximos a 100 (Tabela 2). Esse é um aspecto muito importante na qualidade de vinhos brancos, já que a opacidade está relacionada a falhas da cadeia produtiva e comprometimento da sanidade da bebida.

Quanto ao componente de cor vermelha (a^*), foram observadas as maiores médias (36,13 e 35,50) nas amostras de vinhos tintos elaborados na “Serra Gaúcha” (E_t e F_t , respectivamente), seguidas pela amostra A_t (35,00) produzida no “Vale do São Francisco”. Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre essas três amostras. As amostras com menor componente vermelho (B_t e C_t) foram elaboradas a partir da variedade Cabernet Sauvignon no “Vale do São Francisco”. O corte Cabernet Sauvignon/Shiraz parece ter favorecido a maior intensidade de a^* somente entre as amostras da região Nordeste do país (Tabela 1).

Nas amostras de vinhos brancos, os valores observados do componente de cor verde ($-a^*$) foram mais associados à cor verde nas amostras A_b e B_b do que nas amostras C_b e D_b (Tabela 2) de acordo com o espaço de cor CIELAB, embora os valores tenham sido próximos e apenas as amostras A_b e C_b tenham diferido significativamente ($p < 0,05$).

Os maiores valores do componente de cor amarela (b^*) dos vinhos tintos foram obtidos nas amostras C_t , D_t e F_t (Tabela 1), o que pode conferir uma coloração um pouco mais alaranjada nessas amostras. Devido ao fato dos

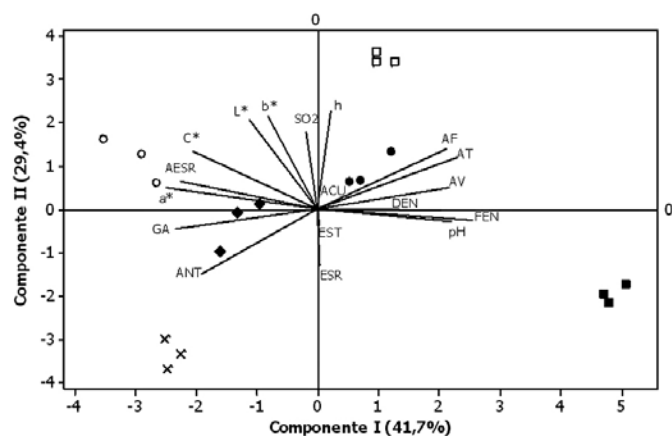
vinhos tintos exibirem cor predominantemente vermelha, em geral, o valor de a^* é maior que b^* . Este fato pode induzir ao pensamento de que b^* seria um parâmetro “secundário”, porém do ponto de vista psicométrico (como a cor é percebida pelo olho humano), ambos a^* e b^* são importantes para a estimativa da cor, principalmente em alguns vinhos jovens com altos níveis de derivados da malvidina²⁹.

Já as amostras de vinho branco A_b e B_b apresentaram valores de b^* mais intensos, enquanto as amostras C_b e D_b obtiveram valores menores para esse mesmo parâmetro (Tabela 2). Como uma das principais contribuições dos compostos fenólicos em vinhos é a cor, possivelmente a maior intensidade de cor amarela nas amostras A_b e B_b aconteça em razão do seu maior conteúdo fenólico (Tabela 2). Os principais compostos responsáveis pela coloração de vinhos brancos são as catequinas e os hidroxicinamatos, os quais são inicialmente incolores, mas podem ser oxidados enzimaticamente ou quimicamente formando produtos de cor amarela ou marrom^{30, 31}.

Em um estudo sobre o perfil de compostos fenólicos de vinhos brancos varietais produzidos nas Ilhas Canárias³¹, os resultados obtidos dos compostos fenólicos foram correlacionados com as coordenadas CIELAB alcançadas. Foi sugerido que vinhos brancos com maior teor de compostos fenólicos exibiriam tonalidades mais amareladas pela maior formação de compostos decorrentes do escurecimento pela sua oxidação.

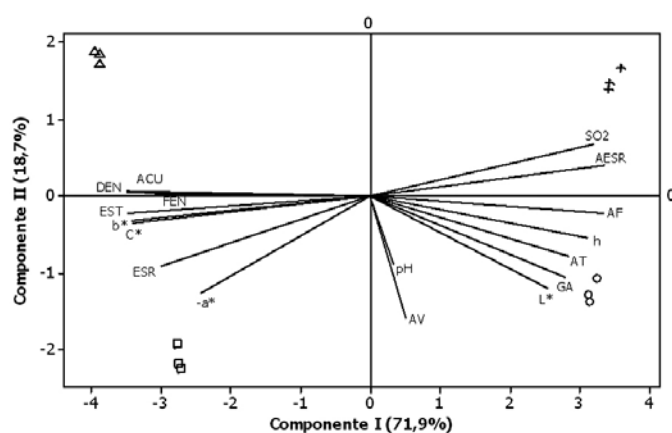
Com relação ao valor de croma (C^*) dos vinhos tintos, é possível observar que a amostra C_t alcançou a maior média, seguida pelas amostras E_t e F_t , sem diferença significativa ($p < 0,05$) (Tabela 1). Essas amostras apresentaram, portanto, uma coloração vívida, concordando com o trabalho de Granato et al.²⁶, onde foi afirmado que valores de C^* próximos ou maiores que 50 correspondem a cores mais vívidas. O valor de croma (C^*) das amostras de vinhos brancos foram baixos e próximos à origem das coordenadas do espaço CIELAB, principalmente as amostras C_b e D_b (Tabela 2).

O ângulo da tonalidade da cor (h) indicou que as amostras tintas C_t , D_t e F_t se encontraram mais afastadas do eixo 0° (vermelho), tendendo à direção do eixo 90° (amarelo), concordando com as maiores médias de b^* alcançadas por essas amostras (Tabela 1). A amostra A_t foi a que apresentou menor média de h e, portanto, maior proximidade com o eixo 0° . Com relação aos vinhos brancos, as amostras A_b e B_b apresentaram médias de h mais próximas do eixo 90° , indicando tonalidade de cor



DEN: densidade relativa a 20°C, GA: grau alcoólico, AT: acidez total, AV: acidez volátil corrigida, AF: acidez fixa, EST: extrato seco total, ESR: extrato seco reduzido, AESR: relação álcool em peso/extrato seco reduzido, SO2: anidrido sulfuroso total, ACU: açúcares residuais totais, FEN: compostos fenólicos totais, ANT: antocianinas totais, L*: luminosidade, a* componente verde-vermelho, b*: componente azul-amarelo, C* cromaticidade da cor, h: ângulo da tonalidade da cor, ○ = Amostra A₁, ■ = Amostra B₁, □ = Amostra C₁, ● = Amostra C₂, ◆ = Amostra E₁, ○ = Amostra F₁

Figura 1. Projeção bidimensional dos resultados obtidos da Análise de Componentes Principais I e II para os parâmetros físico-químicos e colorimétricos das amostras de vinhos tintos



DEN: densidade relativa a 20°C, GA: grau alcoólico, AT: acidez total, AV: acidez volátil corrigida, AF: acidez fixa, EST: extrato seco total, ESR: extrato seco reduzido, AESR: relação álcool em peso/extrato seco reduzido, SO2: anidrido sulfuroso total, ACU: açúcares residuais totais, FEN: compostos fenólicos totais, L*: luminosidade, a* componente verde-vermelho, b*: componente azul-amarelo, C* cromaticidade da cor, h: ângulo da tonalidade da cor, ○ = Amostra A₂, △ = Amostra B₂, + = Amostra C₂, ○ = Amostra D₂

Figura 2. Projeção bidimensional dos resultados obtidos da Análise de Componentes Principais I e II para os parâmetros físico-químicos e colorimétricos das amostras de vinhos brancos

mais amarelada, concordando também com as maiores médias de b* (Tabela 2).

A fim de verificar se os resultados das análises físico-químicas e colorimétricas poderiam diferenciar as amostras de acordo com a variedade de uva (ou da região geográfica, no caso dos vinhos tintos), uma Análise de Componentes Principais (ACP) em matriz de correlação foi realizada (Figuras 1 e 2). Nesse tipo de análise multivariada, amostras similares geralmente ocupam regiões próximas no gráfico e são caracterizadas pelos vetores que representam os parâmetros avaliados. A proximidade dos diferentes vetores entre si pode sugerir uma correlação positiva.

O modelo de ACP desenvolvido para as amostras de vinhos tintos (Figura 1) mostrou que os Componentes Principais I e II foram capazes de explicar 71,1% da variação total dos dados, onde o Componente I explicou 41,7% e o Componente II, 29,4%.

Foi possível verificar que o grau alcoólico e as antocianinas totais foram importantes na caracterização da amostra A₁, bem como os compostos fenólicos e o pH na caracterização da amostra B₁. A amostra C₁ foi caracterizada principalmente por maior ângulo da tonalidade da cor, enquanto a amostra D₁, por maior quantidade de açúcares residuais totais, sendo também importantes a acidez total

e a acidez fixa. Quanto às amostras elaboradas no sul do país, a amostra E₁ se caracterizou pelo componente de cor vermelha, grau alcoólico e antocianinas totais. Já a amostra F₁, foi caracterizada principalmente pelo componente de cor vermelha, cromaticidade da cor e relação álcool em peso/extrato seco reduzido. No entanto, não houve uma discriminação das amostras tintas em função da variedade de uva empregada ou da região geográfica de produção pela técnica da ACP.

Por outro lado, o modelo de ACP gerado pelas amostras de vinhos brancos (Figura 2) mostrou que os Componentes Principais I e II explicaram 90,6% da variação total dos dados, onde o Componente I explicou 71,9% e o Componente II, 18,7%.

Foi observado que o extrato seco reduzido e o componente de cor verde foram importantes na caracterização da amostra A₂, enquanto a densidade e os açúcares residuais totais na caracterização da amostra B₂. A amostra C₂ foi caracterizada principalmente por maiores índices de SO₂ total e relação álcool em peso/extrato seco reduzido. A amostra D₂ se caracterizou por grau alcoólico, acidez total, luminosidade e ângulo da tonalidade da cor, sendo também importante a acidez volátil e a acidez fixa. Também não foi possível uma discriminação das amostras brancas através da ACP quanto à variedade de uva usada,

porém houve uma discriminação entre as amostras secas e suaves pelo Componente I (Figura 2).

Miele et al.⁸ conseguiram discriminar através de ACP cinco de um total de sete regiões vitícolas brasileiras, dentre elas o “Vale do São Francisco” e São Joaquim (“Serra Gaúcha”). Os vinhos produzidos no “Vale do São Francisco” foram caracterizados por maior teor de potássio, pH, densidade e acidez volátil. Os vinhos produzidos em São Joaquim se caracterizaram por variáveis relacionadas ao “corpo” e à cor do vinho.

CONCLUSÃO

Apesar dos valores relativamente altos de pH e da acidez volátil de algumas amostras, tanto os vinhos tintos quanto os brancos apresentaram os parâmetros analíticos dentro dos limites fixados pela legislação brasileira para bebidas alcoólicas, exceto o teor de açúcar residual total das amostras de vinho tinto analisadas. Com relação às amostras de vinho branco, a amostra C_b (“Vale do São Francisco”) foi a única que apresentou alteração na relação álcool em peso/extrato seco reduzido. As amostras de vinhos tintos apresentaram boa saturação da cor (C*), enquanto as amostras de vinhos brancos alcançaram níveis elevados de luminosidade (L*). Não foi possível uma discriminação das amostras com base apenas na variedade de uva utilizada (ou na sua procedência geográfica, no caso dos vinhos tintos) através da Análise de Componentes Principais.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) e ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC/CNPq) pelo apoio financeiro. Às vinícolas Miolo/Fazenda Ouro Verde, Bianchetti, Botticelli e Rio Sol pela doação de parte das amostras utilizadas neste estudo. Às professoras Deusdélia Teixeira de Almeida e Itaciara Larroza Nunes da Escola de Nutrição da Universidade Federal da Bahia pela colaboração na análise de cor das amostras.

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº229 de 25 de outubro de 1988. Aprovar as normas referentes à “complementação dos padrões de identidade e qualidade do vinho”. [acesso 31 mar 2010]. Disponível em: [http://www.agricultura.gov.br/].
2. Santos BAC. Compostos voláteis e qualidade dos vinhos secos jovens varietal Cabernet Sauvignon produzidos em diferentes regiões do Brasil [tese de doutorado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2006.
3. Meléndez ME, Sánchez MS, Íñiguez M, Saraiba LA, Ortiz MC. Psychophysical parameters of colour and the chemometric characterisation of wines of the certified denomination of origin ‘Rioja’. *Anal Chim Acta*. 2001;446:159-69.
4. Morrot G, Brochet F, Dubourdieu D. The color of odors. *Brain Language*. 2001;79:309-20.
5. Durán L, Costell E. Révision: percepción del gusto. Aspectos fisicoquímicos y psicofísicos. *Food Sci Technol Int*. 1999;5(4):299-309.
6. Bernardo E. Savoir goûter le vin: par le meilleur sommelier du monde. Paris: Ed. Plon; 2005.
7. Soares JM, Leão PCS (Ed. Téc.). A vitivinicultura no semiárido brasileiro. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Petrolina: Embrapa Semi-Árido; 2009.
8. Miele A, Rizzon LA, Zanús MC. Discrimination of Brazilian red wines according to the viticultural region, varietal, and winery origin. *Cienc Tecnol Aliment*. 2010;30(1):268-75.
9. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº24 de 8 de setembro de 2005. Aprova o manual operacional de bebidas e vinagres. [acesso 31 mar 2010]. Disponível em: [http://www.agricultura.gov.br/].
10. Maraschin RP. Caracterização química de vinhos Cabernet Sauvignon produzidos na Serra Gaúcha (ênfase em compostos fenólicos) [dissertação de mestrado]. Florianópolis (SC): Universidade Federal de Santa Catarina; 2003.
11. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic*. 1965;16:144-58.
12. Lee J, Durst RW, Wrolstad R. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. *J AOAC Int*. 2005;88(5):1269-78.
13. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Lei nº10970 de 12 de novembro de 2004. Altera dispositivos da Lei nº7678 de 8 de novembro de 1988, que dispõe sobre a produção, circulação e comercialização da uva e do vinho, e dá outras providências. [acesso 2010 mar 31]. Disponível em: [http://www.agricultura.gov.br/].
14. Jackson RS. Wine science: principles and applications. 3rd ed. San Diego (CA): Elsevier Academic Press; 2008.
15. Mota RV, Amorim DA, Favero AC, Gloria MBA, Regina MA. Caracterização físico-química e amins bioativas da cv. Syrah I – Efeito do ciclo de produção. *Cienc Tecnol Aliment*. 2009;29(2):380-5.
16. Rizzon LA, Miele A. Acidez na vinificação em tinto das uvas Isabel, Cabernet Sauvignon e Cabernet Franc. *Cienc Rural*. 2002;32(3):511-5.
17. Rizzon LA, Miele A. Avaliação da cv. Cabernet Sauvignon para elaboração de vinho tinto. *Cienc Tecnol Aliment*. 2002;22(2):192-8.
18. Andrade MF, Souza DJP, Silva JBP, Paim APS. Análise multivariada de parâmetros físico-químicos em amostras de vinhos tintos comercializados na região metropolitana do Recife. *Quim Nova*. 2008;31(2):296-300.

19. Rizzon LA, Miele A. Avaliação da cv. Merlot para elaboração de vinho tinto. *Cienc Tecnol Aliment*. 2003;23(Supl.):156-61.
20. Chavarria G, Santos HP, Zanus MC, Zorzan C, Marodin GAB. Caracterização físico-química do mosto e do vinho Moscato Giallo em videiras cultivadas sob cobertura de plástico. *Pesq Agropec Bras*. 2008;43(7):911-6.
21. Rizzon LA, Miele A. Avaliação da cv. Tannat para elaboração de vinho tinto. *Cienc Tecnol Aliment*. 2004;24(2):223-9.
22. Danilewics JC. Interaction of sulfur dioxide, polyphenols, and oxygen in a wine-model system: central role of iron and copper. *Am J Enol Vitic*. 2007;58(1):53-60.
23. Kondrashov A, Ševčík R, Benáková H, Koštířová M, Štípek S. The key role of grape variety for antioxidant capacity of red wines. *Eur e-J Clin Nutr Met*. 2009;4(1): e41-e46.
24. Lucena APS, Nascimento RJB, Maciel JAC, Tavares JX, Barbosa-Filho JM, Oliveira JE. Antioxidant activity and phenolics content of selected Brazilian wines. *J Food Compos Anal*. 2010;23:30-6.
25. Mamede MEO, Pastore GM. Compostos fenólicos do vinho: estrutura e ação antioxidante. *Bol CEPPA*, 2004;22(2):233-52.
26. Granato D, Katayama FCU, Castro IA. Assessing the association between phenolic compounds and the antioxidant activity of Brazilian red wines using chemometrics. *LWT – Food Sci Technol*. 2010;43(10):1542-9.
27. Minussi RC, Rossi M, Bologna L, Cordi L, Rotilio D, Pastore GM, Duran N. Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines. *Food Chem*. 2003;82:409-16.
28. Monagas M, Gómez-Cordovés C, Bartolomé B. Evaluation of different *Saccharomyces cerevisiae* strains for red winemaking. Influence on the anthocyanin, pyranoanthocyanin and non-anthocyanin phenolic content and colour characteristics of wines. *Food Chem*. 2007;104:814-23.
29. Pérez-Magariño S, González-Sanjosé ML. Application of absorbance values used in wineries for estimating CIELAB parameters in red wines. *Food Chem*. 2003;81:301-6.
30. Harbertson JF, Spayd S. Measuring phenolics in the winery. *Am J Enol Vitic*. 2006;57(3):280-8.
31. Darias-Martín JJ, Andrés-Lacueva C, Diaz-Romero C, Lamuela-Raventós RM. Phenolic profile in varietal White wines made in the Canary Islands. *Eur Food Res Technol*. 2008;226:871-6.

Physical and chemical characteristics and lycopene retention of dried tomatoes subjected to different pre-treatments

Características físicas, químicas e retenção de licopeno em tomates secos submetidos a diferentes pré-tratamentos

RIALA6/1359

Wilson César de ABREU*, Maria de Fátima Píccolo BARCELOS, Edson Pablo SILVA, Eduardo Valério de Barros Vilas BOAS

*Endereço para correspondência: Laboratory of Nutritional Biochemistry, Food Science Department. Federal University of Lavras. Mailbox: 3037. Zip code: 37200-000. Phone: 35 3829-1995. E-mail: wilson@dca.ufla.br.

Recebido: 08.02.2011 – Aceito para publicação: 13.05.2011

ABSTRACT

This study evaluated the physical and chemical characteristics (moisture, pH, acidity titratable, soluble solids and color) and lycopene retention in dried tomatoes submitted to different pretreatments. The tomatoes were cut longitudinally and submitted to the osmotic dehydration for 120 minutes. Six osmotic solutions were used with the following concentrations: NaCl 5%, NaCl 10%, NaCl 5% + sucrose 10%, NaCl 10% + sucrose 5%, sucrose 5%, sucrose 10% (w/v), and the osmotic dehydration was conducted with direct application of the solutes (NaCl or mixture of NaCl + sucrose). Soon afterwards the tomatoes were submitted to drying at 65°C for 12 hours. The osmo-convective drying promoted an increase in the level of soluble solids, titratable acidity and reduction of the pH, except for the sucrose solutions, that did not alter the pH of the tomatoes. The ternary solution (NaCl + sucrose), binary (NaCl 10%) and the direct application of the solutes promoted significant moisture reduction in relation to the control. The osmotic solutions only containing sucrose or NaCl 5% presented lycopene retention significantly superior to the other treatments. The use of the osmotic dehydration as pretreatment for drying of the tomato can contribute to accelerate the drying process and to preserve the tomato lycopene level.

Keywords. dried tomato, osmotic dehydration, lycopene.

RESUMO

Este estudo avaliou as características físicas e químicas (umidade, pH, acidez titulável, sólidos solúveis e cor) e a retenção de licopeno em tomates secos submetidos a diferentes pré-tratamentos. Os tomates foram cortados longitudinalmente e submetidos à desidratação osmótica por 120 minutos. Foram utilizadas seis soluções osmóticas com as seguintes concentrações: NaCl 5%, NaCl 10%, NaCl 5% + sacarose 10%, NaCl 10% + sacarose 5%, sacarose 5%, sacarose 10% (p/v). Foi também realizada desidratação osmótica com aplicação direta dos solutos (NaCl ou mistura de NaCl + sacarose). Em seguida, os tomates foram submetidos à secagem, a 65°C, durante 12 horas. A secagem osmoconvectiva promoveu aumento do teor de sólidos solúveis, acidez titulável e redução do pH, exceto para soluções de sacarose que não alteraram o pH dos tomates. As soluções ternárias (NaCl + sacarose), binária (NaCl 10%) e a aplicação direta dos solutos promoveram redução significativa da umidade em relação ao controle. As soluções osmóticas contendo apenas sacarose ou com NaCl 5% determinaram retenção de licopeno significativamente superior aos demais tratamentos. A utilização da desidratação osmótica como pré-tratamento para secagem do tomate pode contribuir para acelerar o processo de secagem e preservar o teor de licopeno de tomates.

Palavras-chave. tomate seco, desidratação osmótica, licopeno.

INTRODUCTION

The tomato is the second most produced horticultural product in the world, only being surpassed by the potato. Due to its low cost and availability throughout the year, its consumption is observed in all of the socioeconomic classes, reaching a considerable portion of the Brazilian population. The tomato is being widely cultivated in Brazil, being the main vegetable in production volume, with prominence for the states of Goiás, São Paulo, Minas Gerais, Pernambuco and Bahia, with about 77% of the annual national production¹.

The tomato and its products have been considered foods with functional properties, due to the positive effect of its consumption on the prevention of chronic diseases such as certain cancers and coronary heart disease (CHD). Those effects are associated to the presence of antioxidant phytochemicals, among which lycopene stands out. The tomato and its products constitute the main source of lycopene of the human diet^{2,3}.

The dehydration of the tomato to obtain the dried tomato has been seen as an important alternative to prolong the consumption period of the fruit, avoid production surplus waste and a commercialization alternative when the fresh tomato supply is higher than the demand⁴.

The production of the dried tomato has been increasing in recent years, due to its growing appreciation in Brazilian cookery. Some research has been conducted with the objective of developing techniques to minimize alterations in the color, flavor and texture and loss of nutrients and lycopene due to the drying conditions applied to tomato^{5,6}. Osmotic dehydration has been used as a pre-treatment for tomato drying, because it reduces the drying time, generating savings and improving the sensorial characteristics of the final product^{6,7}.

Osmotic dehydration of foods consists of the partial removal of water by the pressure caused when the product is put in contact with a hypertonic solution of solutes (sugar, salt or both), thus decreasing the food water activity. When the food is put in the hypertonic solution, the water passes through the cell walls of the fruit to the solution⁷. Its application in the dehydration of the tomato can contribute to preserve the lycopene levels. However, the use of solutes and different concentrations can alter the physical characteristics and chemistries of the final product.

The preservation of the lycopene content of tomato during drying is essential to maintain their functional

properties. This work was conducted with the objective of evaluating the effects of the application of osmotic dehydration, as pre-treatments for the drying of tomatoes, on their physical and chemical characteristics and on lycopene retention.

MATERIAL AND METHODS

This work was conducted in the Food Science Department of the Federal University of Lavras (UFLA), in Lavras, Minas Gerais. In this study, tomatoes of the Bonus cultivar were used, produced in an organic system in the horticulture sector of the Federal University of Lavras. After harvest, the tomatoes were selected, washed in running water to eliminate dirt and stored under room temperature until completely ripe, reaching an intense red coloration in every fruit.

The tomatoes were divided in 2 kg lots, sanitized in chlorinated water (200 ppm), for 15 minutes. Soon afterwards, under room temperature, they were cut with stainless steel knife perpendicular to the longitudinal direction, forming pieces corresponding to a fourth of the tomato. The seeds were removed with a stainless steel spoon.

The obtaining of the dried tomato was carried out using two different techniques: osmo-convective (OCD) and hot air convective drying (CD). In the osmo-convective drying, the hot air convective drying is preceded by osmotic dehydration. The tomatoes were submitted to the osmotic dehydration, for 120 minutes, as pre-treatment for drying convective. To perform the osmotic dehydration (OD), the cut tomatoes, without seeds, were immersed in different solutions, at a proportion of 1:3 tomato/solution (g/mL), as follows: OD₁ (NaCl 5%), OD₂ (NaCl 10%), OD₃ (NaCl 5% + sucrose 10%), OD₄ (NaCl 10% + sucrose 5%), OD₅ (sucrose 5%), OD₆ (sucrose 10%) (w/v). Osmotic dehydration without immersion in solution was also conducted, with the direct application of solutes (OD₇ NaCl and OD₈ NaCl + sucrose, proportion 1:1, w/w), in which the tomatoes were covered by a fine layer of NaCl, isolated or combined with sucrose.

After the osmotic dehydration, the tomatoes were distributed in stainless steel trays and placed in an oven, with air circulation at 65°C. The trays remained in the oven for 12 hours and then the samples removed and submitted to the physical and chemical analyses. For the control treatment, 2 kg of tomatoes was submitted to direct drying (convective drying-CD) in the oven without being submitted to the osmotic dehydration.

All of the physical and chemical analyses were determined in the dried tomatoes from the osmo-convective and convective drying and in the fresh tomato.

The coloration was measured using the Minolta CR-400 colorimeter, with the determination in the system CIE L*, a*, b*, with a standard white ceramic plate. The readings were taken directly at the central points of the internal (endocarp) and external (epicarp) surfaces of the dried tomato slices. Five readings of each sample were taken.

The moisture was determined by the gravimetric method employing heat, according to the procedure of the Association of Official Analytical Chemists – AOAC⁸. The soluble solids level (SS) was determined using the Atago, I model N-1 refractometer, according to AOAC⁸.

The hydrogenic potential was measured using a portable Ingold, pH206 pHmeter. The titratable acidity was determined by titration with a solution of NaOH 0.1M and phenolphthalein as indicator, according to the Adolfo Lutz Institute⁹. The results were expressed in mg citric acid.100g⁻¹ of the fruit.

The lycopene level was determined according to the method proposed by Nagata e Yamashita¹⁰. The lycopene was extracted using a mixture of acetone and hexane (4:6). The extracts were submitted to spectrophotometer readings at different wavelengths (453, 505, 645 and 663 nm) and the lycopene concentration was calculated according to the equation:

$$\text{Lycopene (mg/100 mL)} = 0.0458.A_{663} + 0.204.A_{645} + 0.372.A_{505} - 0.0806.A_{453}$$

The results were transformed to be expressed in µg.g⁻¹.

The lycopene retention percentage was calculated according to the equation

$$\%R = \frac{\text{lycopene in dried tomato } (\mu\text{g} \times 100\text{g}^{-1} \text{ DM}) \times 100}{\text{lycopene in fresh tomato } (\mu\text{g} \times 100\text{g}^{-1} \text{ DM})}$$

where: DM = dry matter

The study was conducted using a completely randomized design (CRD) with three repetitions, totaling 10 treatments and 30 portions. For the data analysis, the SISVAR program was used¹¹. The data were submitted to the variance analysis, complemented with the Scott-Knott test to 5% of probability.

RESULTS AND DISCUSSION

The averages of moisture, pH, soluble solids (SS), titratable acidity (TA) and SS/TA of fresh tomatoes and those submitted to osmo-convective (OCD) and convective (CD) drying are presented in Table 1.

The osmo-convective and convective drying reduced the moisture of the tomatoes significantly, after 12 hours of drying. The osmo-convective drying was more effective than the convective drying (control), when solution of NaCl at 10%, (OCD₂), ternary solutions of NaCl + sucrose (OCD₃ and OCD₄) and solutes without immersion (OCD₇ and OCD₈) were used. Corrêa et al.⁵ also observed that the osmotic dehydration favors the loss of moisture of the tomato during the drying process. The application of the osmotic dehydration as pre-treatment can reduce the tomato drying time, reducing the costs of this processing stage.

Considering only the osmo-convective drying, the pre-dehydration with solutes without immersion was more effective than the pre-dehydration with immersion in solutions, due to greater solute concentration of these treatments that increase the osmotic effect. It is important to observe that the osmotic solutions only containing sucrose (OCD₆ and OCD₅) presented performance equal or inferior to the control (CD). That can occur due to the

Table 1. Average values of physical and chemical characteristics of tomatoes subjected to osmo-convective and convective drying and the fresh tomato

Treatments	Moisture (%)	pH	SS (°Brix)	TA (% citric acid)	SS/TA
OCD ₁	75.83 ^c	3.91 ^b	18.97 ^d	0.70 ^c	27.09 ^b
OCD ₂	71.56 ^d	3.72 ^c	27.50 ^b	0.81 ^b	34.10 ^a
OCD ₃	71.84 ^d	3.98 ^b	22.00 ^c	0.81 ^b	27.31 ^b
OCD ₄	70.35 ^d	3.65 ^c	22.00 ^c	0.80 ^b	27.61 ^b
OCD ₅	85.63 ^b	4.02 ^b	14.30 ^d	0.70 ^c	19.83 ^c
OCD ₆	79.07 ^c	4.03 ^b	16.87 ^d	0.72 ^c	23.95 ^b
OCD ₇	61.95 ^e	3.52 ^d	30.80 ^a	0.84 ^a	37.17 ^a
OCD ₈	63.03 ^e	3.64 ^c	33.00 ^a	0.85 ^a	38.65 ^a
CD	79.21 ^c	4.21 ^a	17.60 ^d	0.77 ^b	22.85 ^b
Fresh Tomato	95.07 ^a	4.14 ^a	5.50 ^e	0.38 ^d	14.34 ^c
CV	3.47	1.88	10.74	4.05	12.26

SS = soluble solids, TA = titratable acidity, OCD₁ = NaCl 5%, OCD₂ = NaCl 10%, OCD₃ = NaCl 5% + sucrose 10%, OCD₄ = NaCl 10% + sucrose 5%, OCD₅ = sucrose 5%, OCD₆ = sucrose 10%, OCD₇ = NaCl without immersion, OCD₈ = NaCl + sucrose without immersion, CD = convective drying. Averages followed by same letter in the column do not differ by Scott-Knott test at 5% probability

fact that the sugar forms a barrier on the tomato surface, hindering the exit of water from the fruit during drying¹². On the other hand, in spite of the sucrose presence in the ternary solutions (OCD₃ and OCD₄), these presented moisture reduction superior to the control. This was probably observed due to the presence of NaCl, that reduced the formation of the sugar layer on the food surface, promoting higher dehydration rates⁶.

The osmo-convective drying reduced the pH of the tomato significantly compared to the control and fresh tomato. The pre-dehydration with NaCl without immersion (OCD₇) led to the highest pH reduction among all the treatments, due to higher concentration of organic acids, followed by NaCl + sucrose (OCD₈) and NaCl 10% in solution (OCD₂). Venske et al.¹³ found pH average equal to 3.98 in tomatoes dehydrated to 81.6% moisture. The reduction of the pH reduces the microbial proliferation, favoring the conservation of the product¹⁴.

The dehydration, in spite of the treatment used, produced increase in the concentration of the organic acids, causing significant elevation of the titratable acidity (TA) of the tomato (Table 2). The tomatoes submitted to the osmotic dehydration with sucrose solution (OCD₅ and OCD₆) and NaCl at 5% (OCD₁) presented significantly lower TA than the control. However, the tomatoes submitted to the pre-dehydration with solutes without immersion (OCD₇ and OCD₈) presented TA significantly higher than the control ($p < 0.05$). The TA of the tomatoes submitted to the other treatments did not differ from that observed in the control. The elevation of the TA promoted by the dehydration can be associated to the tendency of the fall of the pH of the dried tomatoes. However, the elevation of the TA was not proportional to the water loss observed with the drying. Other authors have observed an increase of the TA in tomatoes submitted to drying^{13,15}.

The convective and osmo-convective dehydration promoted significant increase ($p < 0.05$) of the tomato soluble solids (SS) levels. That increase is due to the loss of water during the dehydration of the tomato and the transfer of solutes during the pre-dehydration.

The treatments with osmo-convective drying without immersion (OCD₇ and OCD₈), which produced the highest water loss during drying, also determined higher SS levels. Unlike the other treatments, the osmotic pre-dehydration with solution of NaCl at 5% and with sucrose solutions at 5% and 10% determined SS levels statistically equal to those observed in the control. In general, the SS level of the fresh tomato varies between 4° and 6° Brix and

it increases with maturation and dehydration of the fruit¹⁶. Silva et al.¹⁵ found higher SS levels in tomatoes submitted to the osmo-convective drying with solution of NaCl 5% + sucrose 10% (28.33 °Brix) than with solution of NaCl at 10% (24.33 °Brix), different from that observed in this study. The presence of sodium chloride in the solution can favor the sucrose incorporation in the tomato, due to the increase of the cell membrane permeability, caused by physical alterations provoked by the sodium chloride⁶. The elevation of the SS levels was not totally proportional to the moisture reduction of the tomatoes, indicating that solute transfer occurred during the osmotic dehydration.

The SS/TA ratio, that has a decisive role in the flavor of the tomato, increased significantly compared to fresh tomato, except for the treatment with sucrose solution at 5%. However, only the treatments with osmo-convective drying without immersion (OCD₇ and OCD₈) and with immersion in solution of 10% sodium chloride (OCD₂) produced significant increase of the SS/TA ratio in relation to the control (CD). According to Lisiewska and Kmiecik¹⁷, SS/TA ratio values higher than 10 indicate optimum combination between sugar and acidity, being correlated with mild flavor. All of the dried tomatoes of the present study presented an SS/TA ratio above 10. It is worth remembering that the dried tomato in preserves, available in the retail market, will have the flavor influenced by the mixture of oils and seasonings used to elaborate the preserve. In general, mixtures of olive oil and soy or sunflower oil are used, with addition of seasonings such as garlic, salt and oregano.

Analyzing the joint data of Table 1, the osmo-convective dehydration with NaCl without immersion (OCD₇) stands out, that determined lower moisture and pH values and higher SS/TA ratio, that potentially can be associated to longer shelf life and better flavor.

The average levels of lycopene and its retention percentage undergoing drying tomatoes and fresh tomatoes are presented in Table 2.

The water removal by the osmo-convective and convective drying processes led to a significant increase (between 3.1 and 5.8 times) of the lycopene level concentration in the dried tomatoes compared to the fresh tomatoes. Various studies have shown higher lycopene levels in the dehydrated tomato in relation to the fresh tomato^{3,18,19}. Muratore et al.¹⁸ verified a lycopene level increase from 2.8 to 3.5 times in dehydrated tomatoes. The increase of the lycopene level observed in products derived from the tomato, such as extracts and sauces, is due to the

Table 2. Average values of the lycopene content and retention percentage of tomatoes subjected to osmo-convective and convective drying and the fresh tomato

Treatments	Lycopene ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ FM*)	Lycopene ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DM*)	Lycopene Retention (%)
OCD ₁	105.34 ^b	435.83 ^a	97.53 ^b
OCD ₂	96.03 ^c	353.76 ^c	80.50 ^d
OCD ₃	107.87 ^b	383.05 ^b	85.72 ^c
OCD ₄	80.54 ^e	271.64 ^d	60.78 ^e
OCD ₅	67.83 ^f	472.02 ^a	105.57 ^a
OCD ₆	92.30 ^c	441.00 ^a	98.65 ^b
OCD ₇	93.56 ^c	245.69 ^d	54.98 ^f
OCD ₈	126.87 ^a	343.16 ^c	76.79 ^d
CD	67.28 ^f	328.92 ^c	73.60 ^d
Fresh Tomato	22.03 ^g	446.85 ^a	100.00
CV	4.70	5.42	3.83

*FM=fresh matter, DM=dry matter, OCD₁=NaCl 5%, OCD₂=NaCl 10%, OCD₃=NaCl 5%+ sucrose 10%, OCD₄=NaCl 10% + sucrose 5%, OCD₅=sucrose 5%, OCD₆=sucrose 10%, OCD₇=NaCl without immersion, OCD₈=NaCl + sucrose without immersion, CD = convective drying. Averages followed by same letter in the column do not differ by Scott-Knott test at 5% probability

action of the temperature that favors the rupture of the cell walls, increasing the availability of the free lycopene²⁰. Furthermore, during the tomato processing, moisture reduction occurs, increasing the lycopene concentration²¹.

The tomatoes submitted to the osmo-convective drying with immersion in solutions with sucrose (OCD₅ and OCD₆) or NaCl 5% (OCD₁) had a significantly higher average lycopene retention than the other treatments. Also was observed that the increase of the sodium chloride level in the osmotic solutions reduced the lycopene retention, while the increase of the sucrose level in the ternary solutions elevated the retention of this carotenoid. Tonon et al.²² also found higher lycopene retention in tomatoes submitted to the osmotic dehydration with solutions containing sucrose. According to Shi et al.²³ the sugar penetrates into the cell matrix and increases the bonding force of the lycopene with the cell matrix, reducing the lycopene oxidation.

The treatment with 5% sucrose presented a lycopene retention percentage above 100%. This probably occurred because the lycopene was not fully extracted in fresh tomatoes due to be bonded to cell matrix components, which hinders its extraction from the fruit. According to Rodrigues-Amaya²⁴ heat treatment breaks down the structures of the tomato cell matrix improving the extraction of lycopene.

Table 3. Average values and standard deviations of the color parameters L* a* b*, in tomatoes subjected to osmo-convective and convective drying and the fresh tomato

Treatments	Internal wall			External wall		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*
OCD ₁	36.85 ^b	23.60 ^b	11.33 ^b	37.40 ^a	25.77 ^b	15.41 ^b
OCD ₂	37.43 ^b	29.26 ^a	15.34 ^a	39.15 ^a	26.19 ^b	17.04 ^b
OCD ₃	32.81 ^c	27.61 ^a	14.15 ^a	36.60 ^b	25.39 ^b	17.71 ^b
OCD ₄	38.12 ^b	27.11 ^a	14.87 ^a	36.05 ^b	28.79 ^b	22.20 ^a
OCD ₅	38.50 ^a	23.26 ^b	14.46 ^a	35.88 ^b	27.10 ^b	20.74 ^a
OCD ₆	36.83 ^b	28.76 ^a	15.20 ^a	35.47 ^b	25.88 ^b	18.32 ^b
OCD ₇	39.68 ^a	30.52 ^a	17.88 ^a	37.98 ^a	30.72 ^a	20.95 ^a
OCD ₈	39.40 ^a	29.41 ^a	16.33 ^a	37.77 ^a	34.76 ^a	23.17 ^a
CD	39.78 ^a	21.19 ^b	9.61 ^b	39.43 ^a	23.53 ^b	14.15 ^b
Fresh Tomato	33.95 ^c	20.23 ^b	9.68 ^b	37.38 ^a	26.78 ^b	26.06 ^a
CV	4.82	5.39	3.97	4.82	12.70	13.97

OCD₁= NaCl 5%, OCD₂ = NaCl 10%, OCD₃ = NaCl 5%+ sucrose 10%, OCD₄ = NaCl 10%+ sucrose 5%, OCD₅ = sucrose 5%, OCD₆ = sucrose 10%, OCD₇ = NaCl without immersion, OCD₈ = NaCl + sucrose without immersion, CD = convective drying. Averages followed by same letter in the column do not differ by Scott-Knott test at 5% probability

The osmotic dehydration can be used as a first step in the drying of tomatoes, because it contributes to the removal of water and the preservation of the lycopene level and color, which is the most important quality attribute of that fruit²⁵. Sanjinez-Argandon et al.²⁶ verified that the use of the osmotic dehydration as a pre-treatment in the guava drying process improved the final quality of the product, increasing the vitamin C and carotenoid retention. Those results were attributed to the reduction of the product of oxidation due to the formation of a sugar layer on the guava surface, reducing the contact with oxygen. The results observed in the present study show that the lycopene retention was only favored with the osmotic solutions with NaCl 5% and NaCl 5% + 10% sucrose (OCD₁ and OCD₃), and 5% or 10% sucrose (OCD₅ and OCD₆). The pre-dehydration with NaCl without immersion promoted lycopene retention inferior to that of the control.

The average values of the color parameters L*, a*, and b* of the dried and fresh tomatoes measured on the internal and external surfaces of the slices are presented in Table 3.

For tomatoes, the coloration is the main purchase decision factor used by the consumer²⁷. The parameters L* and a* presented significant variation, mainly in the internal wall of the tomatoes. While the parameter L*

(clarity) presented tendency of increase in the internal wall, except for the treatment with solution of NaCl 5% + 10% sucrose (OCD₃), in the external wall, that parameter remained stable for most of the treatments. In the external wall, the pre-dehydration with solutions containing sucrose led to significant reduction of the L* parameter in relation to the fresh tomato. The darkening observed in those treatments can be associated to the higher formation and accumulation of hydroxymethylfurfural (HMF). Cámara et al.²⁸ (2003) found a higher HMF level in ketchup, a product that receives sucrose addition during processing, compared to the industrialized tomato juice.

The convective drying did not significantly modify the a* value of the internal and external walls of the tomatoes, suggesting little, or no, interference in the red coloration of the dehydrated fruits, in comparison with the fresh tomato. The same was observed for the osmo-convective drying using NaCl 5% (OCD₁) and sucrose 5% (OCD₅). While the other treatments led to a higher a* value in the internal wall of the tomato, only the treatments OCD₇ and OCD₈ led to it in the external wall. Because the red coloration is desirable in tomato and its products, the treatments OCD₇ and OCD₈ stand out, which resulted in the highest a* values in the dried tomatoes.

In general, the coloration remained more stable in the external wall of the tomatoes, probably due to protection exercised by the presence of the cuticle that minimizes the solute exchanges and contact with oxidizing agents.

A significant increase of the parameter b* was observed for all the treatments in the internal wall, except for the pre-dehydration with NaCl 5%. That fact can be related to the possible increase of the cis lycopene isomers, that give a more orange tone to the tomato. On the other hand, in the external wall, the b* values presented significant reduction for most of the treatments (OCD₁, OCD₂, OCD₃, OCD₆ and CD). According to Heredia et al.²⁹ (2010), the emergence of orange tones in dehydrated tomatoes is related to the presence of cis lycopene isomers. Shi et al.²³ found L* values equal to 36.7 and 38.4, for tomatoes dried in a vacuum system at 55°C with osmotic pre-dehydration and fresh tomatoes, respectively. Silva et al.¹⁵ observed increase of the L*, a* and b* values in tomatoes submitted to the osmo-convective drying with osmotic solutions of NaCl 10% and NaCl 5% + sucrose 10%, the solution containing sucrose having preserved the color parameters better.

Emphasize the importance of verifying, in future works through sensorial analyses, if the color alterations

detected using the color parameters L*, a* and b*, are sufficient to modify consumer preference in relation to the dried tomato.

CONCLUSIONS

Different types and concentrations of solutes influence the effectiveness of the osmotic dehydration differently, as a pre-treatment in the osmo-convective dehydration process.

The osmo-convective dehydration, using pure NaCl, presents as the most effective, from the preservation and sensorial potential point of view, for jointly leading to lower moisture and pH values and higher SS/TA ratio and a* value in the dried tomatoes, although it led to a 45% decrease in the lycopene retention;

The increase of the sodium chloride concentration in the binary solutions harms the lycopene retention. To the contrary, the sucrose addition to the ternary solutions of sodium chloride and sucrose favors the lycopene retention.

The osmo-convective dehydration with 5% sucrose solution, followed by the 10% sucrose and 5% NaCl solutions, led to higher lycopene retention in the dried tomato.

ACKNOWLEDGEMENTS

To CNPq, CAPES and FAPEMIG for the financial support essential to the research.

REFERENCES

1. Sobreira FM, Almeida GD, Coelho RI, Rodrigues R, Matta FP. Qualidade de sabor de tomates dos tipos salada e cereja e sua relação com caracteres morfoagronômicos dos frutos. *Ciênc Agrotecnol*. 2010;34(4):1015-23.
2. Kabori CN, Huber LS, Kimura M, Rodriguez-Amaya DB. Teores de carotenóides em produtos de tomate. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2010;69(1):78-83.
3. Shen YC, Chen SL, Wang CK. Contribution of tomato phenolics to antioxidation and down-regulation of blood lipids. *J Agric Food Chem*. 2007;55(16):6475-80.
4. Camargo GA, Haj-Isa N, Queiroz MR. Avaliação da qualidade de tomate seco em conserva. *Rev Bras Eng Agríc Amb*. 2007;11(5):521-6.
5. Corrêa JLG, Filho EDS, Batista MB, Arola F, Fioreze R. Desidratação osmótica de tomate seguida de secagem. *Rev Bras Prod Agro*. 2008;10(1):35-42.

6. Tonon RV, Baroni AF, Hubinger MD. Estudo da desidratação osmótica de tomate em soluções ternárias pela metodologia de superfície de resposta. *Cienc Tecnol Alim*. 2006;26(3):715-23.
7. Gomes AT, Cereda MP, Vilpoux O. Desidratação osmótica: uma tecnologia de baixo custo para o desenvolvimento da agricultura familiar. *Rev Bras Ges Des Reg*. 2007;3(3):212-26.
8. Association of Official Analytical Chemistry. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemistry. 18th ed. Gaithersburg; 2005.
9. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo - Brasil). Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3^a ed. São Paulo (SP): Instituto Adolfo Lutz; 1985. v. 1, 371 p.
10. Nagata M, Yamashita I. Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit. *J Japan Soc Food Technol*. 1992; 39(10):925-8.
11. Ferreira DF. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. *In: Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade internacional de Biometria*, 45., 2000, São Carlos. Anais... São Carlos: UFSCar; 2000. p. 255-8.
12. Sereno AM, Hubinger MD, Comesana JF, Correa A. Prediction of water activity of osmotic solutions. *J Food Eng*. 2001;49(2/3):103-14.
13. Venske C, Santos J, Raupp DS, Grandigo JR, Borsato AV. Influência do grau de maturação nas características sensoriais de tomate seco envasado em óleo. *Publ. UEPG Ci. Exatas Terra, Ci. Agr. Eng*. 2004;10(3):33-40.
14. Monteiro CS, Balbi ME, Miguel OG, Penteado PTPS, Haracemiv SMC. Qualidade nutricional e atividade antioxidante do tomate "tipo italiano". *Alim Nutr*. 2008;19(1):25-31.
15. Silva VKL, Pinheiro ESP, Domingues MAF, Aquino AC, Figueredo EA, Costa JMC, et al. Efeito da pressão osmótica no processamento e avaliação da vida de prateleira de tomate seco. *Semina Cienc Agrar*. 2010;31(1):55-66.
16. Anese M, Falcone P, Fogliano V, Nicolli MC, Massini R. Effect of equivalent thermal treatments on the color and the antioxidant activity of tomato purees. *J Food Sci*. 2002;67(9):3442-6.
17. Lisiewska S, Kmiciek W. Effect of storage period and temperature on the chemical composition and organoleptic quality of frozen tomato cubes. *Food Chem*. 2000;70(2):167-73.
18. Muratore G, Rizzo V, Licciardello F, Maccarone E. Partial dehydration of cherry tomato at different temperature and nutritional quality of the products. *Food Chem*. 2008;111(4):887-91.
19. Toor RK, Savage GP, Heeb A. Influence of different types of fertilisers on the major antioxidant components of tomatoes. *J Food Comp Anal*. 2006;19(1):20-7.
20. Mayeaux M, Xu A, King JM, Prinyawiwatkul W. Effects of cooking conditions on the lycopene content in tomatoes. *J Food Sci*. 2006;71(8):461-4.
21. Periago MJ, Rincon F, Jacob BK, Garcia-Alonso J, Ros G. Detection of key factors in the extraction and quantification of lycopene from tomato and tomato products. *J Agric Food Chem*. 2007;55(22):8825-9.
22. Tonon RV, Baroni AF, Hubinger MD. Osmotic dehydration of tomato in ternary solutions: Influence of process variables on mass transfer kinetics and an evaluation of the retention of carotenoids. *J Food Engin*. 2007;82(4):509-17.
23. Shi J, Le Maguer M, Kakuda Y, Lipitay A, Niekamp F. Lycopene degradation and isomerization in tomato dehydration. *Food Res Int*. 1999;32(1):15-21.
24. Rodriguez-Amaya DB. Latin American food sources of carotenoids. *Arch Latinoam Nutr*. 1999;49(3):74-84.
25. Mandala IG, Anagnostaras EF, Oikonomou CK. Influence of osmotic dehydration conditions on apple air-drying kinetics and their quality characteristics. *J Food Engin*. 2005;69(3):307-16.
26. Sanjinez-Argandon AEJ, Cunha EJ, Menegalli FC, Hubinger MD. Evaluation of total carotenoids and ascorbic acid in osmotic pretreated guavas during convective drying. *Ital J Food Sci*. 2005;17(3):305-14.
27. Camelo AFL, Gómez PA. Comparison of color indexes for tomato ripening. *Hortic Bras*. 2004;22(3):534-37.
28. Cámara M, Matallana MC, Sánchez-Marta MC, Liko AR, Labra E. Lycopene and hydroxymethylfurfural (HMF) evaluation in tomato products. *Acta Horti*. 2003;1(613):365-71.
29. Heredia A, Peinado I, Rosa E, Andrés A. Effect of osmotic pre-treatment and microwave heating on lycopene degradation and isomerization in cherry tomato. *Food Chem*. 2010;123(1):92-8.

Avaliação sensorial e físico-química de pescado processado

Sensory and physicochemical evaluation of processed fish

RIALA6/1360

Maria do Carmo Andion FARIAS¹, José de Arimatéa FREITAS^{2*}

*Endereço para correspondência: ²Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Instituto de Saúde e Produção Animal, Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA, Travessa Humaitá, nº 1.130, Apto. 103, Pedreira, Belém/PA, Brasil. CEP 66085-220. E-mail: jaf.bel@terra.com.br.

¹Gerência de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Pará – ADEPARA.

Recebido: 03.01.2011 – Aceito para publicação: 31.05.2011

RESUMO

O pescado é um alimento de elevado valor nutricional, mas, por ser rapidamente perecível, é relevante efetuar a avaliação de sua qualidade. Para avaliar a qualidade dos produtos de pescado beneficiados por 24 indústrias paraenses, foi realizado um estudo abrangendo-se os dados de análises feitas durante nove meses (de maio de 2005 a janeiro de 2006). As características sensoriais e físico-químicas e a verificação de temperatura de conservação foram avaliadas em 120 amostras de matérias-primas recebidas para processamento e 133 produtos beneficiados, para averiguar a conformidade dos produtos com os parâmetros oficiais. Foram verificados elevados percentuais de conformidade, respectivamente, nos parâmetros sensoriais e de temperatura de conservação (96,70 e 84,20%); pH e teor de N-BVT (79,00 e 100,00%); provas de cocção e do gás sulfídrico (99,20 e 99,20%) e reação de amônia (99,20%). Esses resultados demonstram que a matéria-prima processada e os produtos beneficiados analisados são adequados para o consumo concernente às características sensorial e físico-química.

Palavras-chave. alimentos, higiene e controle de qualidade de alimentos, vigilância sanitária de pescado.

ABSTRACT

Fish is a highly nourishing food and the raw materials are commonly used for food industries. Due to its high perishability it is crucial to assess the quality of fish processed products. For evaluating the quality of fish products from 24 industries in Pará state, North Brazil, a study was performed enclosing data from nine months (from May 2005 to January 2006) analyses on sensory and physicochemical characteristics, and on the storage temperature in 120 of fish raw material samples and 133 of processed products. This investigation was carried out for assessing the conformity of the products with official parameters. High percentages of conformity with the established parameters were found, being sensory and storage temperature (96.70 and 84.20%); pH and N-BVT levels (79.00 and 100.00%); coction and sulphidric gas proofs (99.20 and 99.20%); and ammonia reaction (99.20%), respectively. This study indicated that both the fish raw material and the processed fish showed satisfactory quality concerning the sensory and physicochemical parameters.

Keywords. foods, hygiene and quality control of foods, sanitary surveillance of fish.

INTRODUÇÃO

O pescado é rico em proteínas, aminoácidos essenciais e minerais, mas é também um produto perecível e, por isso, passível de avaliações de sua qualidade^{1,2}.

Fatores intrínsecos (pH próximo da neutralidade, elevados teores de nutrientes e de atividade de água), extrínsecos (manuseio, transporte, cadeia de frio e condições higiênicas) e microbiota com intensa atividade metabólica influenciam o grau de frescor e a qualidade do pescado³.

Por deteriorar-se gradualmente desde a captura, o pescado sofre alterações passíveis de impedir sua comercialização; logo, é necessário manter sua estabilidade físico-química e avaliar suas características antes do processamento e consumo, empregando-se testes e indicadores de qualidade⁴⁻⁶.

O estado do Pará é um importante produtor de pescado, cuja produção é dirigida para o consumo interno e para o mercado externo, logo precisa oferecer produtos de elevada qualidade, como matéria-prima destinada ao processamento industrial e alimento destinado ao consumo.

O objetivo do presente trabalho foi determinar a conformidade do pescado beneficiado por indústrias paraenses com os parâmetros de qualidade sensorial e físico-química.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Laudos analíticos oficiais do período de maio de 2005 a janeiro de 2006 referentes aos produtos de 24 indústrias processadoras de pescado constituíram o objeto da presente pesquisa.

As indústrias processadoras estão localizadas nos municípios de Belém (13), Vigia (2), São João do Pirabas (1), Bragança (2), Salvaterra (1), Óbidos (2) e Santarém (2), no estado do Pará, eram registradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e operavam sob a vigilância sanitária do Serviço de Inspeção Federal (SIF/MAPA).

Métodos

Dados de análises (sensoriais, de avaliação da temperatura de conservação das matérias-primas, e físico-químicas dos produtos processados), levantados nos laudos analíticos, foram comparados com os limites dos parâmetros oficiais, de acordo com o “Regulamento

de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal”⁴, para determinação de percentuais de conformidade dos produtos com os seguintes atributos (qualitativos ou quantitativos):

1. Aparência das guelras, dos olhos, da pele (ou escamas), odor, textura e danos físicos e temperatura de conservação, avaliados nas indústrias processadoras segundo o “Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Peixe Fresco (Inteiro e Eviscerado)”⁷;

2. pH, conteúdo de nitrogênio básico volátil total (N-BVT), reação de amônia e provas de cocção e gás sulfídrico, determinados no Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO-Pará), conforme os “Métodos Físicos e Químicos Oficiais para Controle de Produtos de Origem Animal e Seus Ingredientes”⁸.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Matérias-primas e produtos processados apresentaram elevados percentuais de conformidade com os limites das análises efetuadas (Tabelas 1 e 2).

As matérias-primas recebidas para processamento apresentaram 96,70% de conformidade com as características sensoriais, somente 3,30% das amostras foram considerados inadequados para o processamento, enquanto apenas 15,80% sofreram abusos de temperatura (Tabela 1).

Nas indústrias de pescado, a avaliação sensorial, ainda que não seja o único, tem sido o controle de qualidade rotineiramente empregado na inspeção do pescado recebido para processamento. Resultados da observação dos atributos aparência da pele, mucosidade superficial, aspectos dos olhos, brânquias, opérculos, vísceras, musculatura e odor de amostras de tucunaré (*Chicla* sp) apresentaram conformidade com os parâmetros fixados pela legislação brasileira⁹. Filés congelados de peixes de diversas espécies (namorado, abrótea, castanho, cação, congro-rosa, corvina, linguado, merluza, pescada e pescadinha) foram considerados de boa qualidade segundo os atributos de odor e aspecto geral¹⁰.

Tabela 1. Percentagem de conformidade com os limites dos parâmetros de qualidade sensorial e de temperatura de conservação de pescado recebido para processamento por indústrias paraenses, no período de maio de 2005 a janeiro de 2006. Belém, 2011

Amostra (n)	Avaliação sensorial				Temperatura (°C)			
	Conformidade		Não conformidade		≤5		≥5	
	n	%	n	%	n	%	n	%
120	116	96,7	4	3,3	101	84,2	19	15,8

Tabela 2. Percentagem de conformidade com os limites dos parâmetros de qualidade físico-química em produtos de pescado processados por indústrias paraenses no período de maio de 2005 a janeiro de 2006. Belém, 2011

Produto	Análises									
	pH		Cocção		Amônia		Gás sulfídrico		N-BVT	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Peixe evis. congelado	46	90,2	51	100,0	51	100,0	51	100,0	51	100,0
Filé peixe congelado	47	87,0	54	100,0	54	100,0	54	100,0	54	100,0
Peixe posta congel.	8	89,0	9	100,0	9	100,0	9	100,0	9	100,0
Peixe inteiro congel.	1	50,0	1	50,0	1	50,0	1	50,0	2	100,0
Peixe evisc. fresco	3	75,0	1	25,0	4	100,0	4	100,0	4	100,0
Camarão s/cabeça congel.	0	0,0	10	100,0	10	100,0	10	100,0	10	100,0
Cauda lagosta cong.	0	0,0	3	100,0	3	100,0	3	100,0	3	100,0
Total	105	79,0	132	99,2	132	99,2	132	99,2	133	100,0

Baixo índice de não conformidade, 2,90%, semelhante ao da presente pesquisa (Tabela 1), foi também determinado na análise sensorial de amostras de “branquinha” (*Curimatus ciliatus*)¹¹. A conformidade do pescado processado pelas indústrias paraenses com os limites sensoriais contrastou, no entanto, com as observações feitas em peixe-serra (*Pristis pectinata*), que apresentou-se alterado em 44,45% das amostras analisadas¹². A corvina (*Micropogonias furnieri*) eviscerada e conservada a 0 °C, mesmo tendo sido considerada apta para o consumo até o 14º dia de estocagem, demonstrou perda de qualidade sensorial¹³.

O pescado recebido pelas indústrias paraenses demonstrou conformidade com os limites da temperatura de conservação, ≤5 °C (Tabela 1), apresentando variações (de 0,1 a 9,3 °C). O abuso de temperatura, >5 °C, foi observado em 15,80% das amostras analisadas. Em pescado resfriado exposto à venda no varejo em Portugal também foi observado abuso de temperatura, 8 °C¹⁴.

Todas as 133 (100,00%) amostras de produtos de pescado apresentaram conformidade com o limite estabelecido para N-BVT (até 30mg N/100g), mas o peixe inteiro congelado revelou somente 50,00% de conformidade na reação da amônia, contrariamente aos demais produtos, que apresentaram 100,00% de conformidade nessa prova. Nas demais provas, os produtos de pescado revelaram, em variados – mas, elevados, percentuais, conformidade com os limites dos parâmetros físico-químicos (Tabela 2).

Individualmente, o peixe eviscerado fresco, peixe inteiro congelado, camarão sem cabeça congelado e cauda de lagosta congelada não apresentaram conformidade com os limites qualitativos e quantitativos, em diferentes percentuais, respectivamente, no pH e na prova da cocção; no pH, na prova da cocção, na reação de amônia

e na prova do gás sulfídrico; no pH; e no pH (Tabela 2). Elevados percentuais de não conformidade com o limite oficial fixado para o pH (6,8) foram também determinados em filé de peixe congelado, peixe fresco, peixe fresco, camarão-rosa e carne de caranguejo-uçá^{6,10,15-17}.

Valores médios do pH, 8,21 e 7,75, em carne de caranguejo-uçá (*Ucides cordatus*) comercializada em São Caetano de Odivelas e Belém, no estado do Pará, excederam em 100,00% o limite fixado pela legislação federal¹⁷.

As amostras de camarão sem cabeça congelado e de cauda de lagosta congelada analisadas na presente pesquisa também não apresentaram conformidade com o limite de pH fixado pela legislação nacional. A variação de pH parece estar relacionada às condições de armazenamento e a outros procedimentos aos quais mariscos como o camarão e a lagosta são submetidos imediatamente após a captura¹⁶.

Resistência à captura, decomposição de aminoácidos e ureia, espécie do pescado, tipo e carga microbiana, métodos de captura, manuseio, armazenamento e uso excessivo de polifosfatos após a filetagem são fatores que influenciam a variação do pH em produtos de pescado¹⁰.

Com exceção de peixe inteiro congelado, todos os produtos de pescado apresentaram elevado percentual de conformidade com a reação negativa (indicadora de boa conservação) na prova do gás sulfídrico (Tabela 2). Total conformidade para gás sulfídrico foi observada em peixe-serra (*Pristis pectinata*) comercializado na cidade de Maceió-AL¹². De modo contrário, elevado percentual de não conformidade na prova do gás sulfídrico foi determinado em amostras de filé de pescado congelado comercializado em Belo Horizonte-MG¹⁰.

A prova do gás sulfídrico compara as intensidades de manchas pretas desenvolvidas, respectivamente, no

papel de filtro correspondente à amostra de pescado e no papel de filtro correspondente ao controle (solução-padrão de sulfeto de sódio), aos vapores desprendidos no aquecimento (da amostra de pescado e do controle). No entanto, embora a detecção de gás sulfídrico indique avançado estágio de deterioração¹⁰, por ser uma prova subjetiva, ela parece não dispor de fundamentação científica suficiente para o julgamento e juízo de valor do grau de frescor ou deterioração de pescado, ainda que empregada por muitos pesquisadores.

Do mesmo modo, com exceção de peixe inteiro congelado, todos os produtos processados apresentaram conformidade com a reação negativa da amônia (ausência de desprendimento de fumaça branca e espessa). Observação idêntica à da prova do gás sulfídrico deve ser feita para este parâmetro químico como indicativo de qualidade do grau de frescor de pescado. Os resultados positivos de gás sulfídrico e reação de amônia em peixe inteiro congelado podem indicar processos autolíticos e deterioração do conteúdo alimentar presente no tubo digestivo dos exemplares processados¹⁸.

Considerando-se em conjunto os resultados de pH, cocção e gás sulfídrico, o peixe inteiro congelado apresentou conformidade em apenas 50,0% das amostras. Considerando-se, no entanto, apenas os resultados de cocção e gás sulfídrico, baixo percentual de não conformidade, 0,8%, foi determinado para os produtos beneficiados no Pará; percentual semelhante de 0,3% foi determinado em filé de peixe congelado de diferentes espécies¹⁰.

Comparando-se em conjunto os resultados de cocção, amônia e gás sulfídrico em filé de peixe congelado, peixe em posta congelado, peixe eviscerado fresco, camarão sem cabeça congelado e cauda de lagosta congelada, a maioria das amostras demonstrou conformidade com os limites das respectivas provas, enquanto que para peixe inteiro congelado metade das amostras apresentava conformidade e o restante não conformidade. Elevada não conformidade nessas três provas foi observada em filé de peixe congelado¹⁰.

Na comparação dos resultados em conjunto de pH, cocção, amônia e gás sulfídrico, anteriormente referidos, deve ser considerada também a subjetividade da prova da cocção, que associa a observação da consistência e firmeza da carne ao desprendimento de odor e sabor próprios do pescado^{7,8}.

O parâmetro N-BVT, isoladamente, foi aquele que apresentou o maior índice de conformidade; todos os sete produtos processados demonstraram conformidade

com os limites de N-BVT (Tabela 2), mas, em peixe fresco^{11,15}, camarão-rosa¹⁶ e carne de caranguejo-uçá¹⁷, não foi observada conformidade com os limites desse parâmetro de qualidade. Não conformidade foi também determinada em peixe fresco exposto ao consumo em cidade do interior de Portugal, conforme normas oficiais da Comunidade Europeia¹⁴. Por outro lado, os teores de N-BVT em piramutaba (*Brachyplatistoma vaillanti*)⁶ e peixe-serra (*Pristis pectinata*)¹² apresentaram conformidade com o padrão brasileiro. Amostras de sardinha (*Sardinella brasiliensis*) fresca comercializada em feiras livres de São Paulo-SP também estavam em conformidade com a legislação nacional, enquanto que as amostras descongeladas não se apresentavam em adequadas condições para consumo¹⁹.

O N-BVT é um parâmetro recomendado pela legislação nacional para a avaliação do grau de frescor de pescado e produtos de pescado, mas o limite fixado para esse parâmetro parece não ser adequado para todos os tipos de pescado¹⁰.

Em carpa-capim mantida em gelo clorado (5ppm de cloro livre residual) foi observada pouca variação e determinados baixos valores de conteúdo de N-BVT ao longo do período de armazenagem, que não atingiram o limite fixado pela legislação (30 mg N/100 g), mesmo quando os exemplares já estavam microbiologicamente alterados²⁰. O cloro é um excelente sanitizante, de modo que os valores de N-BVT provavelmente foram também influenciados pela sua ação conservadora.

Em tambaqui conservado sob camadas de gelo, foi verificado que aos 37 dias o limite fixado para N-BVT foi atingido e, a partir de então, os exemplares ultrapassaram os limites da conformidade⁵. Camarão-rosa (*Penaeus brasiliensis* e *P. paulensis*) comercializado em diferentes segmentos do comércio varejista de São Paulo encontrava-se, em elevado percentual, sem conformidade com os limites de N-BVT¹⁶. Em corvina eviscerada conservada a 0°C, os teores de bases voláteis totais se mantiveram dentro dos valores estipulados pela legislação, até o 21º dia de estocagem¹³. Somente quando o pescado apresenta perda de qualidade o conteúdo de N-BVT aumenta rapidamente¹.

O pH e o conteúdo de N-BVT podem ser considerados bons indicadores do grau de frescor de pescado quando associados à avaliação sensorial e ao tempo de estocagem em gelo⁵, mas parecem não ser adequados para todos os tipos de pescado^{10,20}. O parâmetro pH, do mesmo modo, parece não ser um índice seguro do estado de frescor ou do início da deterioração em

pescado, sendo seu uso geralmente restrito, por variar de amostra para amostra e por ocorrerem flutuações durante o período de estocagem⁶. Valores divergentes de 7,0, 7,60, 7,70 a 7,95 e $\geq 7,95$ têm sido considerados por diversos autores como limites do parâmetro pH em camarão²¹⁻²³, mas a adoção desses valores poderia implicar em elevados percentuais de não conformidade desse produto¹⁶.

CONCLUSÕES

A matéria-prima recebida para processamento e os produtos de pescado processados pelas indústrias paraenses no período considerado apresentavam elevada conformidade com os parâmetros analisados, podendo ser classificados como produtos próprios para o consumo do ponto de vista sensorial e físico-químico. Esses resultados confirmaram a análise sensorial como o método mais indicado para avaliação de matérias-primas, reservando-se as análises físico-químicas para os produtos beneficiados.

REFERÊNCIAS

1. Food and Agriculture Organization – FAO. Garantia da qualidade dos produtos da pesca. Roma; 1997. (Documento Técnico sobre as Pescas 334).
2. Simões MR, Ribeiro CFA, Ribeiro SCA, Park KJ, Murr FEX. Composição físico-química, microbiológica e rendimento do filé de tilápia tailandesa (*Oreochromis niloticus*). *Ciênc Tecnol Aliment*. 2007;27(3):608-13.
3. Vieira RHSF (coordenadora). Microbiologia, higiene e qualidade do pescado. Teoria e prática. 1ª Ed. São Paulo: Varela; 2003.
4. Secretaria de Defesa Agropecuária (Brasília - Brasil). Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Brasília (DF): MAA; 1997.
5. Almeida NM, Batista GM, Kodaira M, Lessi E. Alterações post-mortem em tambaqui conservado em gelo. *Ciênc Rural*. 2006;36(4):1288-93.
6. Santos TM, Martins RT, Santos WLM, Martins NE. Inspeção visual e avaliações bacteriológica e físico-química da carne de piramutaba (*Brachyplatistoma vaillantii*) congelada. *Arq Brás Med Vet Zootec*. 2008; 60(6):1538-45.
7. Brasil. Ministério da Agricultura. Portaria nº 185, de 13 de Maio de 1997. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Peixe Fresco (Inteiro e Eviscerado). Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 19 mai. 1997. Seção 1, p.10282.
8. Laboratório Nacional de Referência Animal (Pedro Leopoldo – Brasil). Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes: II - Métodos físicos e químicos. Brasília (DF): MAPA;1981.
9. Silva RA, Oliveira DSV, Ferreira NA. Controle de qualidade do pescado e avaliação microbiológica do gelo utilizado para sua conservação. *Cad Temát*. 2007;15:22-7.
10. Soares VFM, Vale SR, Junqueira RG, Roberto G, Junqueira M, Glória BA. Teores de histamina e qualidade físico-química e sensorial de filé de peixe congelado. *Ciênc Tecnol Aliment*. 1998;18(4):462-70.
11. Muratori SCM, Viana MC, Rodrigues CP, Júnior PDL. Qualidade Sanitária do Pescado “In Natura”. *Rev Hig Aliment*. 2004;18(116/117):50-3.
12. Lira GM, Pereira WD, Athaide AH, et al. Avaliação da qualidade de peixes comercializados na cidade de Maceió, AL. *Rev Hig Aliment*. 2001;15(84):67-74.
13. Borges A, Teixeira MS, Freitas MQ, Franco RM, Mársico ET, São Clemente SC. Qualidade da corvina (*Micropogonias furnieri*) em diferentes períodos de estocagem a 0°C. *Ciênc Rural*. 2007;37(1):259-64.
14. Fontes MC, Eteves A, Caldeira F, Saraiva C, Vieira-Pinto M, Martins C. Estado de frescor e qualidade higiênica do pescado vendido numa cidade do interior de Portugal. *Arq Brás Med Vet Zootec*. 2007;59(5):1308-15.
15. Meira DR, Martins OA, Oliveira FS et al. Características físico-químicas de pescado fresco analisado no serviço de Orientação à Alimentação Pública (SOAP) – UNESP-BOTUCATU; maio de 1999; Foz do Iguaçu: Rev Hig Aliment. p.70 [resumo].
16. Moura AFP, Mayer MB, Landgraf M, Tenuta Filho A. Qualidade química e microbiológica de camarão-rosa comercializado em São Paulo. *Rev Bras Ciênc Farmac*. 2003;39(2):203-8.
17. Lourenço LFH, Oliveira ML, Pinto CMC, Pereira DX. Análises físico-químicas e microbiológicas de carne de caranguejo-úça (*Ucides cordatus* L), comercializada nos municípios de São Caetano de Odivelas e Belém, PA. *Rev Hig Aliment*. 2006; 20(142):90-5.
18. Barros CG. Perda da Qualidade do Pescado, Deterioração e Putrefação. *Rev Cons Fed Med Vet*. 2003;2(30):59-66.
19. Pereira ÁAF, Tenuta-Filho A. Avaliações de condições de consumo da sardinha *Sardinella brasiliensis*. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2005;25(4):720-5.
20. Scherer R, Daniel AP, Augusti PR et al. Efeito do gelo clorado sobre parâmetros químicos e microbiológicos da carne de carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*). *Ciênc Tecnol Aliment*. 2004;24(4):680-4.
21. Bailey ME, Fieger EA, Novak AF. Objective test application to quality studies of ice stored shrimp. *Food Res*.1956;21:611-20.
22. Luna GAL. Cambios quimicos y microbiologicos en la decomposición de camaróns (*Penaeus brasiliensis*). Control de calidad para muestras del mercado. *Arch Latinoam Nutr*. 1971;3:381-400.
23. Shamsad SJ, Kher-Un-Nisa RM, Zuberi R, Qadri RB. Shellife of shrimp (*Penaeus merguensis*) stored at different temperatures. *J Food Sci*. 1990;55(5):1201-5.

Effect of different ingredients contents on physical, physicochemical and sensory properties of the creamy banana marmalade cv. 'nanica' (*Musa cavendishii*)

Efeito dos diferentes teores de ingredientes nas propriedades físicas, físico-químicas e sensoriais de doce de banana cremoso cv. 'nanica' (*Musa cavendishii*)

RIALA6/1361

Patricia Aparecida Pimenta PEREIRA*, Anirene Galvão Tavares PEREIRA, Soraia Vilela BORGES, Luisa Pereira FIGUEIREDO, Wanderson Alexandre VALENTE, Marali Vilela DIAS, Fabiana QUEIROZ

*Endereço para correspondência: Food Science Department of Federal University of Lavras, Lavras/MG, Brazil. Zip code: 37200-000. Fone: 35 3829-1031. E-mail: pattyap2001@yahoo.com.br.

Recebido: 05.10.2010 – Aceito para publicação: 07.06.2011

ABSTRACT

Banana is a highly perishable fruit, with a shelf life of 7 to 10 days, and the fruits being in excess or those in nonconformity to be consumed are used to produce marmalade; and it is an interesting economic alternative. This study evaluated the effect of different ingredients on the physical, physicochemical and sensory properties of creamy banana marmalade. An incomplete factorial design (2^{4-1}) with two levels of four factors (pulp/sugar ratio, pectin concentration, added amount of acid and sorbate concentration). The sensorial acceptance of marmalades was evaluated using a 9-point hedonic scale, and the purchase intention by employing a 5-point scale. The analyzed variables mostly affecting the parameters were the pulp/sugar ratio, the added amount of acid and the sorbate concentration, due to their reaction with the marmalade components. The formulation 2 was preferred by consumers because of the firmest texture and the intensified yellow color.

Keywords. fruit, fruit processing, *Musa cavendishii*.

RESUMO

A banana é uma fruta altamente perecível, com uma vida útil de 7 a 10 dias, e o uso do excedente da produção ou das frutas que estão fora dos padrões de consumo na forma de doce é uma interessante alternativa econômica. Os objetivos deste estudo foram avaliar o efeito de diferentes ingredientes sobre as características físicas, físico-químicas e sensoriais de doces de banana cremosos. Foi utilizado um delineamento fatorial incompleto (2^{4-1}) com dois níveis de quatro fatores (polpa/açúcar, concentração de pectina, quantidade de ácido adicionado e concentração de sorbato). Aceitação sensorial dos doces foi avaliada utilizando uma escala hedônica de 9 pontos, e a intenção de compra por meio de uma escala de 5 pontos. As variáveis analisadas que mais afetam os parâmetros foram a razão polpa/açúcar, pH e a concentração de sorbato, devido à sua reação com os componentes do doce. A formulação 2 foi a preferida devido à textura mais firme e cor mais amarelada.

Palavras-chave. fruta, processamento de fruta, *Musa cavendishii*.

INTRODUCTION

The banana is a fruit typical from tropical zones and Brazil is third in the world production. In Brazil, banana production is estimated at six million tons annually, this fruit have a fundamental role as a food, a provider of jobs in the rural environment and a generator of penny for the country. Besides, it constitutes in the highest *per capita* consumption, with amounts approaching 35 kg, reaching all layers of society, although it is second in the Brazilian consumer's fruit preference, after the orange¹.

Of the bananas that are picked in the field, 50% actually arrive in consumer hands. This fact is due to the losses caused by damage occurring during the planting phases until the harvest, the gathering of the bunches, packing in wood boxes, internal and external transport and in the handling of the fruits in the open-air markets and supermarkets. Therefore the processing of bananas becomes an alternative for the use of the extra fruits, since their shelf life is from 7 to 10 days under ambient conditions or the fruits used for *in natura* consumption are of sub-standard quality, making the decrease of post-harvest losses possible and representing a form of increasing the shelf life and aggregating value to the product. There are several products that can be obtained from the banana. Among them, are the pulp or *purée*, nectar, fruit in syrup, dehydrated products and several preserves, including jellies and marmalade².

Banana preserve is a quite popular form of preservation in Brazil and with commercialization possibility on the international market. The process is influenced by the fruit type, pectin concentration, pH, pulp/sugar ratio, among others thoroughly discussed in the literature³⁻⁹.

However, due to microbial growth this product presents a limited shelf life, which can be prolonged with preservatives. On the other hand, the interaction between sorbate and other ingredients of the formulation could alter its quality.

The objectives of this study were to evaluate the effect of different ingredients on physical, physicochemical and sensory properties of creamy banana marmalade.

MATERIAL AND METHODS

The banana (*Musa cavendishii*) used for the production of the different formulations of the marmalades

were bought in local supermarkets and selected according to their degree of maturation (yellow peels).

Commercial high methoxylation level pectins (VETEC), granulated sugar (CAETÉ brand), citric acid (VETEC), potassium sorbate PA (VETEC) and polypropylene packaging were used.

An incomplete factorial design was used (2^{4-1}), with 2 levels of 4 factors (pulp/sugar, pectin concentration, amount of citric acid added and sorbate concentration), as shown in Table 1¹⁰.

The results were submitted to variance analysis for the determination of the effects on the physical, chemical and physicochemical responses. The STATISTICA 5.0 (STATSOFT, Tulsa, OK, USA) software was used.

The production of the marmalades followed methodology described by Rauch¹¹. The banana bunches arrived at the reception area, where they were washed with common water for dirtiness removal and sanitized with chlorinated water (10 mg/kg of sodium hypochlorite). Soon afterwards they were selected according to the quality attribute (yellow peel). In sequence, the fruits were manually peeled and immediately introduced into a stainless steel pot containing antioxidant solution (0.5% ascorbic acid) and submitted to the blanching process for 10 minutes and then were depulped in an INCAPRI depulper, stored in polyethylene bags and refrigerated until their use.

The treatments were concentrated in open pan until 73 °Brix. All the ingredients were added at the beginning of the process, only the citric acid was put in the end of the process.

Table 1. Incomplete factorial design for production of marmalades

Treatments	Pulp/sugar (g/g)		Pectin Concentration (%)		Amount of citric acid added (mL)		Sorbate Concentration (%)	
	x_1	X_1	x_2	X_2	x_3	X_3	x_4	X_4
1	-1	40/60	-1	0	-1	3.0	-1	0
2	+1	60/40	+1	1%	-1	3.0	-1	0
3	+1	60/40	-1	0	+1	3.5	-1	0
4	-1	40/60	+1	1%	+1	3.5	-1	0
5	+1	60/40	-1	0	-1	3.0	+1	0.1%
6	-1	40/60	+1	1%	-1	3.0	+1	0.1%
7	-1	40/60	-1	0	+1	3.5	+1	0.1%
8	+1	60/40	+1	1%	+1	3.5	+1	0.1%

x_1 - coded variable corresponding to pulp/sugar; x_2 - coded variable corresponding to pectin concentration; x_3 - coded variable corresponding to amount of citric acid added; x_4 - coded variable corresponding to sorbate concentration

The marmalades were packaged hot, in polypropylene pots, inverted, cooled and refrigerated until being analyzed.

The marmalades were analyzed as to reducing (RS) and non-reducing (NRS) sugar levels by the Somogyi-Nelson method. The total titratable acidity (TTA) was expressed in equivalents of malic acid per 100g of sample. All analysis was according to the official AOAC methods¹² in triplicate.

The water activity was measured through an Aqualab Model series 3 TE (Decagon Device, Pullman, USA) apparatus, previously calibrated with standard solution (the samples were analyzed at room temperature, in 3 cm x 1 cm flasks). Color measurement was determined using a colorimeter Konica Minolta CR 400 (Konica Minolta, Ramsey, NJ) with direct reading of Luminosity (L) – Variation of black (0) to white (100), Intensity (a) – variation of green (-) to red (+) and Intensity (b) – Variation of blue (-) to yellow (+). Color measurements were taken in triplicate in three different places on the pots marmalades. The texture profile analyses (TPA) occurred under the following conditions: pre-test speed 5.0 mm/s, test speed 2.0 mm/s and post-test speed 2.0 mm/s with a compression distance of 10.0 mm by a 6.0 mm cylindrical aluminum probe. The texturometer from Stable Micro Systems Model TA - XT2i (Goldaming, England) was used. The parameters analyzed were: hardness (HAR), fracturability (FRA) and adhesiveness (ADH). For each preserve 6 measurements were taken.

The acceptance of the marmalades was evaluated by 30 potential consumers, members of the UFLA community (students, teachers and employees) and the appraised attributes (appearance, smell, texture, color, flavor) were judged through a structured 9 point hedonic scale (1 = I extremely disliked to 9 = I extremely liked). The samples were presented in plastic cups, coded with three algorithm removed from a table of random numbers, and conducted in individual cabins in the Sensorial Analysis Laboratory of the Food Science Department (UFLA), under white light and at room temperature¹³. The results were submitted to the variance analysis (ANOVA) and the differences among the averages compared by the Tukey test to 5% of probability, by the STATISTICA 5.0 (STATSOFT, Tulsa, OK, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

The Table 2 presents the result of the influence of the effects on the respective analyses.

Table 2. Estimate of the effects of the variables on the chemical and physicochemical analyses of the creamy banana marmalade

Factor	ATT	NRS	RS	AW
Mean	0.66	20.02	6.48	0.71
X ₁	0.17	1.6	0.85	0.04
X ₂	-0.11	2.37	-0.54	-0.05
X ₃	-0.24	-5.21	-0.69	-0.06
X ₄	0.14	-10.78	-0.08	-0.09

It is observed that in general, the variable that most affected all the analyzed characteristics was the amount of citric acid added (X₃), whose increase reduced the non-reducing sugars (NRS), through the hydrolysis to reducing sugars (RS), since the addition of citric acid lowers the pH.

Similar results were found by Policarpo et al.¹⁴, analyzing formulations of umbu pulp marmalades, and for Besbes et al.¹⁵, studying mango jellies formulated with different peel levels in substitution of the pulp.

It is also observed that there was a reduction of the non-reducing sugars by the sorbate addition (X₄), suggesting a reaction of the reducing sugars with the sorbate¹⁶. According Alexandre et al.¹⁷, the addition of sorbate inhibits the reducing sugars. The increase of the pectin addition (X₂) and of the pulp/sugar ratio (X₁) resulted in an increase of the non-reducing sugars, signifying a higher protection against hydrolysis of these sugars during the cooking.

The increase of the pulp/sugar ratio (X₁) and potassium sorbate addition (X₄) have caused a positive effect on the percentage of ATT (total titratable acidity). The effect of X₁ on ATT may have been due to the acidity of the bananas, as perceived by Menezes et al.¹⁸ in their studies with guava preserves, where the acidity was higher for treatments with higher pulp/sugar ratio. In relation to sorbate concentration Evageliou et al.¹⁹ say that the use of potassium sorbate increased ATT by combining this with the acids in the product.

The increase of the pectin concentration (X₂) and amount of citric acid added (X₃) reduced the ATT. This is probably because of the interaction of H⁺ ions with the pectin networks¹⁹.

The increase in pulp/sugar ratio (X₁) has effect increase water activity, show effect negative on water activity (AW) in the product. It is probably because the increase in pulp, and consequently decrease the amount of sugar will lead to increased free water content in the product. According to Menezes et al.¹⁸, since the increase of

pectin concentration (X_2), amount of citric acid added (X_3) and potassium sorbate concentration (X_4) have decrease effect on AW. According to Löfgren e Hermansson²⁰ for the formation of the gel in jams, jellies and preserves the sugar binds to water and pectin micelles, which are linked to acid, making the water be free in three-dimensional networks thus diminish the water activity.

In Table 3, it is noted, by the size of the effects, that the variables that affected the texture parameters were the pulp/sugar ratio (X_1), pectin concentration (X_2), sorbate concentration (X_4). The increase of the pulp/sugar ratio (X_1) increased the hardness (HAR) and fracturability (FRA) and the pectin addition (X_2) increased the adhesiveness (ADH) and reduced the hardness and fracturability. The sorbate addition (X_4) reduced the hardness and fracturability. Other properties were little altered.

In relation to the results in the literature, the depressive effect of the pectin on the hardness is not the expected, because the increase of its concentration elevates the hardness^{18,14}, but it might have been hydrolyzed during the cooking therefore not exercising this function¹⁹.

The Table 4 presents the effects of the color parameters (L^* , a^* , b^*) of the treatments. Its shows that the highest registered effect was for the amount of citric acid added (X_3), whose increase tends to lighten the product. The sorbate addition (X_4) causes darkening as seen by the negative effect value of L^* . The parameters a^* and b^* are influenced by the increase of the pulp/sugar (X_1), whose increase elevates these parameters, especially b^* , indicator of the yellow color. The pectin (X_2) increase reduces the parameters a^* and b^* . The increase of the pectin concentration causes a certain decrease in the color parameters, as verified in some other works^{18,20,21}.

The results of the averages obtained by the sensorial analysis are presented in Table 5. It is observed that there was significant difference among the treatments 2 (60/40 pulp/sugar ratio, 1,0% pectin concentration, 3,0 mL citric acid and 0% sorbate concentration) and 5 (60/40 pulp/sugar ratio, 0% pectin concentration, 3,0 mL citric acid and 0,1% sorbate concentration) only for the flavor attribute. The treatment 5 obtained the lowest score (indifferent - I slightly liked). The treatment 2 obtained the highest score (I moderately liked - I liked a lot, with average of score of 7.16). These differences can be attributed to the sorbate concentration, considerably lower for treatment 2 due to the probable reaction of sorbate resulting in a darker product.

In relation to color attribute, there was no significant difference between treatments. This indicates that even if the

Table 3. Estimate of the effects of the variables on the texture analysis of creamy banana marmalade

Factor	ADH (g*s)	HAR (g)	FRA (g)
Mean	-152.02	147.39	118.96
X_1	-119	145.7	141.5
X_2	142.1	-30.5	-92
X_3	32.6	-73.5	-39.3
X_4	78.2	-134.5	-120.4

Table 4. Estimate of the effects of the variables on the color analysis of creamy banana marmalade

Factor	L^*	a^*	b^*
Mean	0.83	-0.33	0.73
X_1	1.49	1.18	4.9
X_2	0.14	-1.6	-2
X_3	3.19	-1.1	0
X_4	-1.5	0.21	0

Table 5. Sensorial characteristics of creamy banana marmalade

Treatments	Appearance	Smell	Texture	Color	Flavor
1	6.52 a	6.19 a	6.23 a	6.71 a	6.71 ab
2	7.06 a	7.00 a	7.13 a	7.00 a	7.16 a
3	6.84 a	6.52 a	6.23 a	6.61 a	6.68 ab
4	6.68 a	5.77 a	6.52 a	6.81 a	6.09 ab
5	6.42 a	6.16 a	6.48 a	6.68 a	5.58 b
6	6.55 a	6.03 a	6.32 a	6.94 a	6.19 ab
7	6.87 a	6.32 a	6.77 a	6.94 a	6.74 ab
8	6.26 a	6.19 a	5.90 a	6.13 a	6.68 ab
CV	24.51	29.19	27.72	24.4	29.3

CV = Coefficient of Variation

independent variables affect the parameters, color (L^* , a^* , b^*) (Table 4) does not influence on consumer acceptability.

CONCLUSIONS

It is concluded that the variables that most affects the analyzed parameters are the pulp/sugar ratio, amount of citric acid added and sorbate concentration, since these react with the components of the marmalades. In this research, as a consequence of these alterations, the treatment 2 (pulp/sugar = 60/40; pectin concentration = 1%; amount of citric acid added = 3.0 mL; sorbate concentration = 0) was the favorite to the firmer texture and more yellow color. These results indicate that these variables should be researched at other levels to reach optimization.

REFERENCES

1. Godoy A, Cordenunsi BR, Lajolo FM, Nascimento JRO. Differential display and suppression subtractive hybridization analysis of the pulp of ripening banana. *Sci Horticult*. 2010;124:51-6.
2. Torres-Gutiérrez L, Chel-Guerrero L, Betancur-Aancona D. Functional properties of square banana (*Musa balbisiana*) starch. *Food Chem*. 2008;106:1138-44.
3. Lesschaeve I, Langlois D, Etiévant P. Volatile compounds in strawberry jam: influence of cooking on volatiles. *J Food Sci*. 1991;56(5):1393-8.
4. Carbonell E, Costell E, Durán L. Fruit content influence on gel strength of strawberry and peach jams. *J Food Sci*. 1991;56(5):1384-7.
5. Guichard E, Issanchou S, Descourvieres A, Etiévant P. Pectin concentration, molecular weight and degree of esterification: influence on volatile composition and sensory characteristics of strawberry jam. *J Food Sci*. 1991;56(6):1621-7.
6. Halat MS, Reitmeier CA, Takeda F, Peterson DL. Sensory evaluation of jams made from three eastern thornless and marion blackberries. *J Food Qual*. 1997;20:177-88.
7. El-Nawawi SA, Heikel YA. Factors affecting gelation of high-ester citrus pectin. *Procs Bioch*. 1997;32(5):381-5.
8. Masmoudi M, Besbes S, Chaabouni M, Robert C, Paquot M, Blecker C, Attia H. Optimization of pectin extraction from lemon by-product with acidified date juice response surface methodology. *Carb Polym*. 2008;10:10-16.
9. Kansci G, Koubala BB, Mborme IL. Biochemical and physicochemical properties of four mango varieties and some quality characteristics of their jams. *J Food Proc Preserv*. 2008;32:644-55.
10. Box GEP, Draper NR. *Empirical Model-Building and Response Surfaces*. New York: Wiley; 1987.
11. Rauch GH. *Fabricacion de Mermeladas*. Acribia, Zaragoza, Spain; 1965.
12. Association of Official Analytical Chemistry. *Official methods of analysis of the association of analytical chemistry*. Washington: AOAC; 1992.
13. Stone H, Sidel J. *Sensory evaluation practices*. 3rd ed. New York: Academic Press; 2004.
14. Policarpo VM, Resende J, Endo E, Marcussi B, Castro FT, Jorge EC et al. Aprovechamiento de la pulpa de umbu (*Spondias tuberosa*, Arr. Cam.) verde como alternativa para la producción de dulces em masa. *Alimentaria*. 2003;344:75-8.
15. Besbes S, Drira L, Blecker C, Deroanne C, Attia H. Adding value to hard date (*Phoenix dactylifera* L.): composition, functional and sensory characteristics of date jam. *Food Chem*. 2009;112(2):406-11.
16. Thakur BR, Singh RK, Arya SS. Chemistry of sorbates- a basic perspective. *Food Rev Internat*. 1994;10(1):71-91.
17. Alexandre D, Cunha RL, Hubinger MD. Conservação do açaí pela tecnologia de obstáculos. *Ciênc Tecnol Alim*. 2004;24(1):114-9.
18. Menezes CC, Borges SV, Cirillo MA, Ferrua FQ, Oliveira LF, Mesquita KS. Caracterização física e físico-química de diferentes formulações de doce de goiaba (*Psidium guajava* L.) da cultivar Pedro Sato. *Ciênc Tecnol Alim*. 2009;29(3):618-25.
19. Evageliou V, Richardson RK, Morris ER. Effect of pH, sugar type and thermal annealing on high-methoxy pectin gels. *Carbohydr Polym*. 2000;42:245-59.
20. Löfgren C, Hermansson AM. Synergistic rheological behavior of mixed HM/LM pectin gels. *Food Hydrocol*. 2007;21(3):480-6.
21. Kirca A, Özkan M, Cemeroglu B. Storage stability of strawberry jam color enhanced with black carrot juice concentrate. *J Food Proc Preserv*. 2007;31(5):531-45.

Propriedade das frações proteicas de cultivares de arroz, aveia e trigo

Property of protein fraction of rice, oat and wheat cultivars

RIALA6/1362

Fernanda Arnhold PAGNUSSATT^{1*}, Jaqueline GARDA-BUFFON¹, Luiz Carlos GUTKOSKI²,
Eliana BADIALE-FURLONG¹

*Endereço para correspondência: ¹Laboratório de Ciência de Alimentos, Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande/RS, Brasil. Tel.: 53 3233-8663. E-mail: nandapagnu@terra.com.br.

²Laboratório de Cereais, Centro de Pesquisa em Alimentação, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo.

Recebido: 03.11.2010 – Aceito para publicação: 01.06.2011

RESUMO

Os cereais são fontes de inibidores enzimáticos que agem sobre a α -amilase, que alteram a disponibilidade do amido e podem representar uma ferramenta útil para a resistência dos vegetais ao ataque de agentes patogênicos. Neste estudo foram analisadas as características físico-químicas e da fração proteica de aveia, arroz e trigo, cultivados no Rio Grande do Sul, com o objetivo de correlacioná-las, posteriormente, com a presença de inibidores enzimáticos e resistência à contaminação fúngica. As amostras de grãos de aveia, trigo e arroz foram caracterizadas físico-quimicamente e avaliadas quanto à digestibilidade proteica *in vitro*, solubilidade em sistema aquoso e atividade enzimática de hidrolases. A aveia apresentou maior teor lipídico e proteico e a cultivar UPFA 20 Teixeirainha demonstrou a menor digestibilidade em função do teor de fibras. O maior conteúdo de glutelina foi detectado no arroz cultivar BR 424, acompanhado pelo maior teor de proteína bruta e digestibilidade. As variedades de trigo apresentaram maior atividade de α -amilase e β -amilase, o que sugere que esse cereal é mais susceptível à degradação fúngica quando comparado com arroz e aveia, em vista da maior disponibilidade de açúcares. A atividade inibidora de amilases dos extratos proteicos dos cereais foi maior nos cultivares de aveia.

Palavras-chave. cereais, solubilidade de proteínas, digestibilidade, atividade enzimática.

ABSTRACT

Cereals are sources of enzymatic inhibitors which act upon alpha-amylase, disturbing the starch availability and generating a high resistance to pathogens. This study evaluated the physical-chemical characteristics and the protein fractions of oat, rice and wheat, cultivated in Rio Grande do Sul, for estimating the enzymatic inhibitors presence and the resistance to fungi contamination. Samples of oat, wheat and rice were characterized physical-chemically (moisture, lipids, protein and crude fiber); and *in vitro* protein digestibility, solubility in aqueous system and hydrolases enzymatic activity were evaluated. The oat samples showed the highest lipids and protein contents, and the UPFA20 Teixeirainha demonstrated the lowest digestibility, as expected owing to the brut fiber contents. The gluteline fraction was found in BR424 rice variety, and the highest total crude protein and digestibility. The wheat varieties showed the highest α -amylase and β -amylase activity, suggesting that this grain is the mostly susceptible to fungal degradation when compared with rice and oats, due to the increased sugar availability. The highest amylase inhibitor activity of cereals protein extracts was detected in oat cultivars.

Keywords. cereals, protein solubility, digestibility, enzymatic activity.

INTRODUÇÃO

Os cereais são matérias-primas nutricionalmente importantes, pois além de serem fonte de energia, contribuem com cerca de 20% na ingestão proteica diária. O uso de proteínas vegetais decorre de suas propriedades funcionais, que propiciam uma forma versátil de satisfazer as necessidades proteicas do ser humano¹.

As proteínas de reserva dos cereais têm seu aproveitamento influenciado pelo alto teor de fibras insolúveis e por sua solubilidade, em função da qual também são classificadas em prolaminas e glutelinas, globulinas e albuminas². As albuminas são solúveis em água, as globulinas em soluções salinas, as prolaminas em soluções de álcool/água e as glutelinas solúveis em soluções ácidas ou básicas diluídas³.

O valor nutritivo de uma proteína depende da digestibilidade e biodisponibilidade dos aminoácidos essenciais e não apenas da sua composição, nas quantidades e proporções adequadas para atender às necessidades do organismo⁴. A abundância de carboidratos na forma de amido e as proteínas solúveis em soluções aquosas tornam a qualidade dos cereais e seus derivados dependentes da atividade de enzimas α e β -amilases e de proteases ao longo da cadeia produtiva⁵. Além disso, elas podem propiciar maior susceptibilidade à contaminação dos grãos por fungos ainda no campo, durante e após a colheita, transporte, processamento e armazenamento do produto⁶.

Em função disso, esses cereais desenvolveram mecanismos naturais de defesa, como os inibidores enzimáticos de amilases que conferem resistência à contaminação fúngica e a germinação precoce dos grãos⁷. Boas práticas de armazenagem, processamento adequado e proteção contra contaminantes são alternativas bastante discutidas para garantir a segurança alimentar sob os aspectos qualitativo e quantitativo, mas sua eficiência depende do conhecimento das características bioquímicas de cada variedade em suas respostas a cada região de cultivo⁸.

A partir dessas considerações, o objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização físico-química e da fração proteica em cultivares de aveia, arroz e trigo cultivados no Rio Grande do Sul, visando correlacioná-las com a presença de inibidores enzimáticos e a resistência à contaminação fúngica.

MATERIAL E MÉTODOS

Matéria-prima

Cultivares de grãos de arroz safra 2009 (BR 410, BR 417, BR 424), aveia safra 2008 (UPFA 20 Teixeira, UPFA 22 Temprana e UPFA Pampa) e trigo safra 2008 (Ônix, Pampero, Safira) foram fornecidas pelo Instituto Rio-Grandense do Arroz, Universidade de Passo Fundo e OR Melhoramento de Sementes Ltda., respectivamente. As amostras foram coletadas de acordo com as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) para o envio de porções representativas ao Laboratório de Ciência de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Todos os grãos foram moídos em moinho de facas (Tecnal, modelo Te-631, Brasil) e peneirados à granulometria de 42 mesh, compondo a amostra analítica.

Composição centesimal

O conteúdo de umidade, lipídios, proteínas, cinzas e fibras foi determinado pela metodologia descrita na Association of Official Analytical Chemists International – AOAC⁹, de acordo com os métodos nº 935.29; 920.85; 920.87; 923.03 e 991.43, respectivamente. O teor de carboidratos foi obtido por diferença percentual¹⁰.

Solubilidade proteica

O fracionamento das proteínas foi realizado com 1 g de amostra pesado e homogeneizado com 10 mL de água destilada (fração albumina) em agitador orbital (176 rpm) a 25 °C durante 30 minutos (Marconi, modelo MA410, Brasil). As misturas foram centrifugadas (Cientec, modelo CT-5000R, Brasil) a 2240 G durante 20 minutos e o sobrenadante coletado, repetindo-se o procedimento por duas vezes. O resíduo foi submetido sequencialmente à extração com 10 mL de NaCl 1% para a obtenção da fração globulina, 10 mL de etanol 70% e 10 mL de NaOH (0,1 mol.L⁻¹) para a separação de prolamina e glutelina, mantendo os procedimentos já descritos para a primeira fração³. A quantificação das proteínas foi realizada utilizando o reagente de Folin¹¹. As absorvâncias foram lidas em espectrofotômetro (Varian, modelo Cary 100, Estados Unidos) a 660 nm e comparadas com a curva-padrão de albumina de soro bovino (0,3 a 2,5 mg.mL⁻¹).

Digestibilidade da proteína *in vitro* e teor de metionina disponível

A digestibilidade da proteína *in vitro* (proporção 1:10) foi determinada em quadruplicata, empregando

Tabela 1. Composição centesimal dos grãos integrais de aveia, arroz e trigo (g.100g⁻¹)¹

Cultivar	Umidade	Lipídios	Cinzas	Proteínas	Fibras	Carboidratos ¹
Arroz						
410	14,2 ^{aA}	3,6 ^{aB}	2,7 ^{aA}	5,7 ^{bD}	0,8 ^{aBC}	73
417	14,3 ^{aA}	0,4 ^{bE}	0,3 ^{bD}	7,5 ^{aC}	0,1 ^{bC}	77,4
424	14,8 ^{aA}	4,0 ^{aB}	2,7 ^{aA}	4,7 ^{cD}	0,7 ^{aC}	73,1
Aveia						
Pampa	10,9 ^{aA}	5,4 ^{aA}	2,2 ^{aAB}	14,0 ^{aA}	0,7 ^{aC}	66,8
Teixeirinha	11,4 ^{aA}	5,6 ^{aA}	1,7 ^{aBC}	10,4 ^{bB}	0,3 ^{bC}	70,6
Temprana	14,4 ^{aA}	5,7 ^{aA}	1,7 ^{aBC}	4,8 ^{cD}	0,5 ^{aC}	72,9
Trigo						
Safira	11,8 ^{aA}	1,1 ^{bE}	1,5 ^{aC}	6,1 ^{aCD}	0,1 ^{cC}	79,4
Ônix	12,2 ^{aA}	2,1 ^{aCD}	1,6 ^{aBC}	6,5 ^{aCD}	1,6 ^{bB}	76
Pampeano	12,4 ^{aA}	2,4 ^{aC}	1,7 ^{aBC}	7,5 ^{aC}	3,8 ^{aA}	72,2

¹Resultados representam a média de três determinações. Letras minúsculas diferem estatisticamente entre as cultivares do mesmo cereal e letras maiúsculas entre todos os cereais. Carboidratos estimados por diferença.

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

hidrólise enzimática sequencial com pepsina e pancreatina¹². As alíquotas de sobrenadante digerido foram reunidas e a digestibilidade determinada através do método de Folin-Ciocalteu, utilizando curva-padrão de tirosina (25 -125 µg.mL⁻¹).

Atividade enzimática

O extrato enzimático bruto foi obtido por homogeneização de 0,5 g de amostra com 50 mL de NaCl 0,5%, agitado em mesa orbital (Marconi, modelo MA410, Brasil) por 90 minutos na temperatura de 30 °C, centrifugado (Cientec, modelo CT-5000R, Brasil), filtrado e armazenado a 5 °C até o momento do uso. A atividade de α-amilase foi determinada pela degradação do amido estimada quantitativamente pelo método iodométrico¹³; a β-amilase teve sua ação determinada pela liberação de maltose quantificada pelo método colorimétrico do ácido 3,5 dinitrosalicílico (3,5 DNS); e a atividade das proteases foi determinada empregando albumina como substrato, medindo aminoácido livre, tendo tirosina como indicativo de hidrólise¹³.

Triagem da presença de inibidores enzimáticos nos cereais

Para a triagem da presença de inibidores, cada cereal (5 g) foi submetido à extração da fração proteica com três sistemas solventes (45 mL): etanol 95%, tampão acetato de sódio pH 5 e tampão fosfato de sódio pH 7,2 durante 12 horas em mesa orbital (Marconi, modelo MA410, Brasil)^{14,15}. A ação inibitória foi avaliada pela

quantidade de amido hidrolisado por α-amilase fúngica comercial (Fungamyl® 800 L), em presença e ausência do extrato proteico, determinada por iodometria, expressa em µg.mL⁻¹.min⁻¹.

Análise estatística

Os resultados de umidade, cinzas, proteínas, lipídios, fibra, solubilidade, digestibilidade, atividade enzimática e inibição da amilase fúngica foram analisados utilizando análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparação das médias através do programa Statistica 5.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição do grão e de suas frações está sujeita a diferenças varietais, manejo da cultura, processamento e armazenagem, produzindo grãos com características nutricionais diferenciadas, em função da distribuição não uniforme nas porções do grão⁸. Os resultados das médias das determinações de composição centesimal nas cultivares de arroz, aveia e trigo estão apresentados na Tabela 1. Os valores médios dos teores de cada variável analisada foram expressos em % (g.100g⁻¹) de amostra em base úmida, comparados estatisticamente entre as variedades da mesma espécie e entre os diferentes cereais.

A cultivar de arroz BR417 apresentou as menores porcentagens de lipídios, cinzas e fibras. Porém, o teor de proteínas foi superior, quando comparado com as variedades BR410 e BR424.

Não houve diferença significativa entre as cultivares de aveia para as frações de umidade, lipídios e cinzas. A cultivar UPFA Pampa apresentou o maior valor de proteína. Em relação ao teor de fibras, esta cultivar apresentou valor de 0,7 g.100g⁻¹, seguido de UPFA 20 Teixeirainha (0,3 g.100g⁻¹).

O teor de umidade, cinzas e proteínas nas amostras de trigo não diferiram entre si. A cultivar Pampeano possui um teor de fibras superior ao das demais; sendo que o teor lipídico foi maior que o encontrado na cultivar Safira e estatisticamente igual ao presente no trigo Ônix.

Os teores médios de umidade em arroz, aveia e trigo encontram-se em torno de 12,3 14,4 e 12,1 g.100g⁻¹, respectivamente. Cabe enfatizar que a umidade é um importante aspecto para a conservação da qualidade do alimento, uma vez que pode influenciar diretamente a composição química e o desenvolvimento de micro-organismos¹⁶. Em função disto, a Instrução Normativa nº 8, de 02 de junho de 2005, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento¹⁷ estabelece que o teor máximo de umidade para grãos deve estar em torno de 15 g.100g⁻¹. Portanto, neste caso, está em condições adequadas.

O percentual de lipídios foi superior nas amostras de aveia, 2,5 vezes maior que nos demais cereais em média. O resultado foi semelhante ao encontrado na literatura, com valor de 5,4 g.100g⁻¹ para a cultivar de aveia com casca da variedade UPFA 20 Teixeirainha, após 30 dias de armazenamento e umidade final de 11 g.100g⁻¹, enquanto que na amostra descascada o valor deste componente foi de 7,7 g.100g⁻¹¹⁸.

Cabe salientar que as amostras de aveia e arroz foram apenas descascadas e moídas, não sendo separadas as camadas usuais de beneficiamento de cada grão em moinhos convencionais. O teor lipídico encontrado para as amostras de arroz e trigo está relacionado à cultivar e ao tipo de beneficiamento do grão, sendo que a maior ou menor retirada das camadas externas tem influência especial nos valores de lipídios¹⁶.

As cultivares de arroz BR 410 e BR 424 apresentaram maior teor de cinzas em relação às cultivares de aveia UPFA 20 Teixeirainha e UPFA 22 Temprana e de trigo Ônix, Pampeano e Safira. No caso deste trabalho, as variações nos teores de cinzas podem ser explicadas pelas diferentes cultivares utilizadas e possivelmente pelo local de cultivo. O teor de cinzas para as cultivares de trigo BRS Angico e Rubi foram de 0,14 e 0,6 g.100g⁻¹, respectivamente; portanto, como já mencionado, a variabilidade é afetada por outros fatores de efeito mais complexo que a forma da moagem¹⁹.

Os maiores teores de proteína foram obtidos na aveia UPFA Pampa, seguida da aveia UPFA 20 Teixeirainha e arroz BR 417. A proteína bruta encontrada para aveia UPFA 20 Teixeirainha foi de 14,4 g.100g⁻¹¹⁸, enquanto que a média em quatro amostras de aveia foi de 15 g.100g⁻¹, no trabalho realizado por Pedó e Sbarbieri⁴.

A porcentagem de fibra bruta no trigo Pampeano foi maior que a verificada nas demais amostras. Os valores encontrados para fibra bruta para as cultivares de aveia UPFA 20 Teixeirainha e UPF 18 de 13 g.100g⁻¹¹⁸ foram bem acima dos verificados neste trabalho. Fato que pode ser decorrente do uso de método químico para a determinação desse componente²⁰. O teor médio de fibras presente nas amostras de arroz foi de 0,5 g.100g⁻¹, semelhante ao estudado por outros autores, que também encontraram 0,5 g.100g⁻¹ de fibras no endosperma amiláceo; enquanto que na fração casca mais farelo o valor foi de 32,4 g 100g⁻¹²¹.

Nas variedades de trigo Safira, Ônix e Pampeano, as proteínas metabólicas, albumina e globulina, corresponderam a 34 g.100g⁻¹, 35 g.100g⁻¹ e 36 g.100g⁻¹, do total de proteína bruta (Tabela 2), sendo que a globulina foi obtida em valores mais baixos que as demais, o que pode estar associado a condições de cultivo ou a outras variáveis abióticas.

Nas variedades de aveia estudadas, a fração glutelina foi estatisticamente superior às demais e a albumina não diferiu da prolamina. A discordância entre os estudos realizados pode ser atribuída também à incompleta extração, especialmente, da globulina, visto que essa proteína pode ter sido extraída em alguma etapa posterior, estando misturada às demais frações⁴.

Nas amostras de arroz, foi observado que a cultivar BR 417 apresentou maior teor de proteína bruta (Tabela 1) e de reserva, a glutelina, constituindo 75 g.100g⁻¹ do total. Os resultados encontrados demonstraram que seria possível estabelecer um fator de correlação para a fração glutelina como indicativo da presença de aminoácidos essenciais, visto que esta é a mais rica neles²², ou ainda estimar o conteúdo de inibidores enzimáticos, usualmente presentes nesta fração¹⁴.

A composição em proteínas também é afetada pela característica genotípica e não só há diferença na concentração total de proteína entre cultivares como, também, há na distribuição das frações proteicas solúveis²³. Neste trabalho, a maior variação foi observada para a glutelina e globulina nas amostras de arroz, cujas concentrações variaram entre 6 e 10 g.100g⁻¹, correlacionados positivamente com o teor total de proteína.

Tabela 2. Distribuição das frações proteicas solúveis e digestibilidade *in vitro* em arroz, aveia e trigo^{1,2}

Amostra	Albumina (%)	Globulina (%)	Prolamina (%)	Glutelina (%)	Digestibilidade (%)
Arroz 410	32,0 ^h	37,8 ^{efg}	4,1 ^q	26,2 ^{ji}	71,6 ^{BC}
Arroz 417	33,0 ^{gh}	8,1 ^{opq}	6,8 ^{pq}	52,0 ^a	55,3 ^{DE}
Arroz 424	39,1 ^{ef}	12,3 ^{no}	9,2 ^{op}	39,5 ^{de}	91,8 ^A
Aveia UPFA Pampa	16,7 ^{mn}	5,6 ^{pq}	26,1 ^{ij}	51,6 ^a	40,2 ^F
Aveia UPFA 20 Teixeirainha	19,1 ^{klm}	8,4 ^{opq}	22,3 ^{jkl}	50,2 ^{ab}	78,4 ^B
Aveia UPFA 22 Temprana	22,2 ^{jkl}	8,5 ^{opq}	18,5 ^{lm}	50,6 ^a	52,7 ^E
Trigo Safira	23,5 ^{jkl}	10,3 ^{op}	24,4 ^{jk}	41,9 ^{cde}	74,7 ^{BC}
Trigo Ônix	22,7 ^{jkl}	12,0 ^{no}	22,1 ^{jkl}	43,4 ^{cd}	66,7 ^{CD}
Trigo Pampeano	23,8 ^{jk}	12,5 ^{no}	34,0 ^{fgh}	29,7 ^{hi}	76,5 ^{BC}

Resultados representam a média de três determinações. ¹Letras minúsculas diferem estatisticamente entre cada fração proteica de todos os cereais estudados. ²Letras maiúsculas diferem estatisticamente entre a digestibilidade de todos os cereais estudados

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

Na relação entre as massas de cada fração em função da quantidade de proteína presente nas amostras, ficou demonstrado que a fração glutelina apareceu em percentuais semelhantes em aveia e trigo, enquanto que nas cultivares de arroz a variação foi entre 26 e 52 g.100g⁻¹. O arroz também foi o cereal que apresentou maiores quantidades de albumina (1,5 vezes, em média) e menores de prolamina (2 vezes, em média). O trigo possui quantidades elevadas de prolamina e glutelina, sendo baixas as quantidades de albumina e globulina, o que está associado às suas propriedades funcionais distintas dos demais cereais²⁴.

A metodologia adotada para determinação da solubilidade possui características inerentes que podem afetar a exatidão dos seus resultados, tais como granulometria da amostra, velocidade de rotação da centrífuga e tempo de centrifugação. Avaliar esses parâmetros comparados ao procedimento clássico³ pode auxiliar na obtenção de melhores correlações entre o fracionamento proteico e o seu conteúdo total. Não foram realizadas adaptações do método já citado para cada matriz, mas, ainda assim, os resultados obtidos apresentaram o perfil esperado, pois a maior parte da fração proteica do arroz foi solúvel em água (albumina), aveia em solução alcalina (glutelina) e trigo em água e solução alcalina.

Os valores de digestibilidade proteica *in vitro* dos cereais estudados estão apresentados na Tabela 2. O maior valor de digestibilidade foi encontrado para o arroz BR 424 e o menor para aveia UPFA Pampa. O valor de digestibilidade encontrado no arroz foi de

85 g.100g⁻¹²⁵, semelhante ao cultivar BR 424 e acima do BR 417. As três variedades estudadas apresentaram diferentes percentuais de digestibilidade entre si, demonstrando que, além de fatores ambientais, os genéticos também afetam o conteúdo proteico e a sua digestibilidade para esses cereais.

As digestibilidades das amostras de trigo apresentaram valores em torno de 73 g.100 g⁻¹, sendo que as variedades Safira e Pampeano não diferiram estatisticamente entre si, enquanto que a variedade Ônix foi ligeiramente inferior. Farinha de arroz, trigo e trigo integral apresentaram digestibilidade *in vitro* de 85, 86 e 84 g.100g⁻¹, respectivamente²⁵. O menor valor de digestibilidade foi encontrado para a aveia, cultivar UPFA Pampa, enquanto que, em outro estudo, as porcentagens de digestibilidade em cultivares de aveia UPF15, UPF16 e UFRGS14 foram de 80, 92 e 87 g.100g⁻¹, respectivamente⁴.

O baixo valor de digestibilidade encontrado em algumas amostras pode ser atribuído à presença de inibidores enzimáticos de proteases, que podem estar ativos nos cereais estudados que não foram submetidos a processo físico que ocasionasse desnaturação proteica. Os outros compostos associados que podem modificar e diminuir a digestibilidade são os carboidratos não digeríveis associados às proteínas presentes nas matrizes vegetais⁴.

Nos cereais, a atividade enzimática pode ser detectada durante a germinação precoce, sendo essencial para o crescimento e obtenção de energia²⁶. A Figura 1 representa os resultados referentes à atividade específica

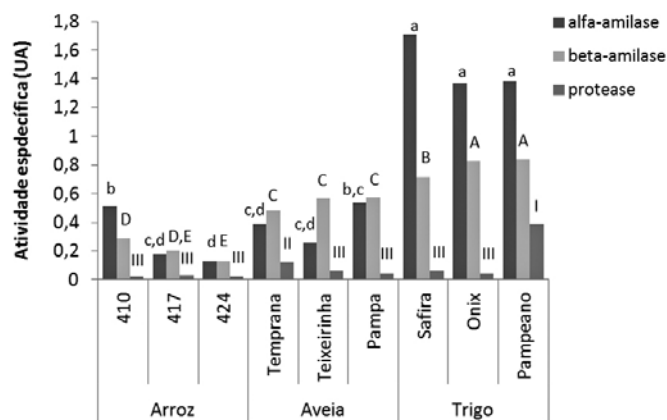


Figura 1. Atividade específica da α -amilase, β -amilase¹ e protease². UA = atividade enzimática específica

¹Letras minúsculas diferem estatisticamente entre os resultados da alfa-amilase, enquanto que letras maiúsculas diferem estatisticamente entre os resultados da beta-amilase. ²Números romanos diferem estatisticamente entre si

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

das enzimas presentes nos cereais e expressos em unidades de atividade específica (UA).

As três variedades de trigo apresentaram maior atividade de α -amilase e β -amilase do que as amostras de aveia e arroz, o que pode estar relacionado ao fato de esse cereal estar entre os mais susceptíveis à germinação e contaminação fúngica²⁷. Um estudo sobre a distribuição de alfa-amilase em diferentes frações de trigo permitiu concluir que o aumento do grau de extração da farinha ocasionava diminuição da atividade enzimática, demonstrando que essa enzima se encontra nas camadas mais externas do grão, como farelo e escutelo²⁸. A

atividade da beta-amilase aumentou com a germinação, sendo um bom indicador da capacidade de germinação de sementes de arroz armazenadas²⁶. Estes dados permitiram diagnosticar que o trigo, nas condições de armazenamento realizadas, parece ser o mais susceptível à germinação, pois apresentou a maior atividade de beta-amilase.

Comparado ao trigo, a atividade de enzimas amilolíticas na aveia foi menor, o que pode estar relacionado com os maiores teores de fibras e lipídios, dificultando a extração enzimática. As amostras de arroz apresentaram menor atividade de alfa e beta-amilase, sugerindo a presença de inibidores enzimáticos ativos, o que é bastante provável por tratar-se de amostras de grãos recém-colhidos (safra 2009); ao contrário das demais, cujos períodos de coleta foram anteriores.

A atividade específica de protease apresentou variações, sendo o trigo Pampeano, seguido pela aveia UPFA 22 Temprana, o que se destacou pelos maiores níveis de atividade. As variedades de arroz BR 410, BR 417 e BR 424, contrariamente, apresentaram baixa atividade destas enzimas.

Ao relacionar a fração proteica com os resultados de digestibilidade e solubilidade, constatou-se que as amostras de arroz, com menor teor de proteína solúvel (4,3 mg g⁻¹, em média), apresentaram maior digestibilidade e solubilidade. Isto está de acordo com os dados em que o arroz BR 424 possui as maiores quantidades de albumina e globulina. O aumento do teor de proteína solúvel em soluções aquosas apresentou uma correlação positiva com as atividades de alfa e beta-amilase e uma correlação negativa com a protease.

Tabela 3. Inibição da amilase fúngica, pelo sistema com etanol e tampão, com diferentes quantidades de extrato bruto para as variedades de trigo e aveia¹ e atividade inibitória específica²

Sistema extração	% Inibição					
	Aveia			Trigo		
	Pampa	Teixeirinha	Temprana	Safira	Ônix	Pampeano
Acetato	ND ³	ND ³	ND ³	ND ³	ND ³	ND ³
Fosfato	22,1±0,87 ^{cde}	10,3±3,40 ^e	28,4±5,09 ^{bcd}	17,9±0,00 ^d	25,7±1,62 ^d	19,4±2,16 ^d
Etanol	45,9±4,93 ^{abcd}	18,2±8,13 ^{de}	61,8±1,30 ^a	55,9±0,02 ^{ab}	66,9±0,70 ^a	37,2±1,19 ^{cd}
Sistema extração	Atividade inibitória específica					
	Aveia			Trigo		
	Pampa	Teixeirinha	Temprana	Safira	Ônix	Pampeano
Fosfato	2394	7377	3938	4914	5732	3908
Etanol	80985	98320	15591	20931	18923	17649

¹Resultados representam a média de três repetições. ²Atividade inibitória específica = %I min-1µg de proteína⁻¹.

³ND = Atividade inibitória não detectada

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

A extração de inibidores enzimáticos com etanol é usual na literatura¹⁴ e foi previamente testada com amostras de aveia e trigo, mostrando-se a mais eficiente, de acordo com a Tabela 3.

A maior capacidade de inibição de amilase fúngica foi observada em cultivares de aveia. O trigo frequentemente é relatado na literatura por apresentar contaminação por fungos de campo, sugerindo que a avaliação realizada está correlacionada com a resistência a esses contaminantes. Considerando que nesta etapa o inibidor é uma proteína contida num estado não purificado, foi definida a atividade inibitória específica como %I min⁻¹µg de proteína⁻¹, apresentada na Tabela 3. As maiores atividades específicas verificadas nos extratos proteicos corroboram com a verificação anterior, em que este sistema foi mais eficiente para extração. Os resultados sugerem que proteínas indesejáveis foram eliminadas ou não extraídas. Destacaram-se os extratos proteicos obtidos de aveia, que foram 2 vezes superiores à capacidade de inibição quando comparados com as amostras de trigo. Os inibidores enzimáticos presentes no arroz também podem ser capazes de reduzir a ação da enzima utilizada na degradação do amido, sendo que a metodologia de extração será posteriormente adaptada.

CONCLUSÃO

As amostras de aveia apresentam o maior teor de proteínas, com destaque para a cultivar UPFA Pampa, onde também é demonstrada uma relação inversa entre o teor de fibra e a digestibilidade dos cereais. A fração albumina é maior nas amostras de arroz, enquanto que na aveia predomina a proteína solúvel em meio alcalino, glutelina. No trigo, prolamina e glutelina constituem mais da metade do total de proteína solúvel. Nas cultivares de trigo, a atividade enzimática de α -amilase e β -amilase é em média 4 vezes maior que nas amostras de aveia e arroz.

A caracterização da fração proteica permite observar que a utilização da fração solúvel em etanol (prolamina) é promissora para o estudo de inibidor enzimático de amilase, sendo o trigo mais susceptível à contaminação por espécies fúngicas.

AGRADECIMENTOS

Ao IRGA, UPF e OR Melhoria de Sementes Ltda. pelo material experimental. À CAPES pela bolsa de estudos.

REFERÊNCIAS

1. McKeith B. Nutritional aspects of cereal. *Nutr Bull*. 2004;29(2):111-42.
2. Mackintosh SH, Meade SJ, Healy JP, Sutton KH, Larsen NG, Squires AM, et al. Wheat glutenin assemble into a nanostructure with unusual structural features. *J Cereal Sci*. 2009;49:157-62.
3. Osborne TB. The vegetable proteins. London: Longmans; 1924. p. 124.
4. Pedó I, Sgarbieri VC. Caracterização química de cultivares de aveia (*Avena sativa* L.). *Ciênc Tecnol Aliment*. 1997;17(2):78-83.
5. Fernandes LP, Ulchoa CJ, Asquieri ER, Monteiro VN. Produção de amilases pelo fungo *Macrophomina Phaseolina*. *Rev Eletr Farm*. 2007;IV:43-5.
6. Calda ED, Silva SC, Oliveira JN. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. *Rev Saúde Publ*. 2002;36(3):319-23.
7. Figueira ELZ, Blanco-Labra A, Gerage AC, Ono EYS, Mendiola-Olaya E, Ueno Y, ET al. New amylase inhibitor present in corn seeds active *in vitro* against amylase from *Fusarium verticillioides*. *Plant Dis*. 2003;87(3):233-40.
8. Zhou Z, Robards K, Heliwell S, Blanchard C. Composition and functional properties of rice. *Int J Food Sci Tech*. 2002;37:849-68.
9. Association of Official Analytical Chemists [AOAC]. Official Methods of Analysis of International. Estados Unidos; 2000. CD-ROM.
10. Osborne DR, Voogt P. The analysis of nutrient in foods. London: Academic Press;1978. p. 251.
11. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Andall RJ. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193:265-75.
12. Sgarbieri VC. Proteínas em Alimentos Proteicos: Propriedades, degradações, modificações. São Paulo (SP): Livraria Varela; 1996. p. 517.
13. Baraj E, Garda-Buffon J, Badiale-Furlong E. Effect of Deoxynivalenol and T-e Toxin in Malt Amylase Activity. *Braz Arch Biol Tecnol*. 2010;53(3):505-11.
14. Mosca M, Boniglia C, Carratu B, Giammarioli S, Nera V, Sanzini E. Determination of alpha-amylase inhibitor activity of phaseolamin from kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) in dietary supplements by HPAEC-PAD. *Anal Chim Acta*. 2008;617:192-5.
15. Marsaro-Júnior AL, Lazzari SMN, Figueira ELZ, Hirooka E. Inibidores de amilase em híbridos de milho como fator de resistência a *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Neotrop Entomol*. 2005; 34(3):443-50.
16. Silva RF, Ascheri JLR, Pereira RGFA. Composição centesimal e perfil de aminoácidos de arroz e pó de café. *Rev Aliment Nut*. 2007;18(3):325-30.
17. Brasil. Resolução-RDC nº 263 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 22 set.2005. Seção I, pg. 368.
18. Simioni D, Gutkoski LC, Elias MC, Deuner CC, Pagnussatt FA, Oliveira M. Secagem intermitente e armazenamento de aveia cultivar UPFA 20 Teixeira. *Rev Bras Agrociênc*. 2007;13(2): 211-7.

19. Gutkoski LC, Pagnussatt FA, Spier F, Pedó I. Efeito do teor de amido danificado na produção de biscoitos tipo semi-duros. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2007;27(1):787-92.
20. Badiale-Furlong E, Gonçalves AA, Souza-Soares LA. Enzymatic determination of soluble and insoluble dietary fiber in rice and wheat bran. *Arch Latinoam Nutr*. 1998;48(4):35-44.
21. Dors GC, Pinto RH, Badiale-Furlong E. Influência das condições de parboilização na composição química do arroz. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2009; 29(1):219-24.
22. Walter M, Marchezan E, Ávila LA. Arroz: composição e características nutricionais. *Ciênc. Rural*. 2008;38:1184-92.
23. Liu ZH, Cheng F, Zhang G. Grain phytic acid content in japonica rice as affected by cultivar and environment and its relation to protein content. *Food Chem*. 2005; 89(1):49-52.
24. Mendichi R, Fisichella S, Savarino A. Molecular weight, size distribution and conformation of Glutenin from different wheat cultivars by SECeMALLS. *J Cer Sci*.2008;48: 486-93.
25. Wolzak A, Bressani R, Brenes RG. A comparison of in vivo and *in vitro* estimates of protein digestibility of native and thermally processed vegetable proteins. *Plants food Hum Nutr*. 1981;31(1):31-43.
26. Nandi S, Das G, Sen-Mandi S. β -amylase activity as an Index for germination potential in rice. *Ann Bot*. 1995;75:463-7.
27. Calori-Domingues MA, Almeida RR, Tomiwaka MM, Gallo CR, Gloria EM, Dias CTS. Ocorrência de deoxinivalenol e trigo nacional e importado utilizado no Brasil. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2007;27(1):181-5.
28. Rani KU, Prasada-Rao UJS, Leelavathi K, Haridas-Rao P. Distribution of Enzymes in Wheat Flour Mill Streams. *J Cer Sci*. 2001;34:233-42.

Ocorrência de nitratos e nitritos em queijos Minas Frescal, Mussarela, Parmesão e Prato

Occurrence of nitrate and nitrite in cheeses Minas Frescal, Mozzarella, Parmesan and Prato

RIALA6/1363

Janilson Fernandes GONÇALVES¹, Wemerson de Castro OLIVEIRA², Claudia Aparecida de Oliveira e SILVA^{3*}, Mariem Rodrigues Ribeiro CUNHA³, Flavio Rodrigues PEREIRA³

*Endereço para correspondência: ³Serviço de Química, Divisão de Vigilância Sanitária, Instituto Octávio Magalhães, Fundação Ezequiel Dias, Rua Conde Pereira Carneiro, 80, Gameleira, Belo Horizonte/MG, Brasil. CEP 30510-010. Tel.: 31 3371-9471 / 31 9988-5042. E-mail: claudia.aparecida@funed.mg.gov.br e claudiaufv@yahoo.com.br.

¹Instituto Metodista Izabela Hendrix

²Universidade Federal de Viçosa

Recebido: 08.11.2010 – Aceito para publicação: 17.05.2011

RESUMO

Neste trabalho foram avaliados os teores de nitratos e nitritos em queijos expostos à venda no Estado de Minas Gerais em 2009. As análises qualitativas e quantitativas foram realizadas em 77 amostras de queijos: Minas Frescal, Mussarela, Parmesão e Prato, coletadas pela Vigilância Sanitária por meio de PROMAC – Programa de Monitoramento de Aditivos e Contaminantes. Do total de amostras de queijo Minas Frescal, 7% apresentaram não conformidade com a legislação brasileira, em função da presença de nitrato. Os teores de nitrato estavam acima do limite estabelecido pela legislação em 18% das amostras de queijo Parmesão. No queijo Prato foram encontradas 10% das amostras com teor de nitrato acima do limite máximo permitido. Todas as amostras de queijo Mussarela avaliadas estavam em conformidade com a legislação. Em todas as amostras de queijo analisadas neste estudo não houve ocorrência de nitrito.

Palavras-chave. lácteos, nitrosaminas, legislação, padrões de identidade.

ABSTRACT

The occurrence of nitrate and nitrite contents was assessed in cheeses marketed in the State of Minas Gerais in 2009. The qualitative and quantitative analyses were performed in 77 samples of four different types of cheeses: Minas Frescal, Mozzarella, Parmesan and Prato, which were collected by the Sanitary Surveillance through PROMAC – Food Additives and Contaminants Monitoring Program. Of the total cheese samples analyzed, 7% showed the presence of nitrate and being nonconformity with Brazilian legislation. In Parmesan cheese, 18% of samples showed the nitrate contents above the limit established by legislation. Nitrate levels above the allowed maximum limit were found in 10% of Prato cheese samples. All of Mozzarella cheese samples were in compliance with the legislation. None of the cheese samples analyzed in this study showed the presence of nitrite.

Keywords. milk, milk products, nitrosamines, legislation, standards of identity.

INTRODUÇÃO

Sais de nitrato e nitrito são aditivos comumente utilizados em alimentos, desempenhando tanto a função de conservantes, evitando sua deterioração^{1,2}, como a de antioxidantes de lipídeos e realçadores da cor. Dentre os diversos alimentos que contêm o nitrato como conservante, destacam-se os embutidos como: salsicha, linguiça, bacon, salame, presunto e mortadela³.

Nas indústrias de laticínios, os sais de nitrato são utilizados por possuírem ação inibidora sobre bactérias esporuladas do grupo butírico, especialmente *Clostridium butyricum* e *Clostridium tyrobutyricum*, principais responsáveis pelo estufamento tardio nos queijos. Estas bactérias, quando presentes no queijo, fermentam o lactato, produzindo na massa ácido butírico, gás carbônico e hidrogênio. Esses gases são responsáveis pela formação de olhaduras grandes e irregulares no interior dos queijos e pela formação de trincas na casca, provocando deformação, alteração do sabor e conseqüentemente prejuízos econômicos para a indústria⁴.

Uma vez que o grupo butírico é composto por microrganismos esporulados, o nitrito possui ação inibidora contra a germinação e o crescimento dos esporos. A inibição ocorre pelo acúmulo de peróxido de hidrogênio resultante da reação de formação de nitrosomioglobina^{1,2}.

Segundo Furtado⁴, os resultados obtidos com o uso de sais de nitrato em queijos dependem do pH, teor de sal e umidade, além do nível de contaminação inicial do leite. O mesmo autor reporta que para a redução do nitrato para nitrito no queijo é necessária a ação da enzima xantina oxidase, a qual é inativada se o leite for aquecido a temperaturas superiores a 80 °C por 10 segundos. Entretanto, o uso desses sais ainda é uma necessidade tecnológica no Brasil, pois outros métodos que combatem o estufamento tardio não contam com apoio legal, ou dependem de melhoria da qualidade higiênica⁵⁻⁹, de apoio financeiro (salvo as usinas de grande porte), de tecnologia ou mesmo da comprovação de sua eficiência¹⁰.

O maior problema associado à ingestão desses sais está relacionado com seu potencial efeito tóxico em indivíduos expostos a esses aditivos, o que depende tanto da quantidade ingerida quanto da susceptibilidade do organismo¹¹. O excesso desses íons causa danos à saúde humana e é preocupante sob o ponto de vista toxicológico, uma vez que o nitrato é convertido em N-nitrosaminas, que possuem ação carcinogênica após a digestão^{2,12-15}.

Nitrosaminas são compostos N-nitrosos (NOC), formados pela interação entre um grupo de nitrogênio secundário (amina, amida, alquil-ureia ou um anel peptídico) e um agente nitrosante¹⁶⁻¹⁸. Os agentes nitrosantes reagem rapidamente com superóxido para formar peróxido de nitrito (ONOO-), o qual é altamente reativo e responsável pelos efeitos celulares adversos como o câncer¹⁵.

O nitrato possui basicamente duas maneiras distintas de conversão em nitrito: na primeira, pode ocorrer redução do nitrato em nitrito no próprio alimento devido às condições que ele oferece; e na segunda, uma conversão através da redução pela ação de bactérias redutoras no trato gastrointestinal e no estômago, onde pode chegar a ser transformado em nitrosamina¹⁸. Foi observado por Mcknight et al.¹⁹ que, além dessas possibilidades de transformação do nitrato em nitrito, nas condições ácidas do estômago, o nitrito também dá origem aos agentes nitrosantes, através de sua decomposição em ácido nitroso (HNO₂) e este em vários óxidos de nitrogênio espontaneamente.

O nitrito é bem mais tóxico que o nitrato e produz vasodilatação e relaxamento da musculatura lisa em geral²⁰. Além disso, quando está presente no organismo, especialmente no infantil, age sobre a hemoglobina, oxidando o ferro (Fe) ao estado férrico, impedindo assim a função normal da hemoglobina de transportar oxigênio, doença conhecida como metemoglobinemia, que pode levar à anoxia e morte²¹. A avaliação dos teores de nitratos e nitritos nos alimentos em geral deve ser realizada a fim de que a Ingestão Diária Aceitável (IDA) não seja ultrapassada, o que colocaria em risco a população. O Brasil utiliza como referência os mesmos valores de IDA do Mercosul e da FAO/OMS: 0,06 mg/Kg/dia de íon nitrito e 3,7 mg/Kg/dia para nitrato. Deve-se ressaltar que a IDA não deve ser aplicada para crianças menores de 3 meses de idade. Alimentos destinados a crianças com menos de 6 meses de idade não podem conter nitrito como aditivo¹⁰.

O Padrão Geral de Identidade e Qualidade de Queijos (PIQ) está descrito na Portaria nº 146 de 1996 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)²². De acordo com a portaria, permite-se a adição de nitrato de sódio ou potássio em queijos, com exceção daqueles classificados como de alta umidade (46,0 a 54,9% m/m) ou muito alta umidade (maior ou igual a 55,0% m/m), até um limite máximo de 50 mg/Kg (ppm), quantificados como nitrato de sódio ou potássio, isolados ou combinados. Para os nitritos, o critério de aceitação é ausência, independentemente do teor de umidade do queijo.

O queijo Minas Frescal é regulamentado pela Portaria 352 de 1997²³, que o classifica como queijo de muito alta umidade e que não pode conter nitratos e nitritos. O queijo Mussarela possui seu regulamento descrito na Portaria 364 de 1997²⁴, a qual o classifica como queijo de média, alta ou muito alta umidade. A norma regulamentadora do queijo Prato é a Portaria 358 de 1997²⁵, que o classifica como queijo de média umidade, e para o queijo Parmesão temos a Portaria 353 de 1997²⁶, que o classifica como queijo de baixa umidade.

A Fundação Ezequiel Dias (Funed) – Laboratório Central de Saúde Pública de Minas Gerais (Lacen-MG), através da Divisão de Vigilância Sanitária, em parceria com as Vigilâncias Sanitárias Estadual e Municipais, e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), realiza o monitoramento de alimentos expostos ao consumo em Minas Gerais, principalmente aqueles mais susceptíveis às contaminações e adulterações físico-químicas. Um dos programas realizados em 2009 foi o PROMAC – Programa de Monitoramento de Aditivos e Contaminantes, que avalia a presença de aditivos e contaminantes, como nitratos e nitritos, corantes naturais e artificiais, sulfitos e metais pesados em alimentos como derivados lácteos, sucos em pó e prontos para beber, balas e pirulitos, doces e geleias.

No presente estudo teve-se como objetivo avaliar a ocorrência de nitratos e nitritos em queijos, Minas Frescal, Mussarela, Prato e Parmesão, comercializados no estado de Minas Gerais no ano de 2009, tanto por técnicas qualitativas como quantitativas, conforme os Padrões de Identidade e Qualidade desses produtos.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

As análises foram realizadas no Laboratório de Química Bromatológica e Cromatografia da Funed/Lacen-MG, no período de abril a novembro de 2009. Foram analisadas 29 amostras de queijo Minas Frescal, 27 de Mussarela, 11 de Parmesão e 10 de Prato, totalizando 77 amostras. Estas foram coletadas aleatoriamente em diversos estabelecimentos do comércio do estado, pela Vigilância Sanitária Municipal, de acordo com o cronograma da Secretaria Estadual de Saúde, como parte do PROMAC.

Metodologia

Para as determinações qualitativa e quantitativa de nitratos e nitritos, foram utilizadas as publicações

oficiais do MAPA (Instrução Normativa 68/2006 e Portaria 01 de 1981)^{27,28}.

A determinação quantitativa dos teores de nitrato e nitrito foi aplicada somente para queijos de média e baixa umidade, conforme classificações consultadas nos Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade (RTIQ's) específicos para cada tipo de queijo. Os queijos não enquadrados nesta classificação foram submetidos apenas à análise qualitativa, uma vez que o critério de aceitação é somente presença ou ausência de nitrato e nitrito, não interessando sua quantificação. Para o queijo Mussarela, antes de se definir qual metodologia seria empregada, fez-se necessária a realização da determinação da umidade, por ser um queijo que pode ter classificação diversa.

Determinação qualitativa

Clarificação

Foram pesados 10 gramas das amostras de queijo previamente processadas e homogeneizadas em um béquer de 250 mL. Em seguida, adicionou-se 25 mL de tetraborato de sódio (bórax) 5% e 100 mL de água destilada fervente. As misturas foram mantidas em banho-maria por 15 minutos com agitação ocasional. Após este processo, resfriou-se a temperatura ambiente. Adicionou-se 10 mL de ferrocianeto de potássio 0,25 M e 10 mL de acetato de zinco 1,0 M com agitação sequencial e repouso por 30 minutos a temperatura ambiente. Após o repouso, as amostras foram filtradas em papel filtro qualitativo²⁸.

Pesquisa de nitratos

Foram transferidos 5 mL de cada filtrado para um tubo de ensaio. Adicionou-se 1 gota de solução saturada de cloreto de sódio em cada recipiente e 4 mL de solução de difenilamina 17,0 mg/100mL (esta solução foi preparada com 30 mL do volume total de água e o restante de ácido sulfúrico concentrado) cuidadosamente pelas paredes do tubo. As amostras foram mantidas em repouso por 30 minutos para avaliação do resultado. Fez-se o branco nas mesmas condições, utilizando-se 5 mL de água ultrapura em substituição da amostra. Também foi feito um controle positivo fortificando uma amostra com 0,6 mL de uma solução-padrão de nitrato de sódio a 1%. O desenvolvimento de um anel de coloração azul indicou a presença de nitratos na amostra²⁸.

Pesquisa de nitritos

Foram transferidos 10 mL dos mesmos filtrados para um tubo de ensaio, onde foram adicionados 5 mL da

solução tampão pH 9,6 – 9,7 (HCl/NH₄OH) e 10 mL do reagente de cor (ácido sulfanílico e α -naftol em ácido acético 15%) em ausência de luz direta. Os tubos foram mantidos em repouso por 30 minutos para desenvolvimento da coloração. Como na determinação de nitratos, também foi feito um branco e um controle positivo nas mesmas condições das amostras, sendo que o controle positivo foi realizado a partir de uma solução de nitrito de sódio a 10 mg/L (ppm). O desenvolvimento de coloração rósea alaranjada indicou a presença de nitritos na amostra²⁸.

Determinação Quantitativa

Clarificação

Foram pesados 10 gramas da amostra em béquer de 100 mL. Ao béquer foram adicionados 5 mL de solução de tetraborato de sódio a 5% (bórax) e 40 mL de água fervente. O conteúdo foi deixado em banho-maria com agitação constante por 15 minutos e em seguida resfriado a temperatura ambiente. Todo o conteúdo do béquer foi transferido quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL. O conteúdo do balão foi submetido ao processo de clarificação através da adição de 10 mL de solução de ferrocianeto de potássio 0,25 M e 10 mL de solução de acetato de zinco 1,0 M sob agitação. O conteúdo do balão foi completado com água ultrapura e filtrado em papel filtro qualitativo²⁷.

Nitrito original

Para a determinação de nitrito original presente na amostra, foram transferidos 20 mL do filtrado clarificado para balão volumétrico de 100 mL e procedeu-se a reação de cor²⁷.

Nitrito total – Redução do nitrato a nitrito

Foram transferidos 20 mL do filtrado para um erlenmeyer de 125 mL. Em seguida, foram adicionados 5 mL de solução tampão (pH 9,6 – 9,7) e aproximadamente 20 g de cádmio esponjoso ao erlenmeyer, o qual foi colocado no agitador por 30 minutos. O sobrenadante foi filtrado em papel filtro qualitativo diretamente em balão volumétrico de 100 mL²⁷.

Reação de cor para determinação do nitrito

Foram transferidos 10 mL do conteúdo do balão de 100 mL para um balão volumétrico de 25 mL âmbar, onde foram adicionados mais 5 mL da solução tampão e 10 mL do reagente de cor (os mesmos utilizados na pesquisa de

nitritos). O conteúdo foi agitado. O balão foi mantido a 25 °C ao abrigo da luz por 30 minutos. Em seguida, fez-se a leitura em espectrofotômetro a 480 nm. Os cálculos para determinação do conteúdo de nitrito original e total foram realizados com base na equação obtida através da curva de calibração, com a leitura de padrões de nitrito (0,10; 0,40; 0,80; 1,20; 2,00 e 2,40 mg/L) na mesma faixa espectral. O teor de nitrato foi determinado a partir da diferença entre o teor de nitrito total e original multiplicado pelo fator de conversão. Os resultados finais foram convertidos em miligramas de nitrato ou nitrito por massa de amostra²⁷.

Avaliação da eficiência de redução do cádmio esponjoso

A avaliação da eficiência de redução do cádmio esponjoso foi determinada através da redução de uma solução-padrão de nitrato de sódio, que foi analisada concomitantemente com as amostras²⁷.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi verificada a presença de nitratos em 7% das amostras de queijo Minas Frescal, estando em desacordo com a legislação, Portaria nº 352 de 1997²³, que preconiza a ausência total desses sais na composição desse queijo, por ele ser classificado como um queijo de muito alta umidade.

Após determinação da umidade, 9 das 27 amostras de Mussarela foram classificadas como de alta ou muito alta umidade, sendo direcionadas para avaliação qualitativa. Em nenhuma delas foi detectada a presença de nitratos e de nitritos, estando de acordo com as legislações estabelecidas.

Quando foram determinados quantitativamente nitratos nas amostras de queijo Mussarela, Parmesão e Prato, observou-se que o queijo Parmesão apresentou valores de até 121,38 mg/Kg, ultrapassando o máximo permitido de 50 mg/Kg de queijo em 18% das amostras. Para o queijo Prato, foram encontrados valores até 56,77 mg/Kg (10% de amostras não conformes). Já para Mussarela, todas as amostras avaliadas quantitativamente estavam em conformidade para o valor estabelecido, apresentando, no máximo, 10,17 mg/Kg de queijo. Também não foram quantificados nitritos em nenhuma destas amostras. Tanto para nitrato como para nitrito, o limite de quantificação do método foi de 5 mg/Kg de queijo (Tabela 1).

Seraphim e Siqueira¹⁰ avaliaram amostras de queijos industrializados e caseiros, não verificando a

Tabela 1. Avaliação quantitativa de Nitrato em amostras de queijo Mussarela, Parmesão e Prato coletadas no ano de 2009

Queijo	Amostras Avaliadas	Limite Máximo estabelecido	Avaliação	
			Satisfatório (%)	Não conformidades (%)
Mussarela	18	50 mg/Kg	100	0
Parmesão	11		82	18
Prato	10		90	10

presença de nitratos e nitritos em quantidades superiores a 10 mg/kg na maioria delas (88,37%). Silveira et al.⁵ mostraram resultados muito semelhantes aos obtidos nesse trabalho, onde foram analisadas 112 amostras de queijos e verificado que em 104 (92,85 %) não havia nitrato e nitrito detectável (LD=10 mg/kg), e em 8 (7,14%) apenas o nitrato estava presente. Zerfiridis e Manolkidis²⁹ analisaram 54 amostras de queijos da Grécia, 20,4% apresentaram nitrato entre 35 e 104 mg/Kg e 46,3% foram negativos para nitrato e nitrito.

Para alguns estudiosos, os baixos níveis de nitrato e nitrito encontrados em queijos estão relacionados com a alta solubilidade desses íons em água, ficando pequena parte adsorvida na superfície das micelas da caseína coagulada⁶.

Valores de nitrato em alta concentração foram encontrados por Pimentel et al.³⁰, onde a presença foi observada em todas as amostras analisadas, com teores médios que variam de 5,11 a 159,1 mg/Kg. Teores médios mais elevados de nitrato de sódio foram encontrados em queijo tipo parmesão (49,09 mg/Kg), seguido por queijo parmesão (25,99 mg/Kg) e pelo queijo ralado (25,22 mg/Kg). Do total, 20% das amostras do queijo parmesão ralado, 25% das amostras de queijo tipo parmesão ralado e 25% das amostras de queijo ralado estariam em desacordo com o limite estipulado pela legislação. O mesmo autor reporta que a presença de nitrito de sódio foi observada em 94,4% das amostras analisadas, em teores que variaram de 4,15 a 129,2 mg/Kg. Teores médios mais elevados de nitrito de sódio foram encontrados em queijo tipo parmesão ralado (39,87 mg/Kg), seguido por queijo parmesão ralado (23,89 mg/Kg) e queijo ralado (20,46 mg/Kg).

A ausência de nitritos em queijos industrializados em que não foi detectado o nitrato foi reportada por outros pesquisadores, como Birkkjaer e Thomsen³¹; e Sen e Donaldson³². Provavelmente, isso se deve ao fato de que o nitrito, quando presente em queijos, é proveniente da redução do nitrato adicionado¹⁰.

A conversão de nitrato em nitrito no queijo ocorre pelas condições que o alimento oferece, como foi

observado por Levallois et al.³³. Portanto, a ocorrência de resultados positivos para a presença de nitrato e negativos para nitrito pode ser explicada pelo fato de o alimento não ter tido condições favoráveis para que ocorresse a redução do nitrato para nitrito.

Plutta et al.³⁴ mostraram que em estudo dos níveis de nitrato e nitrito em queijo produzido na Polônia, onde de 0,01 a 0,02% de nitrato de sódio foi adicionado durante a fabricação, encontraram-se quantidades relativamente baixas, médias de 10 mg/Kg de nitrato e 1 mg/kg de nitrito. Deve-se ressaltar que a presença de 1 mg/Kg de nitrito pode ser oriunda da redução do nitrato adicionado nas amostras.

CONCLUSÃO

O alto índice de não conformidade em queijos Parmesão e Prato indicam uso excessivo do nitrato nesse tipo de alimento.

A presença de nitrato em queijo Minas Frescal não era esperada em função de ser um produto de rápido consumo e o estufamento tardio não ser um problema característico desse tipo de queijo.

Os resultados reforçam a importância do monitoramento contínuo de aditivos intencionais em produtos como o queijo, largamente consumidos pela população.

REFERÊNCIAS

1. Almudena A, Lizano J. Nitratos, nitritos y nitrosaminas. Madrid: Fundacion Ibérica para La Seguridad Alimentaria; 2001.
2. Petenuci ME, Matsushita M, Souza NE, Visentainer JV. Nitratos e nitritos na conservação de carnes. *Rev Nac Carne*. 2004;333:1-2
3. Pérez Rodrigues ML, Bosch Bosch N, García Mata M. Monitoring nitrite and nitrate residues in frankfurters during processing and storage. *Meat Sci*. 1996;44(1):65-73.
4. Furtado MM. Principais problemas dos queijos: causas e prevenção. São Paulo (SP): Fonte Comunicação e Editora; 1999. p. 176.

5. Silveira NVV, Yabiku HY, Duarte M, Takahashi MY, Chicourel EL. Níveis de nitritos, nitratos e sorbatos em queijos comercializados na cidade de São Paulo. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 1991;51(1/2):37-40.
6. Abreu LR, Costa LCG, Furtado MM. Influência da adição de nitrato de sódio ao leite destinado a fabricação de queijo prato nos teores de nitrato e nitrito do soro e do queijo. *Rev Inst Lat Cândido Tostes*. 1986; 41(247):35-6.
7. Diraman H. A research on nitrite determination of cheese produced in Thrace region. *Gida*. 1993;18(5):293-5.
8. Glaesser H. Use of nitrite in cheese production. *Dairy Ind Int*. 1989;54(11):21-3.
9. Abo-Elnaga IG, Abdel-Mottaleg L, El-Gendy SM. Effect of some late-blowing inhibitors on bacteriological and chemical changes in Swiss cheese. *Sudan J Food Sci Tech*. 1974;6:32-5.
10. Seraphim KR, Siqueira MEPB. Nitratos e nitritos em queijos caseiros e industrializados comercializados na região sul de Minas Gerais, Brasil. *Arch Latinoam Nutr*. 2000;50(1):87-90.
11. Martins DI, Mídio AF. Toxicologia de alimentos. São Paulo (SP): Varela; 2000. 2ª ed. p. 295.
12. Duarte M, Mídio AF. Nitratos e nitritos em alimentos. *Cad Nutr*. 1996;12:19-30.
13. Lijinski W. Induction of tumours in rats by feeding nitrosatable amines together with sodium nitrite. *Food Chem Toxicol*. 1984;22:715-20.
14. World Health Organization – WHO. Nitrates, nitrites and N-nitroso compounds. Geneva; 1978. Environmental Health Criteria, n. 5.
15. Chow CK, Hong CB. Dietary vitamins and selenium and toxicity of nitrite and nitrate. *Toxicol*. 2002;180:195-207.
16. Britto AV. Câncer de estômago: fatores de risco. *Cad Saúde Pública*. 1997;13:1-12.
17. Mirvish SS. The diet cancer story. *Oxford Health News*. 1994;12(2):6.
18. Walker R. Nitrate, nitrites and N-nitrosocompounds: a review of the occurrence in food and diet and the toxicological implication. *Food Addit Contam*. 1990;7(6):717-68
19. Mcknight GM et al. Dietary nitrate in man: friend or foe? *Braz J Nutr*. 1999;81:349-58.
20. Sgarbieri VC. Alimentação e nutrição: fator de saúde e desenvolvimento. São Paulo (SP): Almed Editora e Livraria Ltda; 1987. p. 387.
21. Santos JS, Beck L, Walter M, Sobczak M, Olivo CJ, Costabeber I, et al. Nitrato e nitrito em leite produzido em sistemas convencional e orgânico. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2005;25(2):304-9.
22. Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Portaria nº 146 de 07 de março de 1996. Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 07 mar 1996. Seção 1, p. 3977.
23. Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Portaria nº 352 de 04 de setembro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Minas Frescal. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 08 set 1997. Seção 1, p. 19684.
24. Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Portaria nº 364 de 04 de setembro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Mozzarella (Muzzarella ou Mussarela). *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 08 set 1997. Seção 1, p. 19694-19695.
25. Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Portaria nº 358 de 04 de setembro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Prato. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 08 set 1997. Seção 1, p. 19690.
26. Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Portaria nº 353 de 04 de setembro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Parmesão, Parmesano, Reggiano, Reggianito e Sbrinz. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 08 set. 1997. Seção 1, p. 19684.
27. Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 68 de 12 de dezembro de 2006. Estabelece os métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 14 dez 2006. Seção 1, p. 8.
28. Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. Portaria nº 01 de 07 de outubro de 1981. Aprova os métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. II – Métodos Físicos e Químicos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 13 out 1981. Seção 1.
29. Zerfiridis GK, Manolkidis KS. Contents of nitrates and nitrites in some Greek and imported cheeses. *J Food Prot*. 1981;44(8):576-79.
30. Pimentel EF, Dias RS, Cunha MRR, Glória MBA. Avaliação da rotulagem e da qualidade físico-química e microbiológica de queijo ralado. *Rev Ciênc Tecnol Aliment*. 2002;22(3):289-94.
31. Birkkjaer HE, Thomsen D. Varying the addition of saltpetre in manufacture of different types of Danish cheese. *Beterning fra Statens Forsogsmejeri* 1978; 230.
32. Sen NP, Donaldson B. Improved colorimetric method for determination nitrate and nitrite foods. *J Assoc Off Anal Chem*. 1975;61:1755-60.
33. Levallois P, Phaneuf D. Contamination of drinking water by nitrates: analysis of health risks. *Can J Public Health*. 1994;85(3):192-6.
34. Pluta A, Zmarlicki S, Gawel J, Ostrowski S. Nitrate and nitrite in maturing cheese produced in Poland. *Przem Spozyw*. 1986;40(7/8/9):166-7.

Rapid analysis for predicting the expansion of the *polvilho azedo*

Análises rápidas para prever a expansão do polvilho azedo

RIALA6/1364

Maria Janete Angeloni MARCON, Diego Jacob KURTZ, Marcelo MARASCHIN, Valéria REGINATTO, Edna Regina AMANTE*

*Endereço para correspondência: Department of Food Science and Technology, Agricultural Sciences Centre, Federal University of Santa Catarina, Rodovia Admar Gonzaga, 1.346, Itacorubi, Florianópolis/SC, Brazil. CEP 88034-001. Phone: + 55 48 3721-5371. Fax: + 55 48 3721-9943. E-mail: eamante@cca.ufsc.br.

Recebido: 05.10.2010 – Aceito para publicação: 19.06.2011

ABSTRACT

Sour cassava starch (*polvilho azedo*) is a chemically and enzymatically modified starch. It is used to prepare the traditional baked goods. Because of its satisfactory expansion property, a light and alveolar structure is produced in baked food prepared with sour cassava starch, without adding any chemical or biological ferment. This study reports some easy and simple procedures for pre-estimating sour cassava starch expansion property. The correlation between the native cassava starches and the laboratory-produced sour cassava starch was analyzed. An investigation among the local bakers was carried out for inquiring into the *polvilho azedo* choice, and it disclosed some product brands. The *polvilho azedo* samples from these brands were also evaluated. Acid factor, pH, specific volume, swelling power and intrinsic viscosity characteristics were directly correlated with expansion property. The procedures for determining acid factor, pH and weight loss are easy and accessible methodologies which might be carried out at small industries and bakeries.

Keywords. cassava, expansion, fermentation, rheology, starch.

RESUMO

O polvilho azedo é um amido de mandioca em que são feitas modificações químicas e enzimáticas, sendo usado na fabricação de produtos tradicionais, como pão de queijo, em função de sua propriedade de expansão, que induz a formação de estrutura leve e alveolar, mesmo sem adição de qualquer produto químico ou fermento biológico. O presente trabalho foi realizado com o objetivo de estabelecer alguns procedimentos técnicos simples para efetuar a avaliação prévia da propriedade de expansão do polvilho azedo a ser utilizado. Foi estudada a relação entre os amidos de mandioca nativos e os do polvilho azedo produzido em laboratório. Um questionário foi aplicado entre os padeiros locais com o objetivo de averiguar o motivo para efetuar a escolha do polvilho azedo, o que conduziu a algumas marcas; essas marcas selecionadas foram também analisadas neste estudo. As características referentes a fator ácido, pH, volume específico, poder de inchamento e viscosidade intrínseca apresentaram boa correlação com a propriedade de expansão. As determinações de fator ácido, pH e perda de peso são procedimentos fáceis e acessíveis para serem efetuados em pequenas indústrias e padarias.

Palavras-chave. mandioca, expansão, fermentação, reologia, amido.

INTRODUCTION

Food and beverages from tropical roots are produced throughout the world involving numerous and diverse processes, resulting in functional compounds, additives and special properties of these novel or traditional products, when compared to the original raw material¹. This is the case of the sour cassava starch (*polvilho azedo*), for example, a naturally modified starch with special properties.

Numerous works intend to chemically show the expansion property of *polvilho azedo*, a fermented and sun dried cassava starch, considered a chemically and enzymatically modified product, with acidic characteristics, perforated granules and high expansion capacity²⁻⁸. Expansion is a natural characteristic of *polvilho azedo*, defined as the growth rate of the dough during oven cooking, also referred to as expansion rate⁹. It is directly related to specific volume, expressed in $\text{cm}^3.\text{g}^{-1}$. *Polvilho azedo* with good performance in bakery results in products with soft, alveolar structures, differently from non-fermented cassava starches, referred to as native cassava starch¹⁰.

In comparison to native cassava starch *polvilho azedo* is a product of low pH, high acid factor, low swelling power and low intrinsic viscosity, which implies a loss in the polymerization degree, due to structural changes during fermentation and sun drying^{11,12}.

Several works state the importance of hydrolysis and sun drying to define the properties of *polvilho azedo*, which contribute to dough expansion²⁻⁸. Meanwhile, there still is the uncertainty about physicochemical parameters to ensure commercialization of *polvilho azedo* of good-performance.

Nowadays sour cassava starch industries use a practical assay, making a sample of specimen (or *biscuit*) and if it expands, the *polvilho azedo* is suitable for commercialization. However, industries and bakeries either need to know the physicochemical variables for an easy determination or depend on a simplified analysis to determine the best *polvilho azedo*. A study¹⁰ suggested a chemical model of the expansion of *polvilho azedo*, aiming to find any variables that could be directly or indirectly related with it. The variables which could be considered in a *polvilho azedo* quality control system are: acid factor, pH, specific volume, swelling power, and intrinsic viscosity. Meanwhile, those which are more accessible for small industries and bakeries would be the pH and the acid factor. In spite of specific volume

representing an easy analysis, it takes longer to be performed and also is very similar to the one which is being currently used to determine the best *polvilho azedo* in the industry. The determination of swelling power requires the use of a centrifuge and of intrinsic viscosity requires an elaborate method, which is inaccessible for small industries and bakeries¹⁰.

The sour cassava starch (*polvilho azedo*) industry is traditionally a familial business. The processing units are classified, at the most, as medium sized enterprises^{13,14}. The major effect of this reality is the lack of access to advanced technologies for quality control of raw material, products, and processes. At the same time this situation persists, the preference for *polvilho azedo* derivatives is increasing. It is used in the production of cheese bread, biscuits and cookies. The expansion of the dough occurs without any addition of yeast and is gluten free. The classification of *polvilho azedo* as a gluten free product contributes to its increasing demand and justifies concern for the standardization of the *polvilho azedo* quality, which is still considered as a rustically made product¹⁵.

Based on results by Marcon et al.¹⁰ and on several other published works, including advanced techniques for analysis such as ATR-FTIR (Attenuated total reflectance-Fourier-transform infrared spectroscopy), DSC, X-Ray diffraction, and others, this present work intends to show variables of easy determination that could be suggested as an easy analysis to predict the performance of *polvilho azedo*. The present work was performed with the objective of suggest some easy assay procedures to predict sour cassava starch expansion property accessible to bakers and cassava industries.

MATERIALS AND METHODS

A comparison was made on the physicochemical and expansion characteristics of native cassava starch (five different trademarks and one mix of them, resulting in six samples) and sour cassava starch (*polvilho azedo*) samples that, according to the opinion of bakers, were of good performance (three different trademarks), more fourteen good trademarks, totalizing seventeen (17) samples of commercial sour cassava starch; as well as of the sour cassava starches samples produced in laboratory (twenty samples) with simulation of its industrial production and with modifications²⁵ and also with addition of glucose syrup were also included in the investigation.

Interview with bakers

All bakers, of every bakery, in the centre of Florianópolis downtown, Santa Catarina State, Brazil, were interviewed. The interview included open questions about the criteria they use when choosing a brand of *polvilho azedo*.

Physicochemical analysis

All samples were characterized for moisture content (method AOAC 921.10)¹⁶ to express results in dry basis. Acid factor, pH, expansion rate, swelling power, and specific volume were determined for all samples, and intrinsic viscosity was determined for commercial native cassava starch (five samples) and commercial *polvilho azedo* (three samples).

The pH values were measured by using a Quimis pHmeter (model Q 400A). Acid factor was determined with samples of 25 g, with addition of up to 50 mL of distilled water. The dispersion was titrated with a standard 0.1 N HCl to pH 3.0 under agitation. The acid factor corresponds to the volume of acid consumed (mL).¹⁷

Swelling power was evaluated at 90 °C, as described by¹⁸, with modifications. The analysis was carried out in 50 mL leak proof centrifuge tubes by taking a suspension of starch in deionized water (0.4 g starch and 36 g deionized water) in water bath under agitation at the selected temperature. After 30 minutes for cooling, the volume was completed until obtaining 40 g and centrifuged (3,000 rpm/20 minutes), and all supernatant was collected. The pellets containing the swollen starch granules were weighed and the ratio between the final mass and the initial dry matter was considered as the swelling power. The solubility was expressed in weight percentage and the swelling power in weight gain.

The determination of baking expansion capacity followed the procedures proposed by the CERAT – Tropical Root Centre.¹⁹ The formulation was made with 50 g of sample with 40 mL boiling water for the production of the dough. The dough was divided into five balls of approximately 10 g each and baked at 200 °C for 25 minutes in an electric oven. The diameter of each dough ball was measured with a Vernier calliper (Metrica, Italy) before and after baking. Baking expansion capacity was calculated by using the relation between the initial average diameter of the dough balls before baking and their final average diameter after baking (their diameters are irregular)²⁰.

Specific volume of the dough balls after cooking was determined through the rape seed displacement method and calculated as displacement/weight (cm³.g⁻¹)²¹.

The Intrinsic viscosity²² of the cassava starch samples was measured with a thermostatically viscometer Schott, AVS 350, CT 52, at constant temperature 30 °C, capillary diameter 0.63 mm; capillary constant (K) of 0.01511 mm².s⁻². Solutions of the cassava starches samples at 0.002, 0.003, 0.004, 0.005, 0.006 and 0.007 g/mL were prepared in 1.0 N KOH. To determine the flow time of the solvent (0.1 N KOH) and of the starch solutions, exactly 10 mL of solutions were transferred to the 100 mL tube of the viscometer. Specific viscosity was calculated by Equation 1.

$$\eta_{sp} = (\eta/\eta_0 - 1) = (t/t_0 - 1) \quad (\text{Equation 1})$$

Where: η_{sp} = specific viscosity; η = starch solution viscosity; η_0 = solvent (KOH 0.1 N) viscosity; t = flow time of starch solution; t_0 = flow time of solvent.

The results of the reduced viscosity (specific viscosity/concentration) for each concentration of starch solution were plotted and intrinsic viscosity was determined by extrapolation to concentration zero of the starch solution. The point of intersection between the straight and the y axis of the concentration zero of the starch solution was considered as intrinsic viscosity.

Data analysis

The individual co-relation between each one of the analyzed variables and expansion rate was examined using the Statistical 6.0 software. Variables that showed the greatest value for the co-relation coefficient were adapted to preview the expansion capacity of *polvilho azedo*. All analyses were performed in triplicate.

DISCUSSION

The general opinion of bakers reveals that *polvilho azedo* is a product without any standard of quality, which leads those professionals to establish a relation of fidelity with determined trademarks only, which in their opinion were the best. Based on their opinion about which *polvilho azedo* is the best, it was possible select the three best trademarks to be used in this study as a model of expansion property.

All results were organized for construction of co-relations to establish the best variables to preview the performance of expansion. Table 01 shows the value of co-relation coefficients for several parameters of the starch quality.

Table 1. Co-relation coefficient between expansion rate, and acid factor, pH, swelling power, specific volume and specific viscosity for several samples of *polvilho azedo* with high and low expansion performance and native cassava starch

Sour cassava starch quality parameter	Expansion rate(*) co-relation coefficient R
Swelling power	0.52
Acid factor	0.81
pH	0.92
Intrinsic viscosity (**)	0.93
Specific volume	0.97

* Data from samples of native cassava starch ($n = 6$) and sour cassava starch produced in laboratory ($n = 20$) and commercial trademarks ($n = 17$). ** Intrinsic viscosity determined to: Native cassava starch ($n = 5$); commercial sour cassava starch ($n = 3$)

The swelling power is a variable with important relation with the expansion rate, in accordance with preliminary study²³. Due to starch granule de-polymerization sour cassava starch shows low swelling power, which increases expansion. When analyzing all the data with high density of results of all the samples, commercial *polvilho azedo*, *polvilho azedo* produced in laboratory, and native cassava starch, the co-relation coefficient between expansion rate and swelling power is ~ -0.34 . Meanwhile, when analyzing more specifically only the commercial *polvilho azedo* and native cassava starches, it becomes evident that the co-relation is higher. The decrease in swelling power is inversely related with expansion rate, with a co-relation value of ~ -0.51 . Swelling power could be a variable indicated to predict the expansion performance of *polvilho azedo*. However, studies with the variables: pH, acid factor, specific volume and intrinsic viscosity would offer better answers to predict the expansion performance of *polvilho azedo*. There are several published works about polymeric networks in several kinds of dough and natural and synthetic polymers, but none about the relation between swelling power and expansion rate of sour cassava starch, *polvilho azedo*.

The reduction in pH value, as consequence of fermentation, is a known event in the *polvilho azedo* production process. This fermented product shows a low characteristic pH zone when compared with native cassava starches. The relation between pH and expansion rate for all the samples analyzed shows co-relation coefficient of ~ -0.68 , which proves that expansion increases with the reduction of pH.

The analysis of the relation of the expansion rate and pH, restrictive to native cassava starches and commercial *polvilho azedo* samples, co-relation coefficient (~ 0.92), reveals that pH is an important variable to predict the expansion performance of *polvilho azedo*.

This strong inverse relation between pH and expansion comprises a fact largely published about *polvilho azedo*, as a product with low pH^{7,24-26}.

Although the acid factor has been a variable which is little studied in the academic scenario it represents a volume of 0.1 N hydrochloric acid that is necessary for the starch dispersion pH to achieve the value of 3.0. Indirectly, it indicates the chemical nature of the starch granule in relation to its sensitivity to changes in pH. When comparing *polvilho azedo* to native cassava starch, which is a non-fermented product that has low acid factor, the acid factor can show the kind of chemical change that occurs after fermentation. Therefore, the acid factor is a variable that increases with the increase of the expansion rate.

Co-relation coefficient between expansion rate and acid factor has a lower value when all the samples in this work are compared. Because of the faster production of the *polvilho azedo* produced in laboratory, this co-relation can be dramatically changed when comparing only native cassava starches samples with commercial *polvilho azedo* of the bakers' preference.

This prospect improves when analyzing the relation between acid factor and expansion rate only with native cassava starches and commercial *polvilho azedo* samples, thereby achieving the co-relation coefficient of ~ 0.81 . Several works have been published attempting to explain the expansion property of *polvilho azedo*, but none have been published about the relation between the expansion rate and the acid factor.

Attenuated total reflectance-Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy and chemometric analysis applied to the samples in study (unpublished data) indicated that absorption wavebands at 1650-1500 cm^{-1} , typical of nitrogen-containing compounds, revealed some important differences compared to native cassava starches. Since the acid factor analysis considers the pH reduction on titration with 0.1N HCl and because *polvilho azedo* has greater acid factor in comparison to native cassava starch, these results can show an indication of buffering nitrogen material, which prevents pH reduction and is predominantly present in the *polvilho azedo* samples.

Another variable to be considered is the specific volume that means the volume/weight relation of samples of specimen constituted by the starches in study. This variable is closely related to the expansion rate. Through an analysis of all the sample spectra, it is possible to achieve a high co-relation coefficient ($r=0.89$) between the specific volume and expansion rate.

This important co-relation increases ($r=0.97$) when analysis is performed only between native cassava starches and commercial *polvilho azedo* samples.

According to several authors^{8,10-12} cassava starch fermentation in the *polvilho azedo* production process results in starch granule depolymerization. Intrinsic viscosity determination for the samples studied showed this change, with partial reduction of the polymerization degree of amylose and amylopectin. There is a high inverse co-relation ($r = -0.93$) between intrinsic viscosity and expansion rate, when analyzing native cassava starches and commercial *polvilho azedo* samples.

As consequence of this depolymerization, some authors have already published that there are some differences in amylose content in fermented and non-fermented starch granules. Therefore, according to our work and to unpublished data, there is no important relation between amylose content of native cassava and fermented starch granules. This fact leads to the conclusion that the bounds and the proximity amylose-amylose/amylose-amylopectin/amylopectin-amylopectin, and the relation of amylose in starch granule are sufficiently diverse to consider amylose as a parameter of reference to predict expansion performance of *polvilho azedo*.

Considering all the co-relations shown in this work, in crescent order, swelling power, acid factor, pH, intrinsic viscosity and specific volume could be useful as indicator to predict the expansion performance of *polvilho azedo*. Therefore, considering some of these analyses, producers of *polvilho azedo* and bakers could become dependent on laboratories to perform more elaborated analysis to predict the performance of *polvilho azedo* such as on intrinsic viscosity and swelling power. Today bakers and small industries of *polvilho azedo* use to make a sample of specimen, which can be quite similar to the specific volume evaluation. Therefore, this present work suggests that pH and acid factor should be used to simplify the prediction of the performance of *polvilho azedo*.

The results of the samples studied in this work show that the commercial *polvilho azedo* with more

Table 2. Expansion rate and percent of weight loss of several samples of *polvilho azedo* with high and low expansion performance, compared to native cassava starch

Samples	Expansion rate	Loss of Weight (%)
Native Cassava Starch		
	1.3	34
	1.4	28
	1.3	30
	1.4	31
	1.5	30
	1.5	32
n=6	Average±SD	1.4±0.09
		30.83±2.04
Sour cassava starch produced in laboratory		
Low performance		
	1.4	29
	1.5	32
	1.4	31
	1.3	32
	1.4	32
	1.5	36
	1.5	39
	1.5	30
	1.4	34
n=9	Average±SD	1.43±0.07
		32.72±3.11
High performance		
	2.2	41
	2.1	40
	2.2	42
	2.1	40
	2.1	39
	2.1	40
	2.2	42
	2.2	41
	2.2	42
	2.2	41
	2.3	40
n=11	Average±SD	2.7±0.06
		40.73±1.01
Commercial sour cassava starch		
	2.0	39
	2.0	41
	1.9	41
	1.9	38
	1.9	39
	1.9	38
	1.9	39
	2.1	37
	2.0	41
	1.9	40
	1.9	37
	2.1	39
	2.2	45
	2.2	40
	2.1	42
	2.1	40
n=17	Average±SD	2.01±0.11
		39.82±1.98

desirable expansion property has pH values between 3.47 and 4.18, and acid factor values between 3.17 and 4.36. These minimum and maximum values can be useful as limits to predict the performance of *polvilho azedo*.

All *polvilho azedo* samples produced in laboratory showed a good performance in expansion property, however those samples showed acid factor values lower than the minimum limit suggested in this work. This method²⁵ is different from the one traditionally used for production of *polvilho azedo* because it is a rapid method, requiring only half the time of the traditional method. To predict the performance of *polvilho azedo* produced by this rapid method, pH and specific volume could be used as variables.

Additionally, the weight of the samples of specimen can also be related with their expansion because the weight of the cooked product made with a good *polvilho azedo* is lower than a *polvilho azedo* with low expansion performance. Considering the method used in this work for determination of specific volume²¹, we can find a high amount of data, enough to establish a relation between the lost of weight sample of specimen and the expansion rate. According to this consideration, expansion can be estimated by converting the difference in weight, before and after cooking, into percentage of weight loss during cooking. Table 2 shows data obtained for weight loss in products with better performance, compared to low performance and native cassava starch. Therefore, it is possible to predict that a good *polvilho azedo* must show weight loss around 40 to 45% after cooking. This evaluation is independent of pH or acid factor determination, but it is advantageous in comparison to the traditional method used in bakeries because it uses only a minimal quantity of sample, oven, and scale and also because it reduces time of assay.

The determination of pH, acid factor, and weight loss can be used to choose a good *polvilho azedo*. The intension is that this fermented product is capable of being developed to establish lower variations between several fermentations by the same producer and also to facilitate the availability of a greater number of trademarks preferred by bakers. At the same time, familial industries of *polvilho azedo* need the simplest methodology to predict the quality of their products.

Studies on *polvilho azedo* quality control or with the aim to improve the process and the product should be considered in view of the increasing opportunities to preserve the small and familial industries dedicated to

production of *polvilho azedo*. Just as much as several wine and cheese producers worldwide, the industry of cassava starch fermentation must be developed and valued.

CONCLUSION

According to the opinion of bakers who use *polvilho azedo*, there is great difficulty to find a good trademark of this product. Consequently, they establish a relation of customer fidelity when they eventually find a good product.

Good performance of *polvilho azedo* means a final product with good expansion capacity. Among several quality variables such as intrinsic viscosity, swelling power, specific volume, pH, and acid factor, only the last two could contribute to predict performance of *polvilho azedo* for products obtained through the traditional process, which takes long time for fermentation.

Polvilho azedo produced by rapid fermentation from fermented native cassava starch does not respond similarly to traditional *polvilho azedo*, due to the low acid factor compared to higher acid factor obtained in traditional products. Therefore, the inclusion of the percentage of weight loss during cooking can be a good variable, along with pH and acid factor, to establish a prediction of the expansion performance of *polvilho azedo*.

REFERENCES

1. Ray RC, Sivakumar PS. Traditional and novel fermented foods and beverages from tropical roots and tuber crops: review. *Int J of Food Sci Tech*. 2009;44:1073-87.
2. Plata-Oviedo M, Camargo CRO. Determinação de propriedades físico-químicas e funcionais de duas féculas fermentadas de mandioca (*polvilho azedo*). *Ciênc Tecnol Alim*. 1995;15:59-65.
3. Cárdenas OS, Buckle TS. Sour cassava starch production: a preliminary study. *J Food Sci*. 1980;45:1509-12.
4. Nunes OLGS. Efeito da radiação ultravioleta sobre as propriedades funcionais da fécula de mandioca tratada com ácido láctico. [dissertação de mestrado]. Botucatu (SP): Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"; 1994.
5. Ascheri DPR, Vilela ER. Alterações do *polvilho* da mandioca pela fermentação, no fabrico de biscoitos. *Pesq Agrop Bras*. 1995;30:269-79.
6. Mestres C, Rouau X. Influence of natural fermentation and drying conditions on physicochemical characteristics of cassava starch. *J Sci Food Agric*. 1997;74:147-55.
7. Demiate IM, Dupuy N, Huvenne JP, Cereda MP, Wosiacki G. Relationship between banking behavior of modified cassava starches and starch chemical structure determined by FTIR spectroscopy. *Carbohydr Polym*. 2000;42:149-58.

8. Vatanasuchart N, Naivikul O, Charoenrein S, Sriroth K. Molecular properties of cassava starch modified with different UV irradiations to enhance baking expansion. *Carbohydr Polym*. 2005;61:80-7.
9. Mestres C, Bounou O, Akissoe N, Zakhia N. Comparison of the expansion ability of fermented maize flour and cassava starch during baking. *J Sci Food Agric*. 2000;80:665-72.
10. Marcon MJA, Kurtz DJ, Raguzzoni JC, Delgadillo I, Maraschin M, Soldi V, et al. Expansion Properties of Sour Cassava Starch (*Polvilho Azedo*): Variables Related to its Practical Application in Bakery. *Stärke/Starch*. 2009;61:716-26.
11. Bertolini AC, Mestres C, Colonna P, Raffi J. Free radical formation in UV and gamma-irradiated cassava starch. *Carbohydr Polym*. 2001a;44:269-71.
12. Bertolini AC, Mestres C, Raffi J, Buléon A, Lerner D, Colonna P. Photodegradation of cassava and corn starches. *J Agric Food Chem*. 2001b;49:675-82.
13. Chuzel JC, Zakhia N, Cereda MP. The Potential for New Cassava Products in Brazil. *Cassava Flour and Starch: Progress. In: Research and Development*. CIRAD: França;2002. p. 299-303.
14. Marcon MJ, Avancini SRP, Amante ER. Propriedades Químicas e Tecnológicas do Amido de Mandioca e do Polvilho Azedo. Florianópolis (SC): Editora da UFSC; 2007a.
15. Marcon MJA, Vieira MA, Santos K, De Simas KN, Amboni RDMC, Amante E R. Effect of the improved fermentation on physicochemical properties and sensorial acceptability of sour cassava starch. *Braz Arch Biol Biotech*. 2007b;50:1079-87.
16. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). *Official Methods of Analysis*. 16 ed. Gaithersburg; 1999.
17. Brasil. Decreto nº 12.486 de 20 de outubro de 1978. Aprova as Normas Técnicas Especiais Relativas a Alimentos e Bebidas. *Diário Oficial [do] Estado de São Paulo*. São Paulo, SP, 20 out 1978. p. 3-25.
18. Leach HW, McCowen LD, Schoch TJ. Structure of the starch granule. I. Swelling and solubility patterns of various starches. *Cereal Chem*. 1959;36:534-44.
19. Maeda KC, Cereda MP. Avaliação de duas metodologias de expansão ao forno do polvilho azedo. *Ciênc Tecnol Alim*. 2001;21:139-43.
20. Pereira J, Ciacco CF, Vilela ER, Texeira LS. Féculas fermentadas na fabricação de biscoitos: estudo de fontes alternativas. *Ciênc Tecnol Alim*. 1999;19:287-93.
21. Cereda MP. Avaliação da qualidade de duas amostras de fécula fermentada de mandioca (polvilho azedo). *Bol Soc Bras Ciênc Tecnol Alim*. 1983;17:305-20.
22. Leach HW. Determination of intrinsic viscosity of starches. *Cereal Chem*. 1963;40:593-600.
23. Marcon MJA. Proposta para o mecanismo de expansão do polvilho azedo [tese de doutorado]. Florianópolis (SC): Universidade Federal de Santa Catarina; 2009.
24. Demiate IM, Barana AC, Cereda MP, Wosiacki G. Organic acid profile of commercial sour cassava starch. *Ciênc Tecnol Alim*. 1999;19:131-5.
25. Marcon MJA, Efeito do processo de fermentação tradicional e modificado sobre a fermentação do polvilho azedo [dissertação de mestrado]. Florianópolis (SC): Universidade Federal de Santa Catarina; 2004.
26. Takizawa FF, Silva GO, Konkel FE, Demiate IM. Characterization of tropical starches modified with potassium permanganate and lactic acid. *Braz Arch Biol Tech*. 2004;47:921-31.

Efeitos da formulação láctea à base de flocos de abóbora e inulina sobre o crescimento e desenvolvimento de ratos após desmame

Effects of milk-based formulation of pumpkin flakes and inulin on growth and development of rats after weaning

RIALA6/1365

Andréa Carla Mendonça de SOUZA^{1*}, Silvana Magalhães SALGADO², Alda Verônica Souza LIVERA², Francisca Martins BION², Samara Alvachian Cardoso ANDRADE³, Karina Correia da SILVEIRA², Zelyta Pinheiro de FARO⁴, Nonete Barbosa GUERRA²

*Endereço para correspondência: ¹Departamento de Tecnologia Rural, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Estrada do Encanamento, 1326, apto 22, Casa Forte, Recife/PE, Brasil. CEP 52070-000. Tel.: 81 4141-1591. E-mail: andreacarlam@gmail.com.

²Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco.

³Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Pernambuco.

⁴Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco.

Recebido: 21.12.2010 – Aceito para publicação: 11.05.2011

RESUMO

Os efeitos de uma formulação láctea à base de flocos de abóbora e inulina sobre o crescimento e desenvolvimento de ratos após desmame foram avaliados, utilizando 36 ratos machos, *albinus*, linhagem Wistar. Os animais foram divididos, aleatoriamente, em três grupos de 12: padrão de caseína (GC), experimentais – GM+FA e GM+FAI – modificada pela adição de 6% da formulação láctea à base de flocos de abóbora, e modificada pela adição de 6% da formulação láctea à base de flocos de abóbora suplementada com 3% de inulina, respectivamente, durante 28 dias. Avaliou-se a composição centesimal e microbiológica dos flocos de abóbora, o ganho do peso corporal, ingestão alimentar e coeficiente de eficiência alimentar. Após o sacrifício, foram determinados o peso do fígado e os teores de provitamina A e β -caroteno nos grupos GC e GM+FA. Registrou-se significativo decréscimo na ingestão alimentar no GC; significativo aumento do ganho de peso corporal no GM+FAI, em comparação com os demais, e diferenças significativas entre o GC e GM+FAI quanto ao CEA. Os teores de vitamina A e β -caroteno foram significativamente superiores no GM+FA. Os resultados demonstram que a inulina exerce benéficos efeitos sobre o desenvolvimento e crescimento dos ratos após desmame.

Palavras-chave. vitamina A, suplementação, carotenoides, desenvolvimento fisiológico.

ABSTRACT

The effects of a milk-based formulation of pumpkin flakes and inulin on post weaning rat growth and development of 36 male white Wistar rats were evaluated. The animals were randomly divided in three groups of 12: casein experimental pattern (GC) – GM+FA and GM+FAI – modified by the addition of 6% milk-based formulation of pumpkin flakes supplemented with 3% inulin, respectively, during 28 days. We assessed the microbiological and centesimal chemical composition of pumpkin flakes, body weight gain, food intake and coefficient of food efficiency. After dissection, the liver weight and pro-vitamin A and beta-carotene levels in GC and GM + FA were registered. A significant decrease in food intake on GC; considerable body weight gain in the GM+FAI was observed, in relation to the rest of the groups, and a substantial difference between the GC and GM+FAI in relation to CEA (food coefficient). The vitamin A and beta-carotene were significantly higher in GM + FA. The results show that inulin exerts beneficial effects on the development and growth of the rats after weaning.

Keywords. vitamin A, supplementation, carotenoids, physiological development.

INTRODUÇÃO

Segundo Dolinsky e Ramalho¹, a desnutrição infantil constitui um problema mundial de saúde pública, por ocasionar efeitos deletérios sobre o crescimento e desenvolvimento mental de crianças, requerendo a adoção de medidas a curto prazo. Das inadequações nutricionais do período do desmame destaca-se a deficiência de vitamina A, que, além de comprometer a morbimortalidade infantil, acarreta dentre outros problemas, a xeroftalmia, maior causa de cegueira em crianças em países em desenvolvimento, podendo ainda ocasionar um quadro de imunodeficiência de origem exclusivamente nutricional. Dentre as estratégias que vêm sendo adotadas, como forma de controlar essa deficiência, inclui-se a fortificação de alimentos. Neste contexto, Fernandes et al.² e Faro³ desenvolveram uma formulação láctea à base de flocos de abóbora. Além de ser fonte de carotenoides, a abóbora se destaca pela sua elevada produção, baixo custo e amplo consumo no Brasil⁴. A eficácia dessa formulação à base de flocos de abóbora e dos flocos isoladamente foi avaliada, tanto na prevenção como no controle da carência de vitamina A, com resultados satisfatórios, por Faro³ e Ambrósio et al.⁵. Posteriormente, consideráveis percentuais de aceitabilidade dessa formulação foram registrados por Silveira⁶, em crianças da cidade do Recife.

Aos carotenoides, pigmentos naturais responsáveis pelas cores laranja, amarelo e vermelho de frutos e hortaliças⁷, também são atribuídas ações biológicas, das quais se destacam a atividade de provitamina A e a ação antioxidante, com benéficos efeitos sobre a resposta imune e redução do risco de degeneração macular e catarata^{8,9}.

A evolução das pesquisas na área de funcionais tem propiciado a descoberta de outras substâncias¹⁰, dentre as quais a inulina, — fibra dietética solúvel resistente à hidrólise das enzimas digestivas humanas devido à configuração estrutural de suas ligações osídicas β (2±1) que, juntamente com a oligofrutose, apresenta efeitos plenamente reconhecidos pela comunidade científica. A inulina, extraída em escala industrial da raiz de chicória¹¹, tem sido objeto de experimentos com diversos modelos animais e humanos. Os resultados alcançados demonstram benéficos efeitos sistêmicos fisiológicos e nutricionais, decorrentes da sua ação moduladora da composição e atividade metabólica da microbiota intestinal, favorecendo o desenvolvimento de bactérias bifidogênicas em detrimento de espécies consideradas patogênicas ao hospedeiro. Ademais, há

registros de efeitos sobre o metabolismo dos lipídeos e dos carboidratos e aumento da biodisponibilidade de minerais^{12,13}.

A consistência dos resultados obtidos em estudos sobre a inulina e carotenoides, separadamente, motivou a combinação desses componentes funcionais na formulação láctea à base de flocos de abóbora, com o objetivo de avaliar possíveis efeitos sobre o desenvolvimento e crescimento dos ratos após desmame, atendendo, ainda, à crescente demanda dos consumidores por produtos alimentícios saudáveis e nutritivos.

MATERIAL E MÉTODOS

Ensaio biológico e dietas experimentais

Neste ensaio, cujo protocolo experimental foi, previamente, aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE (Nº 66/05), foram utilizados 36 ratos machos, *albinus*, linhagem Wistar, provenientes do Biotério de Criação do Departamento de Nutrição da UFPE, desmamados aos 21 dias de idade com peso médio de 45 a 55 g. Os ratos foram distribuídos, ao acaso, em 3 grupos de 12 animais cada, durante 28 dias, e mantidos em gaiolas individuais, sob condições controladas de temperatura ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo de luz de aproximadamente 12/12 horas.

Tabela 1. Composição das dietas experimentais (g/100g)

Constituintes (%)	GC	GM + FA	GM + FAI
Caseína	20,40	15,27	15,47
Minerais	3,50	2,41	2,37
Vitaminas	1,00	1,00	1,00
Óleo	7,00	3,64	3,35
Celulose	5,00	3,84	3,84
Colina	0,25	0,25	0,25
Amido	62,55	52,29	49,42
Cistina	0,30	0,30	0,30
Flocos de abóbora ^a	-	6,00	6,00
Leite ^b	-	12,00	12,00
Açúcar ^c	-	3,00	3,00
Inulina ^d	-	-	3,00
Total	100,00	100,00	100,00

^{a, b, c} Obtidos no comércio local. GC = grupo controle (Reeves¹⁴).

GM + FA = grupo experimental (Reeves¹⁴) – modificada pela adição de 6% da formulação láctea à base de flocos de abóbora; GM + FAI = grupo experimental (Reeves¹⁴) – modificada pela adição de 6% da formulação láctea à base de flocos de abóbora com 3% de inulina^d – Orafiti Active Food International (Clariant, São Paulo, Brasil)

Os flocos de abóbora utilizados na formulação foram obtidos em secador de tambor, marca Duprat MS, sob pressão de 6 atm, velocidade de 1 rpm e superfície de 0,75 m², conforme Faro. A abóbora, utilizada na elaboração dos flocos, o leite e o açúcar, usados na formulação das dietas, foram obtidos no comércio local. A inulina tipo frutano-ITF (Oraft Raftilose HPX, BENEIO) foi doada pela empresa Orafti-Active Food Ingredients – Bélgica.

Durante o experimento, os animais do grupo controle (GC) receberam a dieta-padrão caseína, enquanto os grupos experimentais receberam dieta de caseína acrescida de 6% da formulação láctea à base de flocos de abóbora (GM+FA), e dieta caseína adicionada de 6% da formulação láctea à base de flocos de abóbora suplementada com 3% de inulina (GM+FAI). A Tabela 1 expressa a composição da dieta, equilibrada de acordo com a AIN 1993, para fase de crescimento (Reeves et al.¹⁴).

A composição química dos flocos de abóbora foi determinada conforme a Association of Official Analytical Chemistry - AOAC¹⁵, abrangendo umidade (935.29), resíduo mineral fixo – cinzas (930.22-32.3.08), lipídios (963.15-31.4.02), proteínas (991.20-33.2.11), carboidratos totais por diferença, fibra alimentar (985.29-45.4.08) e carotenoides conforme Rodriguez-Amaya et al.¹⁶, cuja conversão em retinol foi efetuada de acordo com Trumbo et al.¹⁷ (1:12µg). Para o cálculo do valor energético utilizou-se os fatores de Atwater¹⁸ e de Roberfroid¹⁹ para inulina (1,5). Também foram avaliadas

Tabela 2. Análises microbiológicas nos flocos de abóbora e dietas à base de flocos de abóbora e inulina

Análises microbiológicas	Flocos de abóbora	GC	GM+FA	GM+FAI
Coliformes totais e fecais em UFC/g	0	0	0	0
Contagem de bolores e leveduras UFC/g	1,8x10 ²	1,2x10 ²	1,3x10 ²	1,5x10 ²
<i>Salmonella</i> spp – ausência em 25g	ausente	ausente	ausente	ausente

GC = grupo controle (Reeves¹⁴).

GM + FA = grupo experimental (Reeves¹⁴) – modificada pela adição de 6% da formulação láctea à base de flocos de abóbora; GM + FAI = grupo experimental (Reeves¹⁴) – modificada pela adição de 6% da formulação láctea à base de flocos de abóbora com 3% de inulina – Orafti Active Food International (Clariant, São Paulo, Brasil).

UFC: unidade formadora de colônia

Tabela 3. Análises microbiológicas nos flocos de abóbora e dietas à base de flocos de abóbora e inulina

Variáveis	Tratamento Dietético		
	GC	GM+FA	GM+FAI
Ingestão alimentar (g)	341,95±31,39 ^b	370,50±16,69 ^a	376,78±4,53 ^a
Peso corporal (g)	132,42±19,51 ^b	130,90±9,01 ^b	150,96±22,55 ^a
CEA	0,40±0,04 ^a	0,35±0,02 ^b	0,40±0,4 ^a

GC = grupo controle (Reeves¹⁴).

GM + FA = grupo experimental (Reeves¹⁴) – modificada pela adição de 6% da formulação láctea à base de flocos de abóbora; GM + FAI = grupo experimental (Reeves¹⁴) – modificada pela adição de 6% da formulação láctea à base de flocos de abóbora com 3% de inulina^d – Orafti Active Food International (Clariant, São Paulo, Brasil). n = 12 animais por grupo. * Letras diferentes significam que diferem significativamente ao nível de 5%, pelo teste de Duncan

as características microbiológicas, conforme a AOAC¹⁵ — coliformes a 35 °C (991.14), coliformes a 45 °C (986.33), bolores e leveduras (997.02) e *Salmonella* spp (996.08 e 967.26) —, utilizando o preconizado na Resolução da Diretoria Colegiada — RDC n° 12/01²⁰.

Os controles do peso corporal e da ingestão alimentar foram efetuados a cada 8 dias e o coeficiente de eficiência alimentar (CEA) determinado pela relação entre o ganho de peso e a ingestão alimentar, ao final do experimento. As dietas e a água foram oferecidas *ad libitum*. Os animais foram observados, diariamente, quanto a possíveis anomalias na aparência e aspectos clínicos.

Aos 28 dias, após jejum de 12 horas, os ratos foram anestesiados e sacrificados para a retirada do fígado, no qual, após pesagem em balança de precisão marca Ohaus, capacidade para 2,6/0z, foi determinado o teor de provitamina A nos grupos que receberam as dietas GC e GM + FA, conforme metodologia de Bessey et al., modificada por Araújo e Flores²¹.

Análises estatísticas

Os resultados da pesquisa foram expressos em média e desvio-padrão e submetidos ao teste de Duncan e ao teste t de Student, todos ao nível de 5% de probabilidade. Os dados foram analisados utilizando o software Statistic for Windows 6.0.

RESULTADOS

Em relação à composição química dos flocos de abóbora, foi observado o elevado teor de β-caroteno, 106,27mg/100g. A Tabela 2, expressa os resultados

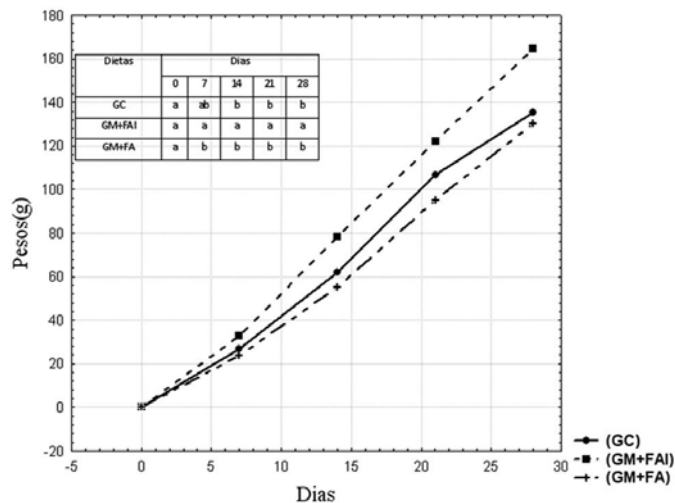
microbiológicos, que estão de acordo com a legislação em vigor.

Um significativo decréscimo ($p < 0,05$) na ingestão total de alimentos foi observado nos ratos alimentados com a dieta-padrão – GC, em comparação com os demais (Tabela 3). Consta-se ainda que a inulina também afetou, de modo positivo, o peso corporal dos ratos alimentados com a GM+FAI, que foi significativamente superior ($p < 0,05$) em relação aos demais grupos. Quanto ao CEA, não foram registradas diferenças significativas entre o GC e o GM+FAI. Ambos foram superiores ao GM+FA, o que sugere um efeito adicional da incorporação de 3% de inulina na absorção da proteína do GM+FAI. Inclusive, a dieta GM+FAI acarretou maior curva ponderal em relação a padrão e maior ainda nos animais alimentados com a GM+FA. Vale salientar que esta última manteve-se levemente abaixo da dieta-padrão em todo o experimento. Esta diferença, que, conforme a Figura 1, ocorreu a partir da primeira semana com relação ao GM+FA, foi ampliada, abrangendo, também, na segunda semana, os animais do GC.

Com relação aos fígados, não foram observadas diferenças quanto ao peso, tampouco anormalidades na aparência clínica dos animais, durante o período deste ensaio biológico, independentemente da dieta consumida. De acordo com os resultados analíticos do teor de vitamina A e β -caroteno nos fígados dos animais dos grupos GC e GM-FA (Figura 2), os flocos de abóbora propiciaram uma reserva de vitamina A e β -caroteno significativamente superior ($p < 0,05$) à registrada para o grupo controle.

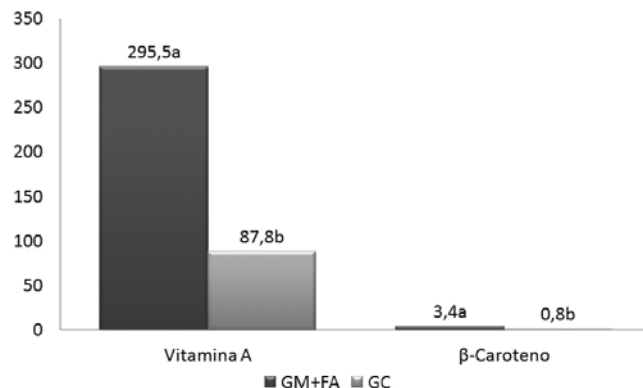
DISCUSSÃO

Nos países em desenvolvimento, predominam deficiências alimentares de macro e micronutrientes que constituem sérios fatores de risco para a saúde e sobrevivência de grupos vulneráveis, como crianças em idade pré-escolar²². Durante a infância, o crescimento e desenvolvimento do homem são afetados por distúrbios que podem ter causalidade múltipla, das quais a deficiência de vitamina A, ainda hoje, assume graves proporções no contexto da saúde pública em todo o mundo, podendo levar à cegueira e à morte²²⁻²⁴. Uma nutrição preventiva, iniciada logo após o desmame e continuada ao longo de toda a vida²⁵, utilizando uma formulação láctea à base de flocos de abóbora, rica em



GC = grupo controle (Reeves¹⁴). GM + FA = grupo experimental (Reeves¹⁴) – modificada pela adição de 6% da formulação láctea à base de flocos de abóbora; GM + FAI = grupo experimental (Reeves¹⁴) – modificada pela adição de 6% da formulação láctea à base de flocos de abóbora com 3% de inulina⁴ – Orafiti Active Food International (Clariant, São Paulo, Brasil). n = 12 animais por grupo

Figura 1. Curva ponderal de ratos alimentados com dietas, acrescidas ou não de inulina



GC = grupo controle (Reeves¹⁴). GM + FA = grupo experimental (Reeves¹⁴) – modificada pela adição de 6% da formulação láctea à base de flocos de abóbora; GM + FAI = grupo experimental (Reeves¹⁴) – modificada pela adição de 6% da formulação láctea à base de flocos de abóbora com 3% de inulina – Orafiti Active Food International (Clariant, São Paulo, Brasil). n = 12 animais por grupo. *Letras iguais não diferem significativamente, pelo teste t de Student ($p < 0,5$)

Figura 2. Teores de vitamina A e β -caroteno nos fígados dos animais alimentados com as dietas GC e GM+FA

carotenoides, que são responsáveis pela eficácia desta bebida na prevenção e controle da avitaminose A na população infantil^{3,5}, certamente contribuiria para reverter esse cenário.

A eficiência da absorção dos carotenoides pode, entretanto, ser afetada pela quantidade ingerida, processamento ou cocção dos alimentos, além de outros

ingredientes presentes na dieta, que podem estimulá-la (tipo e quantidade de gordura da dieta) ou inibi-la (fibras), efeitos da matriz, interação entre carotenoides e variações individuais^{26,27}.

Embora Krinsky et al.²⁸ tenham comprovado que roedores não acumulam carotenoides no fígado, eles apresentam um eficiente mecanismo de conversão de β -caroteno a retinol, conforme evidenciado pelos resultados desta pesquisa, nos ratos do grupo GM+FA, que apresentaram uma reserva de vitamina A 3,4 vezes superior à dos animais do GC.

Em relação à composição química dos flocos de abóbora, destacam-se os teores de umidade dos flocos desidratados de abóbora, aproximadamente 6,34g/100g, o que demonstra a eficiência do processo tecnológico de secagem utilizado e, também, o elevado teor de β -caroteno, valor próximo ao de Ambrósio²⁴

Tanto os flocos como as formulações apresentaram resultados para coliformes a 35 °C C/g(mL), coliformes a 45 °C/g(mL) e ausência de Salmonela, em conformidade com a legislação vigente²⁰. Esses resultados comprovaram a qualidade da matéria-prima e a utilização de boas práticas do processamento.

Nos últimos anos, vários estudos^{10,11,12,13} têm demonstrado que a adição de inulina a alimentos infantis estimula o crescimento de bifidobactérias do cólon, com consequente aumento das funções intestinais e resistência a infecções – efeito prebiótico²⁸. Com o objetivo de melhorar a saúde gastrointestinal, reduzir a pressão arterial e obter efeitos benéficos na lipemia, a American Dietetic Association – ADA²⁹ – recomenda uma ingestão média de 3 a 10g/dia de inulina e frutooligosacarídeos. Estudos diversos têm demonstrado que o consumo de quantidades moderadas de inulina é benéfico à saúde, principalmente pelo aumento da absorção de minerais, como o Cálcio (Ca), Ferro (Fe) e Magnésio (Mg), importantes no crescimento e desenvolvimento infantil³⁰⁻³². Nesta pesquisa, a escolha do percentual de inulina a ser adicionado na formulação GM+FAI foi baseada na recomendação de Reid et al.³³, que sugerem doses de 1 a 3 g/dia de prebióticos, para crianças. Esses valores, que são observados nos produtos industrializados expostos à venda, destinados a essa faixa etária, atendem às recomendações da RDC nº18/99³⁴, para alimentos em geral.

De nosso conhecimento, esta é a primeira pesquisa que demonstra um aumento no crescimento e desenvolvimento de ratos recém-desmamados,

alimentados com uma associação de flocos de abóbora, ricos em carotenoides, com 3% de inulina. No que diz respeito ao aumento de peso corporal, registrado nos ratos do grupo GM+FAI, ele pode ter sido influenciado por diversos fatores da dieta, cuja magnitude depende da presença de inibidores e/ou promotores e da sua composição. Neste contexto, a incorporação de inulina a essa formulação pode ter sido o fator promotor desse efeito. Em contraposição, os achados de Zduńczyk et al.³⁵, ao avaliarem a combinação inulina e polifenóis *in vivo*, e de Lobo et al.³⁶, em dietas suplementadas com 5% de inulina, evidenciaram perda de peso. Considerando que a única diferença entre as dietas oferecidas aos grupos experimentais GM+FA e GM+FAI foi a adição de 3% de inulina à dieta consumida por este último grupo, outra hipótese plausível seria a de um possível sinergismo entre este frutano e os carotenoides naturalmente presentes nos flocos da abóbora, com repercussões sobre a crescimento e desenvolvimento dos animais^{7,37}. Conforme Thomas et al.³⁸, a vitamina A é essencial para o crescimento e diferenciação celular, particularmente do tecido epitelial, cujas células das vilosidades são importantes na digestão e absorção dos nutrientes.

Em relação ao CEA, parâmetro que avalia a eficácia da dieta, determinando o valor nutritivo e aproveitamento biológico da proteína, o fato de os animais GM+FAI não apresentarem diferenças em relação aos do grupo GC indica que a modificação da dieta consumida por este grupo, pela adição de 6% da formulação láctea à base de flocos de abóbora suplementada com 3% de inulina — dieta GM+FAI —, não afetou o aproveitamento biológico das proteínas, refletindo o seu equilíbrio e qualidade.

Conhecendo que o efeito prebiótico da inulina é dependente do período de suplementação e que, para manter o crescimento das bactérias benéficas, seu consumo deve ser contínuo³⁹, estudos mais acurados expandindo este experimento até a idade adulta deverão ser realizados, com vistas a elucidar a natureza dos mecanismos envolvidos.

Em resumo, constata-se que, além da redução do risco de hipovitaminose A, observada em trabalhos anteriores, os resultados desta pesquisa demonstram que a suplementação da formulação à base de flocos de abóbora com inulina exerce benéficos efeitos sobre o desenvolvimento e crescimento dos ratos, após desmame.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES pela bolsa de estudos, ao CNPq pelo suporte financeiro da pesquisa e à Clariant (SP/Brasil) pela doação da inulina.

REFERÊNCIAS

1. Dolinsky R, Ramalho A. Deficiência de vitamina A: uma revisão atualizada. *Compacta Nutr*. 2003;4:1-18.
2. Fernandes ZF, Guerra NB, Diniz NMA, Salgado SM, Guerra TMM, Lopes ACS, Neta JCPS, Padilha MRF. Desenvolvimento de bebida láctea à base de flocos de abóbora. *Arch Latinoam Nutr*. 1998;48:175-8.
3. Faro ZP. Aproveitamento industrial da polpa de abóboras como estratégia para o combate à hipovitaminose A [tese de doutorado]. Recife (PE): Universidade Federal de Pernambuco; 2001.
4. Kalluf VH. Desidratação da polpa de abóbora (*Cucurbita moschata*) e seus teores em beta-caroteno [dissertação de mestrado]. Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná; 2006.
5. Ambrósio CLB, Campos FACS, Faro ZP. Carotenoides como alternativa contra a hipovitaminose A. *Rev Nutr*. 2006;19(2):233-43.
6. Silveira KC. Bebida à base de flocos de abóbora com inulina: características prebióticas e aceitabilidade [dissertação de mestrado]. Recife (PE): Universidade Federal de Pernambuco; 2006.
7. Rao AV, Rao LG. Carotenoids and human health. *Pharmacol Res*. 2007;55:207-16.
8. Sentanin MA, Rodriguez-Amaya DB. Teores de carotenoides em mamão e pêssego determinados por cromatografia líquida de alta eficiência. *Ciênc Tecnol Alim*. 2007;27:13-9.
9. Valtueña S, Del Rio D, Pellegrini N, Ardigò D, Franzini L, Salvatore S, et al. The total antioxidant capacity of the diet is an independent predictor of plasma β -carotene. *Eur J Clin Nutr*. 2007;61:69-76.
10. Roberfroid M. Prebiotics: The concept revisited. *J Nutr*. 2007;137:830S-7S.
11. Madrigal L, Sangronis E. La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. *Arch Latinoam Nutr*. 2007;57(4):387-96.
12. Castiglia-Delavaud C, Verdier E, Besle JM, Vernet J, Boirie Y, Beaufrere, et al. Net energy value of non-starch polysaccharide isolates (sugarbeet fibre and commercial inulin) and their impact on nutrient digestive utilization in healthy human subjects. *Braz J Nutr*. 1998;80:343-52.
13. Roberfroid MB, Delzenne NM. Dietary fructans. *Ann Rev Nutr* 1998;18:117-43.
14. Reeves PG. Components of the AIN-93 diets as improvement in the AIN-76^a diet. *J Nutr*. 1993;123:1939-51.
15. Association of Official Analytical Chemistry. Official methods of analysis of official Analytical Chemist International. Washington; 2002.
16. Rodriguez-Amaya AB. A guide to carotenoid analysis in food. Washington: International Life Sciences Institute; 1999.
17. Trumbo PR, Yates AA, Renfro-Schlicker S, Saitor C. Dietary reference intakes: revised nutritional equivalent for folate, vitamin E and provitamin A carotenoids. *J Food Comp Anal*. 2003;16:379-82.
18. Buchholz AC, Schoeller DA. Is a calorie a calorie? *Amer J Clin Nutr*. 2004;79:899S-906S.
19. Roberfroid MB. Dietary fiber, inulin, and oligofructose: a review comparing their physiological effects. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 1993;33(2):103-48.
20. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. [acesso 23 jan 2008]. Disponível em: [http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=144].
21. Araújo CRC, Flores H. Improved spectrophotometric vitamin A assay. *Clin Chem*. 1978;24(2):386.
22. Martins MC, Oliveira YP, Coitinho DC, Santos LMP. Panorama das ações de controle da deficiência de vitamina A no Brasil. *Rev Nutr*. 2007;20(1):5-1
23. Chagas MHC, Flores H, Campos FACS, Santana RA, Lins ECB. Teratogenia da vitamina A. *Rev Bras Saude Mater Infant*. 2003;3(3):247-52.
24. Ambrósio CLB. Eficácia de flocos desidratados de abóbora na prevenção e controle da carência de vitamina A [tese de doutorado]. Recife (PE): Universidade Federal de Pernambuco; 2006.
25. Angelis RC. Novos conceitos em nutrição: reflexões a respeito do elo dieta e saúde. *Arq. Gastroenterol*. 2001;38(4):269-71.
26. Yeum KJ, Russel RM. Carotenoid bioavailability and bioconversion. *Ann Rev Nutr*. 2002;22:483-504.
27. Scott KJ, Rodriguez-Amaya D. Pro-vitamin A carotenoid conversion factors: retinol equivalents – fact or fiction? *Food Chem*. 2000;69:125-7.
28. Krinsky NI, Roth-Mathews MM, Welankiwar S, Sehgal KP, Lausen NCG, Russett M. The Metabolism of [14C] β -Carotene and the Presence of Other Carotenoids in Rats and Monkeys. *J Nutr*. 1990;1229: 81-7.
29. O'Neill J, Plains M. The lifelong benefits of inulin and oligofructose. *Cer Foods World*. 2008;53:65-8.
30. American Dietetic Association. Position of the American Dietetic Association: health implications of dietary fiber. *Amer Diet Assoc*. 2008;108:1716-31.
31. Abrams SA, Griggin IJ, Hawthorne KM, Ellis KJ. Effect of prebiotic supplementation and calcium intake on body mass index. *J Ped*. 2007;151:293-8.
32. Bosscher D, Loo JV, Franck A. Inulin and oligofructose as functional ingredients to improve bone mineralization. *Intern Dairy J*. 2006;16:1092-7.
33. Roberfroid MB. Introducing inulin-type fructans. *Braz J Nutr*. 2005;93(1):13-25.
34. Reid G, Sanders ME, Gaskins HR, Gibson GR, Mercenier A, Rastall R et al. New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. *J Clin Gastroenterol*. 2003;37(2):105-18.

35. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999. Aprova o regulamento técnico que estabelece diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. [acesso 23 jan 2008]. Disponível em: [<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/legis/especifica/regutec.htm>].
36. Zduńczyk Z, Juśkiewicz J, Estrella I. Cecal parameters of rats fed diets containing grapefruit polyphenols and inulin as single supplements or in a combination. *Nutrit*. 2006;22:898-904.
37. Lobo AR, Colli C, Filisetti TMCC. Fructooligosaccharides improve bone mass and biomechanical properties in rats. *Nutr Res*. 2006;26:413-20.
38. Haulý MCO, Moscatto JA. Inulina e oligofructose: uma revisão sobre propriedades funcionais, efeito prebiótico e importância na indústria de alimentos. *Semina: Ciênc Exat Tecnol*. 2002;23:105-18.
39. Thomas S, Prabhu R, Balasubramanian KA. Retinoid metabolism in the rat small intestine. *Braz J Nutr*. 2005;93:59-63.
40. Wiele TV, Boon N, Possemiers S, Jacobs H, Verstraete W. Prebiotics effects of chicory inulin in the stimulator of the human intestinal microbial ecosystem. *FEMS Micr Ecol*. 2004;51:143-53.

Baixo consumo habitual de alimentos fonte de vitamina E em população infantil

Low habitual consumption of food sources of vitamin E in the child population

RIALA6/1366

Rafaella Cristhine Pordeus LUNA^{1*}, Christiane Carmem Costa do NASCIMENTO¹, Geovanna Torres de Paiva BANDEIRA¹, Adyla Farias de OLIVEIRA¹, Mussara Gomes Cavalcante Alves MONTEIRO¹, Fernanda Patrícia Torres BARBOSA¹, Tarciane Marinho ALBUQUERQUE², Ana Hermínia de Andrade e SILVA³, Ronei Marcos de MORAES³, Roberto Teixeira LIMA¹, Maria José de Carvalho COSTA¹

*Endereço para correspondência: ¹Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Castelo Branco, Rua Capitão José Pessoa, 363, Jaguaribe, João Pessoa/PB, Brasil. CEP: 58015-170. Tel.: 55 (83) 3221-7662. E-mail: rafaellacristhine@yahoo.com.br.

²Departamento de Enfermagem, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba

³Departamento de Estatística, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba.

Projeto financiado pelo Ministério da Saúde/CNPq/FAPESQ. Edital número 004/06, projeto número 1-003/06. PP-SUS.

Recebido: 01.07.2010 – Aceito para publicação: 27.06.2011

RESUMO

Este estudo avaliou o consumo alimentar habitual de vitamina E em crianças do município de João Pessoa, Nordeste-Brasil. Estudo epidemiológico transversal, de base populacional, representativo do referido município foi realizado em 170 crianças de idade entre 2 e 10 anos. Foram coletados os dados antropométricos e do consumo alimentar por meio de Questionário Quantitativo de Frequência Alimentar, previamente validado para a população desse município. O consumo de vitamina E foi avaliado pelo *software* Dietsys 3.0. Observou-se maior frequência de crianças com peso adequado (59,4%), seguido de 20% com obesidade e 13% com sobrepeso. Houve maior frequência de crianças com consumo de vitamina E abaixo da necessidade média estimada (62,4%). As crianças que apresentaram ingestão adequada de vitamina E consumiram mais iogurte, tortas e bolos, e aquelas com o inadequado consumiram mais margarina. Na amostra total, os produtos fonte de vitamina E mais consumidos foram iogurte, *waffles*, tortas, bolos, batatas fritas, óleos e margarina. Conclui-se que >50% das crianças analisadas apresentam baixo consumo de vitamina E, sendo necessária a implementação de estratégias para aumentar a disponibilidade de alimentos menos calóricos, considerando-se a elevada prevalência de obesidade e sobrepeso observada, e mais ricos em vitamina E para essa população.

Palavras-chave. consumo alimentar, vitamina E, crianças, estudo populacional.

ABSTRACT

This study assessed the regular vitamin E-rich food intake by children of João Pessoa, northeast Brazil. A cross-sectional, epidemiological, and population-based format study was carried out in 170 children aged from 2 to 10 years. Anthropometric data were collected and the food consumption was assessed by the Quantitative Food Frequency Questionnaire, previously validated for population of this municipality. The vitamin E consumption was assessed by using Dietsys software 3.0. High frequency of children with adequate weight was found (59.4%), followed by 20% obese and 13% overweight individuals; and a high frequency of vitamin E intake below the estimated average requirement (62.4%) was observed. Children who had adequate vitamin E intake regularly consumed yoghurt, pies and cakes; those with inadequate vitamin E intake habitually consumed margarine. On the whole, the vitamin E-rich products mostly consumed were yoghurt, waffles, pies, cakes, potato chips, oils and margarine. In conclusion, >50% of the children showed low vitamin E intake, thus it will be needed to implement strategies to increase the availability of low calories foods, considering the high prevalence of obesity and overweight observed, and also the vitamin E-rich foods for this population.

Keywords. food intake, vitamin E, children, obesity, population study.

INTRODUÇÃO

O consumo alimentar de crianças tem sido objeto de estudo de diversas pesquisas, mas, ainda existem poucos estudos populacionais brasileiros que identifiquem situações alimentares e nutricionais, especificamente no que se refere a vitaminas e minerais^{1,2}.

Observa-se que vêm ocorrendo uma redução da desnutrição infantil no Brasil^{3,4} e o aumento da obesidade, especialmente nas classes mais pobres. Esse fato mostra-se relevante para a saúde pública, uma vez que predispõe esta faixa etária a problemas respiratórios, diabetes *mellitus*, hipertensão arterial e dislipidemias, além da maior frequência de carências nutricionais específicas em vitaminas e minerais, devido provavelmente ao maior consumo de alimentos densos e com menos nutrientes, por serem mais acessíveis à população^{5,6}.

A avaliação do consumo alimentar tem um papel crítico na área de pesquisa em nutrição e saúde, pois, estuda a disponibilidade de alimentos, estima a adequação da ingestão dietética de grupos populacionais, investiga a relação entre dieta, saúde e estado nutricional, além de avaliar os programas de suplementação alimentar, a educação e a intervenção nutricional⁷⁻⁹.

O consumo alimentar de uma dieta saudável ajuda a prevenir uma ampla gama de doenças, principalmente na infância, sugerindo um efeito protetor da dieta quando há um consumo adequado de todos os grupos de alimentos, em especial, de frutas e verduras, fontes de vitaminas e minerais^{10,11}.

Nesse particular aspecto, a vitamina E ocorre naturalmente nas frutas, em menor quantidade, e principalmente, nos vegetais verde-escuros, nas sementes oleaginosas, nos óleos vegetais, margarinas e no germe de trigo, podendo também ser encontrada em alimentos de origem animal, como gema de ovo e fígado^{12,13}.

Essa vitamina desempenha uma série de funções no organismo, especialmente como agente antioxidante e na proteção contra dificuldades visuais e doenças crônicas não transmissíveis, em particular as doenças cardiovasculares, enfermidade que vem acometendo cada vez mais faixas etárias mais precoces. No que se refere a este aspecto, a vitamina E previne a peroxidação de ácidos graxos polinsaturados (PUFAs – *Polyunsaturated Fatty Acids*) que constituem os componentes estruturais das membranas¹⁴⁻¹⁶.

São escassos estudos representativos de populações de diferentes níveis socioeconômicos sobre o consumo de

vitamina E em crianças. Diante da importância da vitamina E, surge a presente proposta de avaliar o consumo alimentar habitual infantil e investigar quais os principais grupos de alimentos, ricos em vitamina E, mais ingeridos por parte dessa população.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho constitui um estudo epidemiológico transversal, de base populacional, realizado no município de João Pessoa/PB, para o qual se utilizou dados de um estudo maior intitulado “Primeiro diagnóstico e intervenção da situação alimentar, nutricional e das doenças não transmissíveis mais prevalentes da população do município de João Pessoa/PB” (1ºDISANDNT/JP-2008/2009), desenvolvido pela Universidade Federal da Paraíba/Brasil.

O referido estudo teve como objetivo efetuar o mapeamento, na população do município de João Pessoa, para todas as faixas etárias, de padrão do consumo alimentar habitual, padrão do consumo alimentar habitual associado a doenças crônicas não transmissíveis mais prevalentes, padrão de consumo de alimentos cariogênicos, pH de placa bacteriana e sua relação com a cárie dentária, caracterização da qualidade dos alimentos mais consumidos, frequência das carências nutricionais específicas (anemia e hipovitaminoses A e C), frequência de obesidade, diabetes, cardiopatias e desnutrição, e assistência ao usuário com comportamento de risco e/ou doenças crônicas degenerativas já instaladas.

A amostra foi calculada baseando-se em informações fornecidas pela prefeitura do referido município, sobre a variável renda. Realizou-se uma amostragem a partir do número de quadras estimando-se o número médio de residências por quadra pela quantidade de Imposto Predial e Territorial Urbano (IPTU) fornecida pela prefeitura. Utilizou-se uma amostragem estratificada¹⁷, com base em informações obtidas do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística para classificar os bairros do município por renda, o que resultou em dez estratos. Aplicou-se uma amostragem sistemática¹⁸ para calcular qual seria a razão utilizada para a escolha das residências a serem visitadas em cada quadra. O fator de sistematização encontrado foi sete, de forma que, sorteada e visitada a primeira casa de uma quadra, as restantes seriam visitadas a cada sete casas. O total resultou em 722 domicílios sorteados e 2030 indivíduos encontrados nas residências sorteadas.

As visitas domiciliares e aplicação dos questionários foram realizadas por equipes de pesquisadores graduandos do Departamento de Nutrição e mestrandos do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição da Universidade Federal da Paraíba, devidamente treinados previamente ao início da coleta de dados e após realização do estudo piloto.

Inicialmente foram encontradas 266 crianças nos domicílios sorteados na faixa etária de zero a 10 anos de idade nos cinco Distritos Sanitários delimitados pela Secretaria de Saúde do Município, entre agosto de 2008 a janeiro de 2010. Das 266 crianças, 216 foram selecionadas, de acordo com o procedimento amostral, sendo excluídas do estudo as que não correspondiam à faixa etária delimitada (sendo esta de 2 a 10 anos) ($n = 33$), resultando em 183 crianças. Também foram excluídas aquelas cujos pais desistiram de participar ($n = 5$) e as que não apresentaram dados completos ($n = 8$), resultando em um total de 170 crianças selecionadas na faixa etária de 2 a 10 anos. A criança selecionada era submetida à avaliação antropométrica (peso e altura) e em seguida eram aplicados os questionários com os seus responsáveis.

Os responsáveis pelas crianças foram esclarecidos sobre o projeto, convidados a participar e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde que rege as pesquisas envolvendo seres humanos. A presente pesquisa foi previamente submetida e aprovada pelo Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, em protocolo de nº 0493.

Os dados sobre o consumo alimentar foram coletados por meio de um questionário quantitativo de frequência alimentar (QQFA), validado para a população adulta feminina do município de João Pessoa/PB em parceria entre a Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo e o Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição da UFPB, utilizando-se um álbum de desenhos de alimentos com medidas caseiras em porções configuradas com base no peso real do consumo médio de alimentos validados para essa população, para de forma mais eficaz quantificar o tamanho das porções consumidas, minimizando prováveis variações¹⁹⁻²¹. Os cálculos para quantificar o consumo de energia e das vitaminas foram realizadas com o auxílio do *software Dietsys 3.0*²². Adotou-se como referência para o consumo de vitamina E as necessidades médias estimadas para a faixa etária de 2 a 10 anos (EAR – *Estimated Average Requirement*)²³.

A partir da coleta e análise dos inquéritos dietéticos realizou-se uma classificação dos principais alimentos fonte de vitamina E consumidos pelas crianças. A primeira fonte foi classificada como o alimento que mais contribuiu para o consumo de vitamina E (em gramas) a partir da análise com o *Dietsys*, seguindo o mesmo raciocínio para o segundo e terceiro alimentos (segunda e terceira fontes). Os alimentos mais consumidos foram definidos como aqueles que apresentaram maior frequência ao observar as três fontes mais consumidas (Tabela 3).

Para avaliação do estado nutricional utilizou-se uma balança digital (Plenna®), com capacidade de até 150 kg, para aferição do peso, e uma fita métrica extensível de 2 m de comprimento, fixada numa parede plana sem rodapé, para aferição da altura. Esta foi realizada três vezes para se obter a média. O Índice de Massa Corporal (IMC) foi classificado de acordo com a Organização Mundial de Saúde²⁴.

O procedimento estatístico foi realizado com auxílio do *software R*²⁵. Os testes estatísticos aplicados envolveram inicialmente uma análise parcial dos dados, esta foi expressa por uma estatística descritiva representada pela frequência simples dos dados, com a caracterização e descrição do fenômeno que se desejou estudar e interpretar. Foram utilizadas medidas de posição como de tendência central e de dispersão (média, mediana e desvio-padrão). Um teste de correlação foi aplicado para verificar a existência de relação entre as variáveis IMC e consumo de vitamina E. Para verificar essa existência, utilizou-se a Correlação não paramétrica de Spearman, devido à não normalidade das variáveis. Utilizou-se o teste do qui-quadrado para verificar associação entre consumo alimentar habitual de vitamina E em crianças nas faixas etárias de 2-3 anos, 4-8 anos e 9-10 anos, respeitando-se as recomendações quanto à necessidade média estimada (EAR – *Estimated Average Requirement*)²³.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A ingestão de alimentos na infância está diretamente associada ao poder de compra da família, à disponibilidade dos alimentos, ao conteúdo nutricional dos alimentos adquiridos e às iniciativas governamentais para realização de alimentação extradomiciliar, a exemplo da regulamentação da merenda escolar nas escolas públicas. As necessidades nutricionais da criança saudável são influenciadas pela idade, velocidade de crescimento, metabolismo, prática de atividade física e processos infecciosos agudos²⁶.

VALORES CRÍTICOS		DIAGNÓSTICO NUTRICIONAL
< Percentil 3	< Escore-z -2	BAIXO IMC PARA IDADE
≥ Percentil 3 e < Percentil 85	≥ Escore-z -2 e < Escore-z +1	IMC ADEQUADO OU EUTRÓFICO
≥ Percentil 85 e < Percentil 97	≥ Escore-z +1 e < Escore-z +2	SOBREPESO
≥ Percentil 97	≥ Escore-z +2	OBESIDADE

IMC = Índice de Massa Corporal

Quadro 1. Valores críticos e diagnóstico nutricional para crianças²⁴

Tabela 1. Consumo alimentar habitual de vitamina E segundo IMC e EAR* de crianças com idade entre dois e dez anos. João Pessoa/PB, Brasil, 2008-2010

IMC	N (%)	Consumo de Vitamina E (mg/dia)	Frequência de consumo de Vitamina E	
		Média (±DP)	≥ EAR* N (%)	< EAR* N (%)
Baixo IMC	13 (7,60)	4,80±1,08	5 (38,50)	8 (61,50)
Eutrófico	101(59,40)	6,18±3,00	38 (37,60)	63 (62,40)
Sobrepeso	22 (13,00)	6,64±3,80	10 (45,50)	12 (54,50)
Obesidade	34 (20,00)	6,59±3,21	16 (47,10)	18 (52,90)

*Teste de Correlação de Spearman: Consumo de vitamina E e IMC (r = 0,1398, p = 0,069), *EAR (Estimated Average Requirement - Necessidade média estimada), IMC: Índice de Massa Corporal, N: número de indivíduos*

Tabela 2. Consumo alimentar habitual de vitamina E em crianças com idade entre dois e dez anos segundo as Necessidades Médias Estimadas (EAR)*. João Pessoa/PB, Brasil, 2008-2010

Faixa Etária	N	Consumo Vitamina E (mg/dia)	Necessidade Média Estimada	Frequência de Consumo de Vitamina E	
		Média (±DP)	EAR* (mg/dia)	≥ EAR* N (%)	< EAR* N (%)
2-3 anos	36	7,18±2,63	5	21 (58,33)	15 (41,67)
4-8 anos	94	6,24±2,63	6	38 (40,43)	56 (59,57)
9-10 anos	40	7,64±4,17	9	10 (25,00)	30 (75,00)

*X₂ => p = 0.013, existem diferenças significativas nas sequências, ou seja, existe associação entre idade e consumo de vitamina E; *EAR (Estimated Average Requirement - Necessidade média estimada), DP: Desvio-Padrão, N: número de indivíduos*

Atualmente, observa-se um maior consumo de alimentos ricos em calorias e pobres em nutrientes, contribuindo, junto ao sedentarismo, para o aumento da prevalência da obesidade, independentemente da faixa etária.

No presente estudo, em relação às características antropométricas, o Índice de Massa Corporal (IMC) médio foi de 16,76 kg/m², observando-se maior proporção de crianças com IMC adequado (59,4%), seguido de 20% com obesidade e 13% com sobrepeso (Tabela 1). As crianças

com IMC adequado apresentaram maior frequência de consumo de vitamina E abaixo das necessidades médias estimadas para essa faixa etária (62,4%) seguido das com baixo IMC (61,5%).

Embora não encontrou-se no presente estudo relação entre consumo de vitamina E e IMC (r = 0,1368; p>0,05), sabe-se que alimentos fonte desse nutriente são altamente energéticos e podem, portanto, contribuir para o aumento de peso. O consumo excessivo de energia em

relação ao seu gasto pode promover obesidade na infância⁵. Nas recomendações alimentares para as crianças inclui-se não somente a restrição do consumo de alimentos energeticamente densos²⁷ como também a oferta de uma variedade maior de alimentos que sejam de baixa densidade energética²⁸ como prevenção do sobrepeso e obesidade.

Apesar de sua importância, ainda são escassos no Brasil dados sobre o consumo alimentar pela população em geral, estado nutricional e o conteúdo de vitamina E nos alimentos produzidos no País, independentemente da faixa etária, evidenciando a importância e a necessidade de estudos relacionados a essa vitamina²⁹.

Na Tabela 2, pode-se observar que crianças na faixa etária de 9 a 10 anos apresentaram consumo médio de vitamina E inferior à necessidade média estimada (EAR – *Estimated Average Requirement*). Do total dessa faixa etária, 75% apresentaram baixo consumo dessa vitamina. Nas crianças de 4-8 anos, apesar do consumo médio apresentar-se adequado, ou seja, semelhante à EAR, 59,57% das crianças tiveram baixo consumo de vitamina E. Ressalta-se, portanto, um consumo inadequado dessa vitamina nas crianças de 4 a 10 anos e na amostra total de 59,41%.

O suprimento de vitaminas como riboflavina, niacina, tiamina, folato, vitamina C, como também para vitamina E, objeto deste estudo, pode ser baixo em algumas populações, no entanto não há evidência de benefício da indicação de suplementação dessas

vitaminas de forma rotineira³⁰, e sim recomendação de uma alimentação equilibrada.

Devido à escassez de pesquisas sobre o consumo de vitamina E em crianças no Brasil, torna-se difícil comparar as frequências de consumo encontradas no presente estudo, levando em consideração as características diferenciadas das amostras, bem como as diferentes metodologias empregadas. Logo, como complemento do tema, serão apresentados resultados de estudos realizados em outros países. Consumo inadequado de vitamina E foi alvo de observação em estudo realizado na Alemanha com crianças e adolescentes com idades entre 6-17 anos, sendo um dos nutrientes mais críticos³¹. Coreanos com idade entre 2 e 6 anos também apresentaram baixo consumo de vitamina E, onde 67% consumiam menos do que as recomendações coreanas de ingestão de vitamina E, e 77% tinham consumos de alfa-tocoferol menores que as necessidades estimadas dos E.U.A./Canadá³².

Observa-se na Tabela 3 que as principais fontes alimentares de vitamina E para as crianças que apresentaram consumo adequado foram: iogurte na faixa etária de 2 a 3 anos, iogurte, tortas e bolos na faixa etária de 4 a 8 anos e tortas e bolos para a faixa etária de 9 a 10 anos. Já para aquelas crianças com consumo de vitamina E abaixo da necessidade média estimada (EAR – *Estimated Average Requirement*) os alimentos fonte mais consumidos foram: iogurte (2-3 anos), margarina (4-8 anos) e margarina,

Tabela 3. Principais alimentos fonte de vitamina E consumidos por crianças com idade entre dois e dez anos. João Pessoa/PB, Brasil, 2008-2010

Idade	Consumo Adequado de vitamina E ≥ EAR				Consumo Inadequado de vitamina E < EAR			
	1ª Fonte	2ª Fonte	3ª Fonte	Mais consumidos	1ª Fonte	2ª Fonte	3ª Fonte	Mais consumidos
2-3 anos (n=36)	iogurte	waffles e panquecas	iogurte, batata frita e óleos	iogurte	iogurte	iogurte, leite e margarina	iogurte	iogurte
4-8 anos (n=94)	iogurte, tortas e bolos	iogurte	tortas e bolos	iogurte, tortas e bolos	margarina	margarina	iogurte	margarina
9-10 anos (n=40)	iogurte, óleos, tortas e bolos	tortas e bolos	waffles e panquecas	tortas e bolos	margarina	tortas e bolos	biscoitos	margarina, tortas, bolos e biscoitos
Mais consumidos	iogurte	waffles, iogurte, tortas e bolos	iogurte, batata frita, óleos, tortas, bolos e waffles	iogurte, tortas e bolos	margarina	margarina	iogurte	margarina

Fonte: Dietsys 3.0 22

EAR (Estimated Average Requirement – Necessidade média estimada)

tortas, bolos e biscoitos (9-10 anos). Portanto, as crianças que apresentaram um consumo de vitamina E adequado consumiram mais iogurte, tortas e bolos como fonte dessa vitamina, já as que apresentaram consumo inadequado consumiram mais margarina. Na amostra total os produtos fonte de vitamina E mais consumidos foram iogurte, waffles, tortas e bolos, batatas fritas, óleos e margarina.

No Brasil, os dados dos últimos levantamentos de disponibilidade domiciliar de alimentos, incluídos na Pesquisa de Orçamento Familiar, mostram o consumo de alguns alimentos fonte, sem quantificar o teor de vitamina E ingerido pela população em geral³³. Em estudos analisados por Guinazi³⁴ com adultos brasileiros observou-se consumo expressivo de alimentos fonte de vitamina E, como ovos e óleos (4,3 e 7,5 kg/*per capita*/ano, respectivamente), e, entretanto, quanto ao consumo de hortaliças folhosas observou-se uma média diária de apenas 7,7 g, o que corresponde a 2,8 kg/*per capita*/ano. Por outro lado, Nilson e Piza³⁵ relataram um baixo consumo de vitamina E pela população brasileira.

Nos Estados Unidos, os alimentos que fornecem o maior percentual de vitamina E ingerida pelas crianças de 2 a 18 anos são margarina, o grupo dos bolos, pães e biscoitos, nozes, tomates, óleos, batata do tipo *chips*, leite e ovos, com uma contribuição variando de 3,9% a 10,7% da ingestão diária dos alimentos consumidos³⁶.

Considerando que em situações de carências nutricionais específicas o consumo de micronutrientes em baixa concentração já é suficiente para reverter este estado de carência e que a suplementação com micronutrientes atualmente é vista com muita prudência, por parte dos especialistas, devido aos efeitos colaterais nocivos provocados principalmente por suplementos em altas concentrações, se faz pertinente, em casos de necessidades de suplementos, estudos aprofundados sobre o risco-benefício, além de ser importante deixar opção de escolha para a população quanto ao consumo de alimentos, disponibilizando no mercado os mesmos produtos de forma enriquecida e não enriquecida.

A vitamina E apresenta efeitos positivos, tanto para a saúde humana quanto para a qualidade nutricional dos alimentos, e a sua utilização na indústria alimentícia como antioxidante parece ser uma estratégia eficaz para o aumento da ingestão diária desse micronutriente. Os alimentos que possuem alto teor de gordura, como o leite e a margarina, ou aqueles que são comumente ingeridos com outros alimentos ricos em gordura, podem ser, preferencialmente, fortificados com vitamina E por

propiciarem maior absorção desse nutriente²⁹ e indicados para populações com baixo consumo.

CONCLUSÃO

Os resultados sobre o padrão de consumo alimentar da população infantil brasileira apontam para uma situação de “risco alimentar e nutricional” e exigem uma intervenção por parte dos profissionais de saúde para a promoção da alimentação saudável^{37,38}.

No presente estudo, observou-se que mais da metade da população infantil estudada apresenta um baixo consumo de vitamina E, sinalizando a necessidade de estratégias quanto ao aumento da disponibilidade de alimentos menos densos em calorias e mais ricos em vitamina E para essa população.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos órgãos financiadores da pesquisa: o Conselho Nacional de Pesquisa/CNPq, Ministério da Saúde e Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba/FAPESQ-PB, e à Universidade Federal da Paraíba/Programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição.

REFERÊNCIAS

1. Fidelis, CMF, Osório, MM. Consumo alimentar de macro e micronutrientes de crianças menores de cinco anos no Estado de Pernambuco, Brasil. *Rev Bras Saúde Matern Infant*. 2007;7(1):63-74.
2. Fisberg RM, Marchioni DML, Cardoso MRA. Estado nutricional e fatores associados ao déficit de crescimento de crianças frequentadoras de creches públicas do Município de São Paulo, Brasil. *Cad Saúde Pública*. 2004;20(3):812-7.
3. Lima ALL, Silva, ACE, Konno, SC et al. Causas do declínio acelerado da desnutrição infantil no Nordeste do Brasil (1986-1996-2006). *Rev Saúde Pública*. 2010;44(1):17-27.
4. Sarni ROS, Souza FIS, Catherino P et al. Tratamento da desnutrição em crianças hospitalizadas em São Paulo. *Rev Assoc Bras Med*. 2005;51(2):106-12.
5. Butte NF, Ellis KJ. Obesity and the environment: where do we go from here? *Science (Wash.)*. 2003;301:301-598.
6. Corso ACT, Botelho LJ, Zeni LAZR et al. Sobrepeso em crianças menores de 6 anos de idade em Florianópolis, SC. *Rev Nutr*. 2003;16(1):21-8.
7. Cavalcante AAM, Tinôco ALA, Cotta RMM et al. Consumo alimentar e estado nutricional de crianças atendidas em serviços públicos de saúde do município de Viçosa, Minas Gerais. *Rev Nut*. 2006;19(3):321-30.

8. Cavalcante AAM, Priore SE, Franceschini SCC. Estudos de consumo alimentar: aspectos metodológicos gerais e o seu programa na avaliação de crianças e adolescentes. *Rev Bras Saúde Matern Infant*. 2004;4(3):229-40.
9. Nowak M, Büttner P. Relationship between adolescents food-related beliefs and food intake behaviors. *Nutr Res*. 2003;23:45-55.
10. Valtuenã S, Pellegrini N, Franzini L et al. Foods selection based on total antioxidant capacity can modify antioxidant intake, systemic inflammation, and liver function without altering markers of oxidative stress. *Am J Clin Nutr*. 2008;87:1290-7.
11. Rautiainen S, Serafini M, Morgenstern R et al. The validity and reproducibility of food-frequency questionnaire – based total antioxidant capacity estimates in Swedish women. *Am J Clin Nutr*. 2008;87:1247-53.
12. Batista ES, Costa AGV, Pinheiro-sant'ana HL. Adição de vitamina E aos alimentos: implicações para os alimentos e para a saúde humana. *Rev Nutr*. 2007;20(5):525-35.
13. Mahan LK, Escoot-stump S. Krause: Alimentos, Nutrição e Dietoterapia. 12 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2010.
14. Azzi A, Stocker A. Vitamin E: non-antioxidant roles. *Pro Lipid Res*. 2000;39:231-55.
15. Bianchini R, Penteado MVC. Vitamina E. In: Penteado MVC. Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos. São Paulo: Manole; 2003. p.123-55.
16. Accioly E, Lacerda C, Aquino EM. Nutrição em obstetrícia e pediatria. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2009.
17. Cochran WG. Sampling Techniques. 3ed. Nova York: Walter A. Shewhart; 1977.
18. Bolfarine H, Bussab WO. Elementos de amostragem. 1 ed. São Paulo: Edgard Blucher; 2005.
19. Lima FEL, Latorre MRDO, Costa MJC et al. Diet and cancer in northeastern Brazil: evaluation of food and food group consumption in relation to breast cancer. *Cad Saúde Pública*. 2008;24:820-8.
20. Asciti LSR, Rivera MAA, Costa MJC et al. Manual de porções média em tamanho real: baseado no programa Dietsys. João Pessoa: UFPB; 2005.
21. Lima FELL, Slater B, Latorre MRDO et al. Validade de um questionário quantitativo de frequência alimentar desenvolvido para população feminina no nordeste do Brasil. *Rev Bras Epidemiol*. 2007;10(4):483-90.
22. Block G. Health Habits and History Questionnaire: Diet History and other Risk Factors. Bethesda, MD: National Cancer Institute, 1988.
23. Otten JJ, Hellewiz JP, Neyers LD. USDA. Dietary Reference Intake: the essential guide to nutrient requirements. Washington: The National Academies Press, 2006.
24. Brasil. Ministério da Saúde. Vigilância alimentar e nutricional - SISVAN: Orientações para a coleta e análise de dados antropométricos em serviços de saúde. Material preliminar. Brasília: Ministério da Saúde; 2008.
25. R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. [acesso fev 2010]. Disponível em: [http://www.r-project.org/].
26. Vitolo MR. Nutrição da gestação ao envelhecimento. 2ª ed. Rio de Janeiro: Rubio; 2008.
27. Barlow SE. Expert committee recommendations regarding the prevention, assessment, and treatment of child and adolescent overweight and obesity: summary report. *Pediatr*. 2007;120(4):164-92.
28. Leahy KE, Birch LL, Rolls BJ. Reducing the energy density of multiple meals decreases the energy intake of preschool- age children. *Am. J Clin Nutr*. 2008;88:1459-68.
29. Batista ECS, Costa AGV, Pinheiro-sant'ana HM. Adição da vitamina E aos alimentos: implicações para os alimentos e para a saúde humana. *Rev Nutr*. 2007;20(5):525-35.
30. Monte CMG, Giugliani ERJ. Recomendações para alimentação complementar da criança em aleitamento materno. *J Pediatr*. 2004;80(5):131-41.
31. Stahl A, Vohmann C, Richter A et al. Changes in food and nutrient intake of 6- to 17-year-old Germans between the 1980s and 2006. *Public Health Nutr*. 2009;12(10):1912-23.
32. Giraud DW, Kim YN, Cho YO et al. Vitamin E inadequacy observed in a group of 2- to 6-year-old children living in Kwangju, Republic of Korea. *Int J Vitam Nutr Res*. 2008;78(3):148-55.
33. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de orçamentos familiares – POF 2002-2003. Rio de Janeiro; 2004.
34. Guinazi M. Tocoferóis e tocotrienóis em hortaliças, ovos e óleos vegetais utilizados em restaurantes comerciais [dissertação de mestrado]. Viçosa (MG): Universidade Federal de Viçosa; 2004.
35. Nilson A, Piza J. Food fortification: a toll for fighting hidden hunger. *Food Nutr Bull*. 1998;19(1):49-60.
36. Subar AF, Krebs-Smith SM, Cook A et al. Dietary sources of nutrients among US children, 1989-1991. *Pediatrics*. 1998;102(4 PT1):913-23.
37. Conceição SIO, Santos CJN, Silva AAM, Silva JS, Oliveira TC. Consumo alimentar de escolares das redes pública e privada de ensino em São Luís, Maranhão. *Rev Nutr*. 2010; 23(6): 993-1004.
38. Saldiva SRDM, Silva LFF, Saldiva PHN. Avaliação antropométrica e consumo alimentar em crianças menores de cinco anos residentes em um município da região do semiárido nordestino com cobertura parcial do programa bolsa família. *Rev Nutr*. 2010; 23(2): 221-9.

Monitoramento da concentração de íons fluoreto na água destinada ao consumo humano proveniente de um município com diferentes sistemas de abastecimento público

Monitoring the fluoride ions concentration in water for human consumption from a municipality with different public water supply systems

RIALA6/1367

Rosângela Aguilar da SILVA*, Mateus Henrique PETRARCA¹, Roberto Costa SANTOS, Isabel Tacaco YAMAMOTO, Lilian Regina Macelloni MARQUES

*Endereço para correspondência: Centro de Laboratório Regional de Marília IV, Instituto Adolfo Lutz, Rua Lima e Costa, 1.630, Marília/SP, Brasil. CEP 17506-210. Tel.: 14 3433-1488. Fax: 14 3413-6550. E-mail: rasilva@ial.sp.gov.br.

¹ Programa de Aprimoramento Profissional em Laboratório de Saúde Pública

Recebido: 12.11.2010 – Aceito para publicação: 07.06.2011

RESUMO

No presente estudo foram avaliadas as concentrações de íons fluoreto em amostras de água destinada ao consumo humano em um município com diferentes sistemas de abastecimento público. Em 139 amostras coletadas no ponto de entrada das edificações, no período de 2003 a 2007, foram determinadas as concentrações de íons fluoreto por meio de eletrodo combinado seletivo para flúor. As concentrações em conformidade com o padrão estadual (0,6 a 0,8 mg/L) foram detectadas em 87 (62,6%) amostras e as proporções de conformidade aumentaram de 46,9% para 71,9% durante o período do estudo. As variações consideráveis nessas proporções, assim como nas concentrações mínimas e máximas, foram verificadas tanto em um mesmo sistema bem como entre diferentes sistemas de abastecimento de água. Os dados obtidos neste estudo indicam a necessidade de elaboração de planos de amostragem individualizados para cada sistema ou, ainda, a implantação de outra estratégia para efetuar o monitoramento da fluoretação da água em municípios com diferentes sistemas públicos de abastecimento de água para consumo humano.

Palavras-chave. água, sistema de abastecimento, íons fluoreto, monitoramento.

ABSTRACT

This study aimed at evaluating the concentrations of fluoride ions in water samples for human consumption in a city with different public supply systems. A total of 139 samples collected at the entry point of the buildings in the period from 2003 to 2007 were analyzed for determining fluoride ions concentrations using selective combined electrode for fluoride. Concentrations in compliance with the State standard criteria (0.6 to 0.8 mg/L) were detected in 87 (62.6%) samples, and the proportions of compliant results increased from 46.9% to 71.9% during this study period. Considerable variations in these proportions, as well as in the minimum and maximum concentrations were found in both samples from the same system and from different systems of water supply. These findings indicate the need for developing the sampling plans for each system or even another strategy for monitoring the water fluoridation in cities with different public systems of water supply for human consumption.

Keywords. water, supply system, fluoride ions, surveillance.

INTRODUÇÃO

A cárie dentária é uma doença que afeta a maioria da população e é caracterizada pela destruição do esmalte dentário devido à perda de cálcio e fosfato promovida pela interação de bactérias, componentes salivares e carboidratos da dieta. Esse processo de desmineralização pode ser limitado e/ou revertido pelo flúor, um elemento amplamente distribuído na natureza em combinação com outros elementos e presente na forma de íons fluoreto em soluções aquosas. A adição controlada de compostos fluoretados na água destinada ao consumo humano (fluoretação) é uma das mais importantes medidas de prevenção da cárie dentária, devido a sua segurança, baixo custo e abrangência populacional^{1,2}.

A fluoretação da água dos sistemas públicos de abastecimento passou a ser obrigatória no Brasil na década de 70². As normas e padrões nacionais para a fluoretação da água dos sistemas públicos de abastecimento destinado ao consumo humano foram estabelecidos em 1975, sendo a concentração recomendada de íon fluoreto definida de acordo com as médias das temperaturas máximas anuais de cada região do Brasil³. No Estado de São Paulo, o teor ideal estabelecido foi de 0,7 miligramas de flúor por litro (mg/L), sendo consideradas dentro do padrão de potabilidade as águas contendo concentrações dentro da faixa de 0,6 a 0,8 mg/L⁴. O sucesso da fluoretação da água de abastecimento como medida de saúde pública depende da adição e manutenção permanente das concentrações de íons fluoreto dentro dos padrões estabelecidos para o controle da cárie e prevenção da fluorose dentária².

Um sistema de abastecimento de água para consumo humano é definido como: “instalação composta por um conjunto de obras civis, materiais e equipamentos, destinada à produção e à distribuição canalizada de água potável para populações, sob a responsabilidade do poder público, mesmo que administrada em regime de concessão ou permissão”⁵. As normas nacionais estabelecem que, além do controle de qualidade da água efetuado de forma contínua pelo fornecedor de água, as autoridades de saúde de cada município e Estado devem desenvolver um conjunto de ações para verificar o atendimento dos padrões de qualidade estabelecidos⁵. No Estado de São Paulo, essas ações são desenvolvidas dentro do Programa de Vigilância da Qualidade da Água para o

Consumo Humano (PROÁGUA), cujos dados sobre o monitoramento das concentrações de íons fluoreto têm indicado a existência de dificuldades na manutenção dos níveis dentro do padrão estabelecido^{6,7}. Estudos realizados por instituições acadêmicas do Estado de São Paulo também têm identificado tal dificuldade em vários municípios^{8,9,10}.

O Instituto Adolfo Lutz – Centro de Laboratório Regional de Marília, um órgão integrante do Sistema de Vigilância do Estado de São Paulo, é responsável pela execução das análises de água consumida pela população de diversos municípios da região centro-oeste do interior paulista. O tipo e quantidade de sistemas de abastecimento existentes em cada município são variados e um mapa da rede de distribuição de cada sistema de um desses municípios está disponibilizado na rede mundial de computadores. Dessa forma, o presente estudo foi desenvolvido para avaliar as concentrações de íons fluoreto detectados em amostras de água submetidas às análises da vigilância da qualidade de acordo com o sistema de abastecimento que atende os bairros onde estão localizadas as edificações escolhidas para a coleta.

MATERIAL E MÉTODOS

O município estudado está localizado na região centro-oeste do Estado de São Paulo, conta com mais de 200.000 habitantes e tem temperatura média anual de 20 °C. Os sistemas de abastecimento de água estão sob a responsabilidade de um órgão municipal e captam água de manancial superficial (um rio e três represas) e/ou poço tubular profundo (P). Dentre os sete sistemas existentes no município, dois são constituídos por estações de tratamento de águas (E1 e E2), um por uma estação e um poço (E1 – P1) e quatro por um ou mais poços (P2, P3, P4 e P5-8), sendo que as águas derivadas dos mesmos foram armazenadas em nove diferentes reservatórios. O tratamento da água nas estações inclui a aeração, floculação, decantação, filtração, desinfecção, fluoretação e correção do pH, enquanto nos poços são feitas apenas a fluoretação e a desinfecção.

As amostras de água coletadas mensalmente nos pontos de entrada das edificações (cavelete) por técnicos da Vigilância Sanitária Municipal foram transportadas até o laboratório em caixa isotérmica contendo gelo, armazenadas a 7 °C por no máximo quatro dias e submetidas à determinação da concentração de íons

Tabela 1. Concentrações de íons fluoreto nas amostras de água destinada ao consumo humano em município da região centro-oeste do Estado de São Paulo de acordo com o ano de coleta

Ano	n	Íons fluoreto (mg/L)					
		< 0,6		0,6 - 0,8*		> 0,8	
		n	%	n	%	n	%
2003	32	10	31,3	15	46,9	7	21,9
2004	23	5	21,7	16	69,6	2	8,7
2005	17	6	35,3	10	58,8	1	5,9
2006	35	12	34,3	23	65,7	-	-
2007	32	7	21,9	23	71,9	2	6,3
Total	139	40	28,8	87	62,6	12	8,6

* Concentrações em conformidade com o padrão estabelecido pela legislação

Tabela 2. Concentrações de íons fluoreto detectadas em amostras de água destinada ao consumo humano de acordo com o sistema de abastecimento de um município da região centro-oeste do Estado de São Paulo

Sistema	Amostras			Concentrações mínimas e máximas (mg/L)				
	n	Padrão*	%	2003	2004	2005	2006	2007
Estação de tratamento								
E1	15	5	33,3	0,1 - 1,1	0,6	0,5 - 1,0	0,04 - 0,7	0,5 - 0,8
E2	23	14	60,9	0,7 - 1,1	0,4 - 0,6	0,5 - 0,7	0,5 - 0,7	0,6 - 0,7
Estação de tratamento e Poço								
Tubular Profundo (Reservatórios)								
E1 - P1 (A)	19	13	68,4	0,6 - 1,2	0,8	0,6 - 0,7	0,5 - 0,7	0,3 - 0,9
E1 - P1 (B)	13	9	69,2	0,5 - 0,8	0,6 - 0,9	0,7	0,2 - 0,7	0,6 - 0,9
E1 - P1 (C)	27	24	88,9	0,7 - 0,8	0,6 - 0,9	0,7 - 0,8	0,6 - 0,8	0,3 - 0,8
Poço Tubular Profundo								
P2	15	12	80,0	0,5 - 0,7	0,6 - 0,7	0,5-0,8	0,5 - 0,7	-
P3	6	4	66,7	0,6	0,4	-	0,5 - 0,7	0,6
P4	12	4	33,3	0,3 - 0,6	-	-	0,5	0,6
P5-8	9	2	22,2	0,7	0,4 - 0,6	0,5	0,4 - 0,5	0,4

* Concentrações em conformidade com o padrão estabelecido pela legislação estadual (faixa de 0,6 a 0,8 mg/L)

fluoreto pelo método potenciométrico com eletrodo combinado seletivo para flúor (Digimed, Modelo DEI-FL2), conforme procedimento padronizado ¹¹.

As informações contidas nas fichas de coleta das amostras de água e os resultados das análises laboratoriais foram compilados em uma planilha no Programa Microsoft Office Excel 2003. Os bairros correspondentes a cada um dos endereços registrados foram confirmados e/ou identificados por consulta a uma lista de logradouros e os sistemas de abastecimento de cada bairro foram determinados por consulta ao mapa de setorização do município disponível na rede mundial de computadores.

RESULTADOS

A identificação do sistema de abastecimento correspondente foi possível para 139 amostras de água analisadas no período de 2003 a 2007. Como pode ser observado na Tabela 1, concentrações de íons fluoreto em conformidade com o padrão estabelecido (0,6 a 0,8 mg/L) foram detectadas em 87 (62,6%) amostras e as proporções de amostras contendo estes níveis passou de 46,9% em 2003 para 71,9% em 2007. Concentrações inferiores e superiores ao padrão foram detectadas, respectivamente, em 40 (28,8%) e 12 (8,6%) amostras. Ao longo do período, as proporções de amostras com

menos de 0,6 mg/L variaram de 21,7 a 35,3%, enquanto concentrações superiores a 0,8 mg/L foram verificadas em 5,9 a 21,9% das amostras.

A Tabela 2 apresenta as proporções de amostras com concentrações de íons fluoreto em conformidade com o padrão estabelecido, assim como as variações entre as concentrações mínimas e máximas, detectadas de acordo com o sistema de abastecimento. Apenas 33,3% das amostras provenientes da E1, mas 60,9% das amostras da E2, apresentaram concentrações em conformidade com o padrão. A proporção de conformidade variou de 68,4 a 88,9% para as amostras de um mesmo sistema (E1 - P1) de acordo com o local de armazenamento da água (reservatórios A, B e C). Nos sistemas constituídos por poços, as proporções variaram de 22,2 (P5 - 8) a 80,0% (P2), sendo que o número de amostras analisadas de dois sistemas (P3 e P5-8) foi inferior aos demais. Grandes variações entre as concentrações mínimas e máximas de íons fluoretos ocorreram principalmente no sistema E1 em 2003 (0,1 a 1,1 mg/L) e em 2006 (0,04 a 0,7 mg/L). Estas concentrações foram mantidas em conformidade com o padrão em mais de um ano estudado (2003, 2005 e 2006) apenas entre as amostras derivadas do sistema E1 - P1 armazenadas no reservatório.

DISCUSSÃO

A manutenção das concentrações de íons fluoreto na água destinada ao consumo humano dentro dos padrões adequados é fundamental para a prevenção da cárie e da fluorose dentária². O controle diário e o monitoramento pelo menos mensal dessas concentrações, realizados respectivamente pela instituição responsável pelo abastecimento público de água e por instituição governamental, são recomendações emitidas pelas autoridades em saúde pública dos Estados Unidos da América do Norte¹². No Estado de São Paulo, o monitoramento laboratorial realizado dentro do PROÁGUA no período 1997-2003 mostrou um aumento da proporção de amostras de água com níveis de íons fluoreto em conformidade com o padrão estabelecido de 54,1% para 67,7%⁷. No presente estudo de um município da região centro-oeste do interior paulista, também foi constatado um aumento nesta proporção no período 2003-2007 (46,9% para 71,9%) e este resultado corrobora a importância das ações de vigilância para o desenvolvimento de uma importante medida em saúde pública.

As ações envolvidas na vigilância da qualidade da água destinada ao consumo humano são de grande complexidade e abrangência, sendo a elaboração de planos de amostragem particularmente difícil^{5,13}. Segundo as normas nacionais, as amostras devem ser coletadas em pontos de máxima representatividade da água fornecida à população e com distribuição uniforme ao longo do período, assim como em quantidade estatisticamente definida^{5,13}. Embora a quantidade de amostras analisadas possa ser considerada uma limitação do presente estudo, as concentrações mínimas e máximas de íons fluoreto detectadas revelaram a existência de algumas variações consideráveis em um mesmo e entre diferentes sistemas de abastecimento, sendo mais comum a concentração mínima não estar de acordo com a legislação. Embora não exposta ao risco de fluorose dentária, a população desse município pode ter sido privada dos benefícios totais do flúor na água para consumo humano.

Os resultados do presente estudo indicam a necessidade de elaboração de planos de amostragem individualizados para cada sistema de abastecimento de água existente, mas essa prática demandaria infraestrutura e capacidades instaladas geralmente inexistentes a nível municipal e/ou estadual. Considerando que o flúor não é dissipado ou acumulado ao longo da rede de distribuição¹⁴, uma estratégia operacionalmente mais viável para a vigilância das concentrações de íons fluoreto na água destinada ao consumo humano poderia ser a análise de amostras coletadas nos locais de adição dos compostos fluoretados e em pontos finais de consumo da água de cada sistema. Como sugerido pela Organização Mundial da Saúde¹⁴, as análises laboratoriais destinadas à vigilância poderiam ser realizadas com as mesmas amostras de água coletadas pelo operador do sistema quando do controle de qualidade da fluoretação e os resultados comparados por unidades laboratoriais distintas.

A operação e manutenção adequadas dos equipamentos utilizados no processo de fluoretação são fundamentais para garantir o fornecimento contínuo de água com concentrações ótimas de íons fluoreto¹⁴. Dessa forma, a detecção, prevenção e eliminação de fatores reais ou potenciais que podem comprometer esse fornecimento dependem essencialmente do controle de qualidade efetuado pelo fornecedor de água à população. De acordo com a legislação nacional, o responsável pela operação de sistema de abastecimento deve fornecer a

todos os consumidores informações sobre a qualidade da água, inclusive os resultados das análises laboratoriais de controle¹⁵. Além da otimização da vigilância, o cumprimento dessa medida legal também poderia contribuir consideravelmente na melhoria da qualidade da água destinada ao consumo humano.

CONCLUSÃO

O presente estudo corrobora com a importância do monitoramento constante das concentrações de íons fluoreto na água destinada ao consumo humano por instituição governamental para a melhoria da prevenção da cárie e da fluorose dentária, assim como indica a necessidade de elaboração de estratégia operacionalmente viáveis para o monitoramento da fluoretação da água em municípios com diferentes sistemas públicos de abastecimento de água para consumo humano.

REFERÊNCIAS

1. Garcia-Godoy F, Hicks J. Maintaining the integrity of the enamel surface. The role of dental biofilm, saliva and preventive agents in enamel demineralization and remineralization. *J Am Dent Assoc*. 2008;139(Suppl 5):25S-34S.
2. Ramires I, Buzalaf MAR. A fluoretação da água de abastecimento público e seus benefícios no controle da cárie dentária – cinquenta anos no Brasil. *Cienc Saúde Colet*. 2007;12(4):1057-65.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 635/BSB, de 26 de dezembro de 1975. Aprova normas e padrões sobre a fluoretação da água dos sistemas públicos de abastecimento, destinada ao consumo humano. [acesso 2009 set 21]. Disponível em: [http://www.cvs.saude.gov.br/busca_legis.asp].
4. São Paulo. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Resolução SS-250, de 15 de agosto de 1995. Define concentrações do íon fluoreto nas águas para consumo humano, fornecidas por sistemas públicos de abastecimento. *Diário Oficial [do] Estado de São Paulo*, São Paulo, SP, p.11, 16 ago. 1995, Seção 1.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº. 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativas ao controle e vigilância da qualidade da água para o consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. *Diário Oficial [da] União*, Brasília, p.266-70, DF, 26 mar. 2004. Seção 1.
6. Daré F, Sobrinho MD, Libânio M. Avaliação do processo de fluoretação nos sistemas de abastecimento de água da região de Araçatuba, São Paulo. *Eng Sanit Ambient*. 2009;14(2):173-82.
7. Pocol AP, Valentim LSO. Vigilância da qualidade da água para consumo humano no Estado de São Paulo. BEPA [Internet]. 2004;1(9):1-7. Disponível em: [http://www.cve.saude.sp.gov.br].
8. Amaral RC, Sousa MLR. Oito meses de heterocontrole da fluoretação das águas de abastecimento público de Piracicaba, São Paulo, Brasil. *Rev Odont Univ Cid SP*. 2007;19(2):131-6.
9. Lodi CS, Ramires I, Buzalaf MAR, Bastos JRM. Fluoride concentration in water at the area supplied by the water treatment station of Bauru, SP. *J Appl Oral Sci*. 2006;14(5):365-70.
10. Saliba NA, Moimaz SAS, Tiano AVP. Fluoride level in public water supplies of cities from the northwest region of São Paulo, Brazil. *J Appl Oral Sci*. 2006;14(5):346-50.
11. 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 21 set 2009]. Disponível em: [http://www.ial.sp.gov.br].
12. Centers for Disease Control and Prevention. Engineering and administrative recommendations for water fluoridation. *Morb Mortal Wkly Rep*. 1995;44(RR-13):1-40.
13. Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Dispõe sobre a Diretriz nacional do plano de amostragem da vigilância em saúde ambiental relacionada à qualidade da água para consumo humano. Brasília, DF, 2006.
14. Organización Panamericana de la Salud. La fluoruración del agua: un manual para operadores de planta de agua. Washington, D.C; 1997 [acesso 21 set 2009]. Disponível em: [http://www.paho.org/spanish/Hsp/HSO/doc098.pdf].
15. Brasil. Decreto nº. 5440, de 4 de maio de 2005. Estabelece definições e procedimentos sobre o controle de qualidade da água de sistema de abastecimento e institui mecanismos e instrumentos para divulgação de informação ao consumidor sobre a qualidade da água para consumo humano. *Diário Oficial [da] União*, Brasília, DF, 4 mai. 2005.

Teores de β -caroteno e vitamina C durante o amadurecimento da manga “UBÁ” (*Mangifera indica* L. var. Ubá)

β -carotene and vitamin C content during maturation of “UBÁ” mango (*Mangifera indica* L. var. Ubá)

RIALA6/1368

Gardênia Márcia Silva Campos MATA¹, Daniela da Silva OLIVEIRA², Ceres Mattos DELLA LUCIA³, Flávia Milagres CAMPOS⁴, José Humberto de QUEIROZ⁵, Helena Maria PINHEIRO-SANT’ANA^{3*}

*Endereço para correspondência: ³Departamento de Nutrição e Saúde, Universidade Federal de Viçosa, Av. Peter Henry Rolfs, s/n, Campus Universitário, Viçosa/MG, Brasil. CEP 36570-000. Tel.: +55 31 3899-3731. Fax: +55 31 3899-2541. E-mail: helenasantana@ufv.br.

¹Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa.

²Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa.

⁴Núcleo de Nutrição, Universidade Federal do Sergipe, Cidade Universitária Prof. José Aloísio de Campos.

⁵Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa.

Recebido: 13.06.2010 – Aceito para publicação: 30.06.2011

RESUMO

A manga Ubá é uma fruta de custo reduzido, amplamente cultivada na Zona da Mata Mineira e muito apreciada pelos consumidores. Com o objetivo de avaliar o conteúdo de antioxidantes naturais ao longo do amadurecimento da fruta, este trabalho quantificou o conteúdo de β -caroteno e vitamina C total (ácido ascórbico-AA e ácido desidroascórbico-ADA) na fruta *in natura* em três estádios de maturação: verde, parcialmente madura e madura. As análises foram feitas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). O conteúdo médio de β -caroteno foi maior na manga madura, seguido pela manga parcialmente madura e manga verde. Para AA e vitamina C total, ao contrário, observou-se maior conteúdo na manga verde, seguido pela fruta parcialmente madura e menor conteúdo na manga verde. Para ADA não foi observada diferença entre os estádios de maturação. A manga Ubá apresentou-se como uma excelente fonte de antioxidantes naturais, com teores de β -caroteno e vitamina C superiores aos comumente encontrados em outras variedades de manga, o que pode contribuir para atender boa parte das necessidades diárias de vitaminas A e C.

Palavras-chave. Ácido ascórbico, ácido desidroascórbico, β -caroteno, manga, estádios de maturação, CLAE.

ABSTRACT

Uba Mango is a fruit of low cost, widely grown in the Forest Area (*Zona da Mata Mineira*) – Minas Gerais, Brazil, and it is highly appreciated by consumers. To evaluate the natural antioxidants contents during the ripening of this fruit, the present study quantified the contents of β -carotene and total vitamin C (ascorbic acid – AA and dehydroascorbic – DHA) in fresh fruit at three ripening stages: unripe, partially ripe and ripe. Analyses were carried out by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The average contents of β -carotene were higher in ripe mango followed by partially ripe mango, and the unripe mango showed the lowest contents. On the contrary, the highest AA and total vitamin C contents were found in unripe mango, followed by the partially ripe fruit and ripe mango. No difference in DHA contents was found among the mango ripening stages. The Uba Mango showed to be a rich source of natural antioxidants, containing β -carotene and vitamin C contents higher than those commonly found in other varieties of mango, and being suitable to provide the daily requirement of vitamins A and C.

Keywords. ascorbic acid, dehydroascorbic acid, β -carotene, mango, stages of ripening, HPLC.

INTRODUÇÃO

Evidências científicas apontam que a mudança nos hábitos alimentares, com o incremento no consumo de frutas, hortaliças e grãos, constitui-se em uma estratégia importante para reduzir a incidência de doenças crônicas. Esses alimentos são fonte de antioxidantes naturais, como o β -caroteno e vitamina C, os quais atuam como agentes de prevenção¹.

O β -caroteno é um pigmento que possui atividade provitamínica A e contribui expressivamente com a adequação do consumo de vitamina A, já que essa vitamina é encontrada apenas em produtos de origem animal. A vitamina C, por sua vez, é um termo utilizado para todos os componentes que exibem atividade biológica de ácido L-ascórbico (AA). O AA é reversivelmente oxidado a ácido L-desidroascórbico (ADA), que também exibe atividade biológica. Ambos os componentes, vitamina C e β -caroteno, são efetivos na proteção do DNA, do LDL e das proteínas contra o dano oxidativo².

A manga Ubá (*Mangifera indica* L. var. Ubá) é uma fruta de custo reduzido e amplamente cultivada na Zona da Mata mineira. Algumas vantagens fundamentais, tais como sua polpa macia, firme, doce, succulenta e quase sem fibras; a manutenção da coloração amarelo-claro após o processamento; a viscosidade apropriada para o consumo; e a conservação do *flavor* a tornam muito utilizada na indústria de sucos naturais e também muito apreciada pelos consumidores³.

Alterações no conteúdo de vitaminas e carotenoides em frutas podem ocorrer devido a diferentes condições de cultivo e à medida em que ocorre o amadurecimento⁴. A preferência dos consumidores quanto ao estágio de maturação de mangas é um fator que provavelmente afeta o nível de ingestão dietética de β -caroteno e vitamina C.

Em relação à manga Ubá, não existem estudos que relatam a magnitude da variação do conteúdo de carotenoides e vitamina C ao longo de sua maturação. Assim, este trabalho investigou o conteúdo de β -caroteno e vitamina C total (AA e ADA) de manga Ubá em três estádios de maturação.

MATERIAL E MÉTODOS

Matéria-prima, caracterização dos estádios de maturação e preparo das amostras

As mangas (*Mangifera indica* L. var. Ubá) foram coletadas manualmente, em janeiro de 2006, de uma

plantação comercial localizada no município de Visconde do Rio Branco, na Zona da Mata Mineira. Essa região possui clima tropical típico, com temperatura média anual de 23,9 °C e altitude de 352 m.

Três estádios de maturação da fruta foram definidos de forma subjetiva (coloração da casca e polpa)⁵ e de acordo com o teor de sólidos solúveis totais. O estágio de maturação verde foi considerado para cor da casca 100% verde e cor da polpa em tom creme. O teor de sólidos solúveis para a manga verde variou de 7,9 a 9,9 °Brix. Para a manga Ubá caracterizada como parcialmente madura, a casca apresentou-se 50% verde-claro/amarelo com alguns pontos pretos. A polpa apresentou cor amarela e o teor de sólidos solúveis variou de 13,5 a 19,2 °Brix. Para a manga madura, foi considerada cor da casca 100% laranja com muitos pontos pretos e cor da polpa laranja. O teor de sólidos solúveis variou entre 20,6 a 24,3 °Brix. A determinação dos sólidos solúveis totais foi feita por meio de um refratômetro manual (LEICA, modelo AR-200 DIGITAL), sendo a amostra macerada manualmente e uma alíquota do extrato utilizada para a leitura expressa em graus Brix.

Foram analisadas quatro unidades amostrais para cada estágio de maturação. As frutas foram despulpadas, homogeneizadas e 1 g e 3 g de polpa foram utilizados para análise de vitamina C e β -caroteno, respectivamente.

Determinação de β -caroteno

Para extração de β -caroteno, a amostra foi misturada com 60 mL de acetona (Proquimius, Brasil) refrigerada. O material foi filtrado a vácuo em funil de büchner utilizando-se papel de filtro. Em seguida, o filtrado foi transferido para um funil de separação, onde foram adicionados 50 mL de éter de petróleo refrigerado, para a transferência dos pigmentos da acetona para o éter. Cada fração foi lavada com água destilada 3 vezes para retirar toda a acetona. A concentração do material foi feita por evaporação do extrato em éter de petróleo usando evaporador rotativo em temperatura de 35 °C. Os pigmentos foram, então, redissolvidos em quantidade conhecida de éter de petróleo (25 mL) e armazenados em frascos de vidro âmbar a 5 °C, até a análise⁶. Uma alíquota de 2 mL da amostra foi seca em nitrogênio líquido e ressuspensa em igual volume de acetona. Posteriormente, este material foi filtrado em unidades filtrantes com 0,45 μ m. A fase móvel usada foi uma solução de metanol (Tedia, USA), acetato de etila (Mallinckrodt, USA) e acetonitrila (Tedia, USA) (50:40:10), a um fluxo de 1,5 mL/minuto, em gradiente

isocrático. O tempo de corrida foi de aproximadamente 9 minutos⁷. O valor de vitamina A foi calculado segundo as recomendações do Institute of Medicine⁸, em que 1 Equivalente de Atividade de Retinol (RAE) equivale a 1 μ g de retinol ou 12 μ g de β -caroteno. Para a extração, foram utilizados reagentes com grau de pureza para análise.

Determinação de vitamina C

As condições para extração e quantificação da vitamina C foram baseadas em Campos et al.⁹. Alíquotas de polpa de manga foram homogeneizadas em 15 mL de solução extratora contendo 3% de ácido metafosfórico (Merck, Alemanha), 8% de ácido acético (Vetec, Brasil), 0,3 N de ácido sulfúrico (Mallinckrodt, USA) e 1 mM de EDTA, sendo a amostra triturada em microtritador por 5 minutos. O material foi filtrado e diluído com água ultrapura para um volume de 25 mL. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a uma velocidade de 4000 rpm (1789 g; raio do rotor igual a 100 mm) durante 30 minutos e o sobrenadante foi condicionado, em frascos âmbar, sob refrigeração até o momento da análise. A redução do ADA a AA foi realizada conforme metodologia proposta por Campos et al.⁹, sendo o conteúdo de ADA calculado por diferença entre o conteúdo de vitamina C total (após redução do ADA) e o conteúdo de AA inicial. Uma alíquota do extrato foi filtrada em unidades filtrantes. A fase móvel foi composta por água ultrapura contendo 1 mM de fosfato de sódio monobásico (Synth, Brasil), 1 mM de EDTA e pH ajustado para 3,0 com ácido fosfórico (Proquímios, Brasil). O fluxo foi de 1,0 mL/minuto e o tempo de corrida de, aproximadamente, 5 minutos.

Condições cromatográficas

As análises foram feitas utilizando sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), Shimadzu, munido de bomba de alta pressão, modelo

LC-10AT VP; injetor automático com *loop* de 50 μ L, modelo SIL-10AF; detector de arranjo de diodos modelo SPD-M10A; software *Multi System* modelo Class VP 6.12, para controle de até 4 sistemas; coluna cromatográfica Phenomenex ODS (C18), 4 mm x 3 mm para análise β -caroteno e coluna Lichospher (Merck, Alemanha), 100 RP-18, 250 x 4 mm para análise de vitamina C.

Os cromatogramas foram obtidos a 450 nm para análise de β -caroteno e a 245 nm para análise de vitamina C. A identificação dos componentes nas amostras de manga foi feita comparando-se os tempos de retenção obtidos para os padrões e para as amostras, analisados sob as mesmas condições e por co-cromatografia. Além disso, foram comparados os espectros de absorção dos padrões e dos picos de interesse nas amostras, utilizando o detector de arranjos de diodos.

A construção das curvas analíticas de β -caroteno ($R^2 = 0,99$) e AA ($R^2 = 0,99$) foi realizada de acordo com a concentração dos componentes nas frutas. Para construção das curvas analíticas utilizou-se padrões comerciais de AA (Vetec, Brasil) e β -caroteno (BASF, Brasil).

Análise Estatística

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com três tratamentos (estádios de maturação) e quatro repetições. Aplicou-se a Análise de Variância (ANOVA) e o Teste de Duncan para verificar a diferença entre os tratamentos realizados ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS

As condições de extração e análise utilizadas resultaram em completa resolução dos componentes analisados, o que permitiu uma quantificação confiável de β -caroteno e AA (Figura 1).

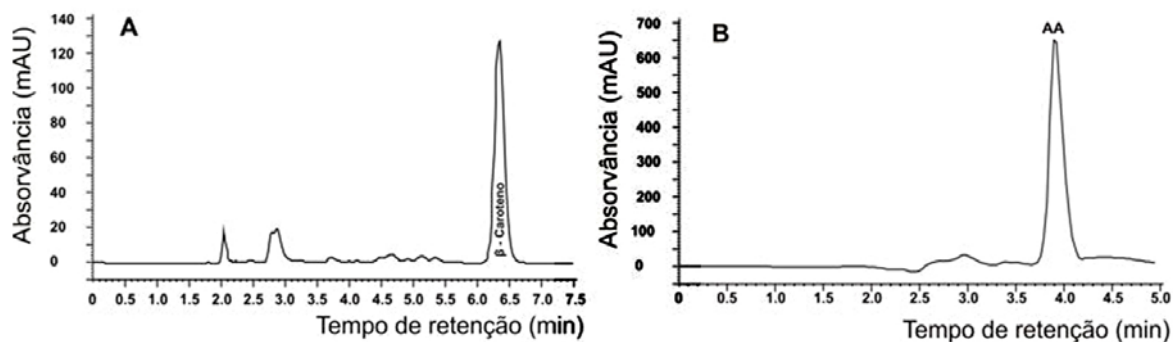


Figura 1. Perfil cromatográfico típico da análise de β -caroteno e ácido ascórbico (AA) em manga Ubá. Condições cromatográficas: descritas em Material e Métodos

Tabela 1. β -caroteno, RAE (Equivalente de Atividade de Retinol), ácido ascórbico (AA), ácido desidroascórbico (ADA) e Vitamina C total em manga Ubá em três estádios de maturação (dados expressos em matéria fresca)

Estádios de maturação	Conteúdo médio \pm desvio-padrão				
	β -caroteno ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	RAE ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	AA (mg/100g)	ADA (mg/100g)	Vitamina C total (mg/100g)
Verde	1062,33 \pm 86,33 c	88,53 \pm 7,20 c	161,74 \pm 17,99 a	33,37 \pm 7,99 a	195,12 \pm 22,99 a
Parcialmente madura	2505,26 \pm 516,50b	208,77 \pm 43,04 b	138,96 \pm 14,43 b	23,81 \pm 7,97 a	162,77 \pm 17,92 b
Madura	3573,18 \pm 626,77 a	297,76 \pm 52,23 a	128,63 \pm 15,11 c	22,90 \pm 6,75 a	151,53 \pm 16,87 c

Teste de Duncan (letras diferentes na coluna denotam diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$)).

Observou-se aumento do conteúdo de β -caroteno à medida que a fruta amadureceu, sendo que o conteúdo médio de β -caroteno na manga madura foi aproximadamente 3,4 vezes maior que na manga verde e 1,4 vezes maior que na manga parcialmente madura (Tabela 1).

Ao contrário, para β -caroteno observou-se um decréscimo no conteúdo de AA, com o avanço do amadurecimento. O conteúdo médio de AA na manga verde foi aproximadamente 1,2 vezes maior que na manga parcialmente madura e 1,3 vezes maior que na manga madura. Essa diferença não foi encontrada entre os conteúdos de ADA nos três estádios de maturação da manga Ubá, sendo que os percentuais de ADA encontrados em relação à vitamina C total foram 17,0% na manga verde, 14,5% na fruta parcialmente madura e 15,1% na madura (Tabela 1).

O valor de vitamina A e o conteúdo de vitamina C da manga nos três estádios de maturação apresentaram comportamento semelhante ao β -caroteno e AA, respectivamente. Houve incremento de 236,3% no valor de vitamina A e decréscimo de 22,3% no conteúdo de vitamina C ao longo da maturação (Tabela 1).

DISCUSSÃO

O conteúdo de β -caroteno e de AA da manga Ubá foi bastante superior em todos os estádios de maturação quando comparado a outras variedades de manga. Mangas verdes da variedade Keitt apresentaram média de 170 $\mu\text{g}/100\text{g}$ de β -caroteno e mangas Tommy Atkins 200 $\mu\text{g}/100\text{g}$ ¹⁰ enquanto a manga Ubá verde apresentou cerca de 5 vezes mais. Mesmo após o amadurecimento, as mangas Keitt e Tommy Atkins apresentaram 670 e 580 $\mu\text{g}/100\text{g}$ de β -caroteno, respectivamente¹⁰, enquanto a manga Ubá apresentou conteúdo 5,3 e 6,1 vezes maior

em relação ao conteúdo das variedades Keitt e Tommy Atkins, respectivamente. A manga Ubá analisada no presente estudo também apresentou entre duas e nove vezes mais AA que as variedades Keitt¹¹, Haden e Tommy Atkins¹².

Fatores como o grau de maturação, tipo de solo, condições de cultivo, condições climáticas, variedade dos vegetais, parte da planta analisada, efeito dos agrotóxicos, exposição à luz solar, condições de processamento e estocagem contribuem para os diferentes conteúdos de β -caroteno e vitamina C encontrados^{6,13,14}. Vinci et al.¹⁵, por exemplo, encontraram perda substancial de AA com o amadurecimento da manga na ordem de 40,4%.

Destaque é dado ao valor nutricional da manga Ubá, sendo que uma ou duas porções de manga contribuem de forma significativa na ingestão de vitamina A, dependendo do estágio de maturação, o que pode ser visto na Tabela 1 a partir dos valores de RAE. Para que as recomendações diárias de vitamina A sejam atingidas em todas as faixas etárias e em ambos os sexos, há necessidade de 3 a 4 unidades da fruta madura ao longo do dia⁸. Em contrapartida, a ingestão de uma porção média de 100 g (1 unidade) de manga em qualquer um dos três estádios de maturação é capaz de atingir mais de 100% das recomendações de vitamina C para homens e mulheres de todas as faixas etárias⁹. Ressalta-se, entretanto, que o consumo de manga verde e até mesmo parcialmente madura é bastante incomum em nosso meio, o que faz com que a fruta não seja consumida com todo o seu teor potencial de vitamina C.

CONCLUSÃO

Com o avanço do amadurecimento da manga Ubá, o teor de vitamina C total reduziu aproximadamente 22% e o de β -caroteno aumentou mais de 200%.

Observou-se que o conteúdo de β -caroteno e de vitamina C total na manga Ubá foi bastante elevado quando comparado a outras variedades de manga, sendo que a ingestão de 3 a 4 unidades da fruta madura e de 1 unidade de manga em qualquer um dos três estádios de maturação contribui para atender às necessidades diárias de vitamina A e C, respectivamente.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao produtor da região de Visconde do Rio Branco/MG pela concessão das frutas e à FAPEMIG pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. He F, Nowson C, Lucas M, Macgregor G. Increased consumption of fruit and vegetables is related to a reduced risk of coronary heart disease: Metaanalysis of cohort studies. *J Hum Hypertens*. 2007;21(9):717-82.
2. Laur LM, Tian L. Provitamin A and vitamin C contents in selected California-grown cantaloupe and honeydew melons and imported melons. *J Food Comp Anal*. 2011;24(2):194-201.
3. Gonçalves NB. Caracterização física e química dos frutos de cultivares de mangueira (*Mangifera indica* L.). *Ciênc Agrotecnol*. 1998;22(1):72-8.
4. Rodriguez-Amaya DB. Some considerations in generating carotenoid data for food composition tables. *J Food Comp Anal*. 2000;13(4):641-47.
5. Li Z, Wang N, Raghavan VGS, Vigneault C. Ripeness and rot evaluation of 'Tommy Atkins' mango fruit through volatiles detection. *J. Food Eng*. 2009;91(2):319-34.
6. Rodriguez DB, Raymundo LC, Lee TS, Simpson KL, Chichester CO. Carotenoid pigment changes in ripening *Momordica charantia* fruits. *Ann Bot*. 1976;40:615-24.
7. Pinheiro-Sant'ana HM, Stringheta PC, Brandão SCC, Azeredo RMC. Carotenoid retention and vitamin A value in carrot (*Daucus carota* L.) prepared by food service. *Food Chem*. 1998; 61(1-2):145-51.
8. IOM. Institute of Medicine. National Academy of Science, Food and Nutrition Board. Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. Dietary Reference Intakes: vitamins. Washington, D.C., National Academy Press, 2001. [acesso 26 fev 2010]. Disponível em: [http://fnic.nal.usda.gov/nal_display/index.php?info_center=4&tax_level=3&tax_subject=256&topic_id=1342&level3_id=5140].
9. Campos FM, Ribeiro SMR, Della Lucia CM, Stringheta PC, Pinheiro-Sant'ana HM. Optimization of methodology to analyze ascorbic and dehydroascorbic acid in vegetables. *Quim Nova*. 2009; 32(1):87-91.
10. Medlicott AP, Thompson AK. Analysis of sugars and organic acids in ripening mango fruits (*Mangifera indica* L. Keitt) by high performance liquid chromatography. *J Sci Food Agric*. 1985;36(7):561-6.
11. Hernández Y, Lobo MG, González M. Determination of vitamin C in tropical fruits: a comparative evaluation of methods. *Food Chem*. 2005;96(4):654-64.
12. Ribeiro SMR, Queiroz JH, Queiroz MELR, Campos FM, Pinheiro-Sant'ana MH. Antioxidant in Mango (*Mangifera indica* L.) Pulp. *Plant Foods Hum Nutr*. 2007;62(1):13-7.
13. Lee CY, Massey LMJR, Van Buren JP. Effects of postharvest handling and processing on vitamin contents of peas. *J Food Sci*. 1982; 47(3):961-4.
14. Howard LR, Smith RT, Wagner AB, Villalon B, Burns EE. Provitamin A and ascorbic acid content of fresh pepper cultivars (*Capsicum annuum*) and processed jalapenos. *J Food Sci*. 1994; 59(2):362-5.
15. Vinci G, Botrè F, Mele G. Ascorbic acid in exotic fruits: a liquid chromatographic investigation. *Food Chem*. 1995;53(2):211-4.

Avaliação da adequação às boas práticas em unidades de alimentação e nutrição

Evaluation of good practices procedures in food services

RIALA6/1369

Míriam Almeida FERREIRA¹, Jackline Freitas Brilhante de SÃO JOSÉ², Ana Paula Batista TOMAZINI¹, Hércia Stampini Duarte MARTINI¹, Regina Célia de Miranda MILAGRES¹, Helena Maria PINHEIRO-SANT'ANA^{1*}

*Endereço para correspondência: ¹ Departamento de Nutrição e Saúde, Universidade Federal de Viçosa, Av. Peter Henry Rolfs, s/n, Campus Universitário, Viçosa/MG, Brasil. CEP 36570-000. E-mail: helenasantana@ufv.br.

² Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa.

Recebido: 11.07.2010 – Aceito para publicação: 09.05.2011

RESUMO

Com o objetivo de avaliar a adoção das boas práticas foi realizado um estudo transversal em nove Unidades de Alimentação e Nutrição (UAN), aplicando-se a lista de verificação proposta pela Resolução RDC 275/2002. Cinco blocos de perguntas foram utilizados para avaliação, no total de 157 itens referentes às 'edificação e instalações'; 'equipamentos, móveis e utensílios'; 'manipuladores'; 'produção e transporte dos alimentos'; e 'documentação'. As UAN foram classificadas em grupos segundo os critérios estabelecidos no item D da RDC 275/2002 (Grupo 1: 76 a 100% de adequação; Grupo 2: 51 a 75%; Grupo 3: 0 a 50%). Avaliou-se, ainda, a adequação de itens considerados imprescindíveis para a qualidade sanitária dos alimentos, tais como lavatórios exclusivos para higienização das mãos instalados na área de manipulação de alimentos e adoção de medidas para minimizar o risco de contaminação cruzada. Das UAN avaliadas, 88,9% (n = 8) foram classificadas no Grupo 1. Os blocos referentes a 'manipuladores' e 'produção e transporte dos alimentos' atingiram, respectivamente, 97,6% e 84,7% de adequação. A maioria dos itens imprescindíveis obteve adequação de 88,9 a 100%. Apesar da boa classificação geral das UAN, foram detectadas falhas nos itens relativos a 'edificação e instalações' e 'equipamentos, móveis e utensílios'.

Palavras-chave. lista de verificação, segurança alimentar, qualidade de alimento, legislação de alimentos.

ABSTRACT

Aiming at evaluating the good practices, a cross-sectional study was conducted in nine Food Services (FS) by applying a checklist based on the legislation in force (RDC 275/2002). Five blocks of questions were asked, totaling 157 items related to 'building and facilities'; 'equipment', 'furniture and utensils'; 'manipulators'; 'food production and transport'; and 'documentation'. The FS were classified into groups according to the criteria established in section D of the RDC 275/2002 (Group 1: 76 to 100% of adequacy, Group 2: 51 to 75%, Group 3: 0 to 50%). The adequacy of the essential items for foods sanitary quality was also assessed, such as the exclusive sinks installed for hand hygiene in the area of food handling and the use of measures to minimize the risk of cross contamination. Of the FS assessed in this study, 88.9% (n = 8) were classified into Group 1. The blocks related to 'handlers' and 'production and transportation of food' reached 97.6% and 84.7% of adequacy, respectively. Mostly of essential items showed adequacy from 88.9 to 100%. Despite of the overall FS was satisfactorily classified, some lacks were detected and related to the 'building and facilities' and 'equipment, furniture and utensils' items.

Keywords. checklist, food safety, food quality, food legislation.

INTRODUÇÃO

O estilo de vida atual contribui para o aumento da procura por serviços de alimentação em todo o mundo, principalmente em países em desenvolvimento¹. Em 2009, o setor de alimentação coletiva forneceu 8,5 milhões de refeições/dia, proporcionou 180 mil empregos diretos, consumiu diariamente 3,6 mil toneladas de alimentos e teve um faturamento que chegou a 9,8 bilhões de reais². Com o aumento no número de refeições oferecidas fora do lar, torna-se maior a preocupação com a qualidade dos alimentos para garantir a saúde dos usuários. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, milhões de pessoas são diretamente afetadas por doenças de origem alimentar (DOA) em todo o mundo³. O Comitê da WHO/FAO reconheceu que as doenças causadas pelo consumo de alimentos contaminados são, possivelmente, o maior problema de saúde no mundo contemporâneo⁴.

Nas Unidades de Alimentação e Nutrição (UAN), os alimentos podem estar mais susceptíveis a diversos riscos de contaminações por micro-organismos associados à manipulação e aos procedimentos incorretos durante o processamento e distribuição. Para garantir alimentos mais seguros, têm sido usadas ferramentas como as boas práticas e análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC)⁵.

Dentro desse contexto, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou a RDC 275, de 2002⁶, com objetivo de estabelecer os Procedimentos Operacionais Padronizados que contribuam para a garantia das condições higiênico-sanitárias necessárias ao processamento/industrialização de alimentos, em complemento às Boas Práticas de Fabricação. Em 2004, foi aprovada a Resolução RDC 216, que visa estabelecer procedimentos de boas práticas para serviços de alimentação a fim de garantir as condições higiênico-sanitárias do alimento preparado. As determinações contidas nessas Resoluções visam nortear os responsáveis a proceder de maneira adequada e segura, desde a construção da UAN até a distribuição das refeições⁷.

A garantia da segurança dos alimentos vem compondo planos estratégicos de governos; assim, estudos sobre condições higiênicas e práticas de manipulação e preparo de alimentos são conduzidos em todo o mundo. Diante da importância do tema para a saúde de coletividades, o presente estudo visou diagnosticar as condições físicas e higiênico-sanitárias de nove UAN institucionais geridas por uma concessionária de refeições, avaliando o atendimento às Boas Práticas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado no período de janeiro a março de 2006 um estudo transversal em nove UAN de pequeno e médio portes, localizadas na região metropolitana de Belo Horizonte (BH), Minas Gerais, que juntas forneciam 3.425 refeições por dia. A amostra foi escolhida aleatoriamente e correspondeu a 45% do total de UAN (n=20) administradas por uma concessionária de refeições.

Para a avaliação, utilizou-se a lista de verificação proposta no Anexo II da Resolução RDC 275/2002⁶, dividida em três partes: identificação da empresa, avaliação e classificação do estabelecimento. Cinco blocos de perguntas, de acordo com a RDC 275/2002, foram avaliados em cada UAN, totalizando 157 itens, conforme a seguir: 'edificação e instalações' (79 itens); 'equipamentos, móveis e utensílios' (21 itens); 'manipuladores' (14 itens); 'produção e transporte dos alimentos' (28 itens); 'documentação' (15 itens). A avaliação foi realizada por pesquisador treinado através de observação direta. Cada item contou com três possibilidades de resposta: 'Sim', 'Não' e 'Não se aplica' (NA). A classificação de cada UAN seguiu os critérios de pontuação estabelecidos no item D da RDC 275/2002⁶, a saber: Grupo 1 (76 a 100% de atendimento dos itens), Grupo 2 (51 a 75% de atendimento dos itens) e Grupo 3 (0 a 50% de atendimento dos itens). Classificou-se também cada um dos cinco blocos da lista de verificação de acordo com esse critério. Realizou-se, ainda, a avaliação de onze dos dezoito itens propostos por Badaró⁸ como 'imprescindíveis' para a qualidade e segurança sanitária dos alimentos.

Os dados foram armazenados em planilhas do Microsoft Excel e Epi Data e analisados de forma descritiva, com auxílio do software Epi-Info versão 6.0⁹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização e adequação geral das UAN

Das nove unidades pesquisadas, seis foram inauguradas há dez anos ou mais, e as demais realizaram algum tipo de reforma.

O atendimento nessas UAN era do tipo *self-service* porcionado em 88,9% (n = 8) e 77,8% das unidades (n = 7) eram de pequeno porte, servindo até 500 refeições.

Em relação ao atendimento às boas práticas, a porcentagem de adequação das UAN variou de 72,9% a 92,6%, de acordo com o critério de classificação estabelecido pela RDC nº 275/2002⁶.

Das nove UAN avaliadas, apenas uma foi classificada no Grupo 2, com 72,9% de adequação, e as demais foram classificadas no Grupo 1. A adequação às boas práticas nas UAN avaliadas neste estudo foi superior àquelas encontradas por outros pesquisadores^{8,10}. São José e Pinheiro-Sant'Ana¹¹ avaliaram uma unidade de alimentação escolar na qual não havia nutricionista e registraram apenas 16,37% dos itens avaliados como adequados. Panza et al.¹² relacionaram a baixa conformidade dos itens com a monitoração deficiente, pois o responsável provavelmente não tinha informação adequada em relação às práticas de manipulação dos alimentos. Neste sentido, parece haver interferência negativa da ausência do responsável técnico para o cumprimento das boas práticas. No presente estudo, a alta adequação apresentada pelas UAN pode ter sido devida à presença do profissional nutricionista que, dentre outras atividades, realiza a orientação e supervisão das atividades, a capacitação dos funcionários e o gerenciamento das etapas que envolvem a produção segura dos alimentos.

Adequação das UAN por Blocos

A maioria das UAN, considerando os diferentes blocos, foi classificada no Grupo 1 e 2, sendo que apenas para o bloco de documentação encontrou-se 11,1% das unidades no Grupo 3 (Figura 1).

Edificações e Instalações

Neste bloco, sete dos estabelecimentos foram classificados no Grupo 1 e os demais no Grupo 2. O percentual de adequação às boas práticas variou entre 63,9% e 86,1%. A edificação e as instalações devem ser projetadas de forma a possibilitar um fluxo ordenado e sem cruzamentos em todas as etapas da preparação

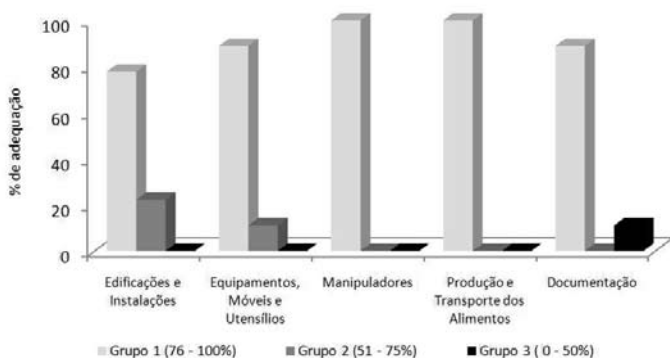


Figura 1. Percentual de adequação de nove UAN institucionais da região metropolitana de Belo Horizonte de acordo com o critério de classificação estabelecido pela RDC nº 275/2002

de alimentos e a facilitar as operações de manutenção, limpeza e, quando for o caso, desinfecção. Sabe-se que o acesso às instalações deve ser controlado e independente e não comum a outros usos⁷. Nas unidades estudadas, a adoção dessas determinações implicou em melhor adequação aos itens deste bloco e, conseqüentemente, contribuição para produção de refeições mais seguras. Legnani et al.¹³ consideraram que conformidades em relação às características estruturais são conseqüências da adoção de medidas corretivas após a aplicação de monitoramento nos estabelecimentos. Bas et al.⁵ reforçam que estruturas bem planejadas e equipamentos adequados protegem os alimentos, mantêm condições higiênicas e melhoram aspectos de limpeza e controle de pragas no estabelecimento.

Os itens que apresentaram maior inadequação foram os pisos (37,0%), teto (38,9%), paredes (29,6%), portas (51,8%) e manejo de resíduos (29,6%). Essas inconformidades incluíram materiais de revestimento inadequados, porosidade, pisos sem resistência, derrapantes e sem drenagem para água. Além disso, as portas apresentavam fechamento não automático, não havia barreiras físicas para vetores e pragas urbanas e não existia área adequada para estocagem dos resíduos. Assim, como no presente estudo, inadequações também foram encontradas na estrutura física por outros pesquisadores¹⁴.

Equipamentos, Móveis e Utensílios

O percentual de adequação nesse bloco variou de 71,4% a 90,5%, sendo uma das UAN classificadas no Grupo 2 e as demais no Grupo 1. Das inadequações encontradas nos equipamentos (12,5%), os problemas mais frequentes foram relacionados aos equipamentos de conservação dos alimentos que não apresentavam medidor de temperatura ou não estavam em adequado estado de funcionamento, assim como a inexistência de registros de manutenção preventiva dos equipamentos, os quais só possuíam manutenção corretiva. Legnani et al.¹³ também registraram ausência de termômetros em refrigeradores de alguns estabelecimentos estudados. A ausência de controle de temperatura em equipamentos de armazenamento de alimentos constitui um risco para a qualidade do produto final.

Para os utensílios, as inadequações (11,1%) foram devidas à falta de local adequado para o armazenamento e de proteção contra contaminação. No item higienização, o que contribuiu para a inadequação (12,0%) foi a falta de registros de higienização. Os altos percentuais de adequação registrados para vários itens deste bloco são de

Tabela 1. Porcentagem de atendimento a onze dos itens considerados imprescindíveis, segundo Badaró⁸, para garantir a segurança dos alimentos em UAN institucionais da região metropolitana de Belo Horizonte, MG

Variável	Itens considerados Imprescindíveis	Adequação (%)
Edificações e Instalações	Ausência de focos de insalubridade (imediações, local e dependências anexas limpas; ausência de objetos em desuso e animais domésticos; ausência de insetos e roedores).	88,9
	Luminárias localizadas sobre a área de preparação dos alimentos protegidas contra explosão ou queda acidental.	55,5
	Água potável originada de rede pública, poço raso ou poço fundo tratada.	100,0
	Instalações sanitárias e vestiários sem comunicação direta com área de preparação e armazenamento de alimentos ou salões de refeição.	100,0
	Instalações sanitárias dotadas de lavatórios, com acessórios para higienização das mãos (sabonete líquido antisséptico ou sabonete líquido e produto antisséptico e toalhas de papel não reciclado).	100,0
	Lavatórios exclusivos da área de manipulação dotados de acessórios para higienização das mãos (sabonete líquido antisséptico ou sabonete líquido e produto antisséptico e toalhas de papel não reciclado).	88,9
Equipamentos, Móveis e Utensílios	Utensílios utilizados na higienização das instalações distintos daqueles usados para higienização das partes dos equipamentos e utensílios que entrem em contato com o alimento.	88,9
	Edificação, instalações, equipamentos, móveis e utensílios livres da presença ou indício da presença de vetores e pragas urbanas.	88,9
Manipuladores	Ausência de lesões e/ou sintomas de enfermidades que possam comprometer a qualidade higiênico-sanitária dos alimentos, ou, quando existir, que eles estejam afastados da atividade de preparação dos alimentos enquanto persistirem essas condições de saúde.	100,0
Produção e Transporte de Alimentos	Durante a preparação dos alimentos são adotadas medidas a fim de minimizar o risco de contaminação cruzada, evitando contato direto ou indireto entre alimentos crus, semipreparados e prontos para o consumo.	66,6
	Alimentos submetidos à cocção e prontos para consumo mantidos em temperaturas superiores a 60°C por, no máximo, 6 horas.	100,0

grande importância para qualidade da refeição preparada, no sentido de que equipamentos, móveis e utensílios podem entrar em contato direto com os alimentos e se tornarem fonte de contaminação para os alimentos¹⁴.

Manipuladores

Neste bloco, a adequação foi de 85,7 a 100%, sendo todas as unidades classificadas no Grupo 1, o que é um excelente resultado diante do fato de que os manipuladores de alimentos têm um importante papel na prevenção das toxinfecções alimentares e das demais DOA. Observou-se 100% de adequação para o item relacionado ao uso de equipamentos de proteção individual. Resultado semelhante foi encontrado por Bas et al.⁵, que verificaram adequação de 82,9% para o mesmo item.

Em relação aos hábitos higiênicos dos manipuladores, que corresponderam a 7,4% das não conformidades, essas podem estar relacionadas à inadequada frequência da higienização das mãos, além da forma incorreta de higienizá-las. Os manipuladores são fontes potenciais de contaminação caso ocorram falhas durante o preparo, sendo uma das mais frequentes vias de transmissão de microorganismos aos alimentos⁶.

Produção e Transporte dos Alimentos

No presente estudo, a adequação para este bloco variou de 77,3% a 90,9% de adequação, sendo classificadas todas as UAN no Grupo 1. Os itens que apresentaram maior porcentagem de não conformidade foram rotulagem e armazenamento do produto final (22,2%) e controle de

qualidade do produto final (33,3%) devido à falta de análise do produto final e falta de laudos laboratoriais atestando o seu controle. Tal situação foi mais crítica no estudo de Mata et al.¹⁰, onde 100% dos estabelecimentos foram classificados no Grupo 3. A resolução RDC 216/2004⁷ preconiza que o estabelecimento produtor e distribuidor de alimentos deve implementar e manter documentado o controle e a garantia da qualidade dos alimentos preparados.

Documentação

Neste bloco, a adequação das UAN apresentou uma ampla variação, entre 6,7% e 100%. Oito das UAN institucionais estudadas apresentaram a documentação adequada, incluindo-se no Grupo 1. Como preconiza a legislação, os serviços de alimentação devem contar com documentação referente à elaboração e implementação das boas práticas a fim de garantir as condições higiênico-sanitárias do alimento preparado⁷.

Quanto aos Procedimentos Operacionais Padronizados (POP), ocorreram algumas não conformidades como a não utilização do POP ou a sua inexistência. Destaca-se o POP 'Controle da Potabilidade da Água', onde duas UAN não possuíam arquivos dos registros de higienização da caixa-d'água e laudos periódicos da análise da água. O grande número de itens adequados em relação à legislação remete a uma maior garantia de qualidade higiênico-sanitária dos alimentos preparados nestes estabelecimentos.

Itens Imprescindíveis

Na avaliação dos itens considerados imprescindíveis para garantir a segurança dos alimentos, observou-se que a lista de verificação utilizada por este estudo contempla doze dos dezoito itens propostos por Badaró⁸. A maioria dos itens imprescindíveis obteve adequação de 88,9 a 100% (Tabela 1).

Contudo, dois itens imprescindíveis apresentaram menores adequações: 'Luminárias localizadas sobre a área de preparação dos alimentos estão protegidas contra explosão ou queda acidental' (55,5%) e 'Durante a preparação dos alimentos são adotadas medidas a fim de minimizar o risco de contaminação cruzada, evitando contato direto ou indireto entre alimentos crus, semipreparados e prontos para o consumo' (66,6%). Tais aspectos devem ser corrigidos para melhorar a segurança dos alimentos.

A implementação eficaz das boas práticas nas UAN depende da adequação das condições de edificação, instalações, equipamentos, móveis e utensílios, além

da correção dos outros itens não conformes e do envolvimento dos responsáveis e demais colaboradores dos estabelecimentos. Estudos sugerem que práticas inadequadas dos manipuladores contribuem com desenvolvimento de aproximadamente 97% dos casos de DOA em estabelecimentos produtores de alimentos¹⁴. Seaman e Eves¹⁵ verificaram que administradores de estabelecimentos produtores de alimentos estão cientes da responsabilidade em treinar os manipuladores, mas frequentemente não têm suporte necessário para garantir que estes tenham práticas adequadas de manipulação de alimentos. A realização frequente de cursos de capacitação e orientação continuada nos locais de trabalho para que os funcionários conheçam e cumpram as condutas torna-se uma medida essencial para garantir as boas práticas.

CONCLUSÃO

Das UAN avaliadas, 88,9% (n = 8) foram classificadas no Grupo 1 (75 a 100% de adequação), sendo que apenas um estabelecimento foi classificado no Grupo 2 (51 a 75% de adequação). Os blocos 'manipuladores' e 'produção e transporte dos alimentos' atingiram adequações superiores a 90%. Apesar da boa classificação geral das UAN, detectaram-se falhas nos blocos 'edificação e instalações' e 'equipamentos, móveis e utensílios'. Assim, a adoção de ações corretivas com relação à estrutura física é essencial para garantir a qualidade das refeições e segurança dos clientes.

REFERÊNCIAS

1. Sneed J, Strohnehn CH. Trends impacting food safety in retail foodservice: Implications for dietetics practice. *J American Diet Assoc*. 2008; 108(7):1170-7.
2. Stangarlm L, Delevati MT da S, Saccol AL de F. Vigência da RDC 216/04 para serviços de alimentação do centro de Santa Maria, RS (1ª Parte). *Hig Alim*. 2008; 22(166/167):20-3.
3. Organização Mundial de Saúde. Food borne disease: a focus for health education. 695 Geneva: World Health Organization. 2000; 198p.
4. World Health Organization. The role of food safety in health and development. Genebra; 1984
5. Bas M, Ersun AS, Kivanc G. The evaluation of food hygiene knowledge, attitudes, and practices of food handlers in food businesses in Turkey. *Food Control*. 2006; 17(4):317-22.
6. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 275 de 21 de outubro de 2002. Dispõe sobre o Regulamento técnico de procedimentos operacionais padronizados aplicados aos estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos e a lista de verificação das boas

- práticas de fabricação nesses estabelecimentos. [acesso em 20 jan 2010] Disponível em: [<http://www.anvisa.gov.br>].
7. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004. Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. [acesso 26 jan 2010] Disponível em: [<http://www.anvisa.gov.br>].
 8. Badaró ACL. Boas práticas para serviços de alimentação: um estudo em restaurantes comerciais do município de Ipatinga, Minas Gerais. [dissertação de mestrado]. Viçosa (MG): Universidade Federal de Viçosa; 2007.
 9. Dean AG, Arner TG, Sangam S, Sunki GG, Friedman R, Lantinga M, et al. [Computer program] *Epi Info 6.0*. A database and statistics program for public health professionals. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention; 1994.
 10. Mata GMSC, Tomazini APB, Fialho EM, Martino HSD, Pinheiro-Sant'Ana HM. Restaurantes comerciais necessitam de intervenções diversas para implementação das boas práticas e atendimento à legislação atual. II Congresso Brasileiro de Extensão Universitária; 2006; Florianópolis: Anais (CD Rom).
 11. São José JFB, Pinheiro-Sant'Ana HM. Avaliação das boas práticas de manipulação em unidade de alimentação escolar. *Nutrire: Rev Soc Bras Alim Nutr*. 2008; 33(3):123-38.
 12. Panza SGA, Brotherhood R, Andreotti A, Rezende C, Baleroni FH, Paroschi, VHB. Avaliação das condições higiênico-sanitárias durante a manipulação dos alimentos, em um restaurante universitário, antes e depois do treinamento dos manipuladores. *Hig Alim*. 2006; 20(138):15-9.
 13. Legnani P, Leoni E, Berveglieri M, Mirolo G, Alvaro N. Hygienic control of mass catering establishments, microbiological monitoring of food and equipment. *Food Control*. 2004;15(3):205-11.
 14. Egan MB, Raats MM, Grubb SM, Eves A, Lumbers ML, Dean MS et al. A review of food safety and food hygiene training studies in the commercial sector. *Food Control*. 2007; 18(10):1180-90.
 15. Seaman P, Eves A. Perceptions of hygiene training amongst food handlers, managers and training providers – A qualitative study. *Food Control*. 2010; 21(7):1037-41.

Efeito do congelamento sobre a concentração de retinol em fígado de codorna

Effect of freezing procedure on the retinol concentration in liver quail

RIALA6/1370

Roberto DIMENSTEIN^{1*}, Márcia Marília Gomes DANTAS¹, Videanny Videnov Alves dos SANTOS¹, Heryka Myrna Maia RAMALHO²

*Endereço para correspondência: ¹Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Av. Senador Salgado Filho, 3.000, Lagoa Nova, Natal/RN, Brasil. CEP 59072-970. E-mail: rdimenstein@gmail.com.

²Universidade Potiguar – Laureate International Universities

Recebido: 26.08.2010 – Aceito para publicação: 29.05.2011

RESUMO

A deficiência de vitamina A tem sido caracterizada como problema de saúde pública nos países em desenvolvimento. Contudo, a ingestão de alta quantidade de vitamina A pode resultar em efeitos tóxicos e teratogênicos. Neste estudo foi analisado o efeito do congelamento sobre os níveis de retinol em fígado de codorna, utilizando-se a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Avaliou-se, também, sua contribuição para a ingestão dietética recomendada a crianças, homens e mulheres. Os valores médios de retinol nas amostras frescas e congeladas de fígado de codorna foram, respectivamente, de 6145,7 µg/100g e 5105,5 µg/100g. O congelamento do fígado causou redução significativa nos níveis de retinol, com perda de 17%. Quanto à ingestão dietética de referência (DRI) de retinol para crianças de 1 a 3 anos e de 4 a 8 anos, um fígado de codorna, que equivale a 6 g, contribui, respectivamente, com 123% e 92%, o que mostra que o consumo de um fígado de codorna ultrapassa os limites de ingestão diária dessa população. Em indivíduos adultos, esse alimento contribuiu com 41% das necessidades diárias para homens e com 52% para mulheres, o que indica que o fígado de codorna representa ótima fonte de vitamina A.

Palavras-chave. congelamento, retinol, fígado, codorna.

ABSTRACT

Vitamin A deficiency has been characterized as a public health issue in developing countries. Otherwise, an intake of large doses of vitamin A may cause toxic and teratogenic effects. This study analyzed the effect of freezing procedure on the retinol contents in quail liver by means of high performance liquid chromatography (CLAE). It was also evaluated the contribution to dietary intake in children ranging from 1 to 8 years old, men and women. The average contents of retinol found in the fresh and frozen samples were 6145.7 µg/100g and 5105.5 µg/100g, respectively. The freezing process on the liver caused a significant reduction on retinol contents, with a loss of 17%. Concerning the retinol dietary reference intakes (DRI) for children from 1 to 3 years old and from 4 to 8 years old, one quail liver, which is equivalent to 6 g, provides 123% and 92% of retinol, respectively, showing that the consumption of one quail liver exceeds the limits of daily intake in children from 1 to 3 years old. In adults, the quail liver provides 41% of the required amount to men and 52% to women. This product shows to be a suitable source of vitamin A.

Keywords. freezing, retinol, liver, quail.

INTRODUÇÃO

A vitamina A é um álcool (retinol) isoprenóide, lipossolúvel e insaturado, encontrado em alimentos de origem animal na forma esterificada¹. Este micronutriente necessário em pequenas quantidades é fornecido pelos alimentos e, em condições normais, cerca de 90% é armazenado no fígado. Ela se origina de dois grupos de compostos: os retinóides, que correspondem à vitamina A pré-formada e são encontrados na natureza exclusivamente em alimentos de origem animal, e os carotenóides, que são encontrados principalmente em vegetais de coloração amarelo-alaranjado e vegetais folhosos verde-escuros¹.

A vitamina A é essencial para o organismo humano por desempenhar funções no metabolismo geral de lipídios e proteínas, crescimento celular, visão, desenvolvimento embrionário, reprodução e proliferação celular².

Atualmente a deficiência de vitamina A tem sido caracterizada como um problema de saúde pública nos países em desenvolvimento e leva à queratinização de epitélios, afetando os olhos e o revestimento dos tratos gastrointestinal, respiratório e do aparelho geniturinário, afetando também a integridade do sistema imune³. Sarni et al.⁴ enfatizam que a deficiência de vitamina A é ainda a principal causa de cegueira evitável no mundo, estando também associada a 23% das mortes por doença diarreica em crianças. Essa deficiência também contribui para o aumento significativo dos índices de morbi-mortalidade infantis associados a processos infecciosos.

O combate à deficiência de vitamina A nas áreas reconhecidas como endêmicas pode ser feito através de medidas que garantam a segurança alimentar e nutricional da população, como o enriquecimento de alimentos e o estímulo à produção e consumo de fontes alimentares de vitamina A e seus precursores.

Em contrapartida, uma alta ingestão de vitamina A pode resultar em efeitos tóxicos e teratogênicos, tais como distúrbios de diferenciação celular⁵. Em humanos, há evidências de má-formação em crianças, quando as mães consomem altas doses de vitamina A durante a gestação (>750 µg /dia)⁶. Segundo Majchrzak et al.⁷, uma excessiva ingestão de vitamina A é usualmente resultado do consumo de altos níveis de suplementos, mas é também associada ao consumo de fígado. O limite superior tolerável de segurança de ingestão de vitamina A, segundo a ingestão dietética de referência

(DRI)⁸, é de 3000 µg/dia, independentemente da fonte dessa vitamina.

São raras as pesquisas sobre o conteúdo de retinol em fígado de codorna. Apenas um estudo realizado por Karadas et al.⁹ verificou um valor médio de retinol em fígado de codornas adultas de 4787 µg/100g.

Tendo em vista a escassez de trabalhos que determinem a quantidade de retinol em fígado de codornas e a estabilidade desse micronutriente durante o seu processamento, seria interessante investigar os níveis de retinol no fígado dessa ave, bem como o efeito do congelamento sobre esses níveis. Esses dados possibilitariam a complementação de bases de dados nacionais sobre o valor nutritivo de alimentos que podem integrar a dieta da população. Além disso, avaliamos qual seria a contribuição do consumo desse alimento para a ingestão dietética recomendada às crianças na faixa etária de 1 a 8 anos, homens e mulheres.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Biológico

No presente estudo, foram utilizados seis fígados de codornas da espécie *Coturnix coturnix japonica* com 29 semanas de idade. Todas as aves usadas neste estudo receberam uma dieta basal, conforme recomendações do National Research Council¹⁰ para codornas em postura, composta por 20% de proteína, 2% de gordura, 2,5% de cálcio e 0,6% de fósforo, com níveis de vitaminas A e E de 10.000UI e 0,6 mg, respectivamente.

Os fígados das aves abatidas comumente por dessensibilização foram diretamente coletados na Escola Agrícola de Jundiá, Macaíba/RN, Brasil (entre novembro/2006 e dezembro/2006) e transportados ao Laboratório de Bioquímica da Nutrição da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Preparo das amostras

No Laboratório, os fígados de codorna foram primeiramente pesados, em seguida realizado um *pool* dessas amostras para a realização de dois tipos de análises: das amostras frescas e com sessenta dias de congelamento. A cada amostra foi adicionada quantidade equivalente ao seu peso de solução salina a 0,9% e, em seguida, homogeneizada com um mix triturador, formando assim um homogeneizado de fígado a 50%, do qual foram retiradas cinco alíquotas de 1 mL de fígado.

Hidrólise alcalina e extração do retinol

Todas as alíquotas foram extraídas segundo Gebre-Medhin e Valquist¹¹, como descrito a seguir: em 1 mL de homogenado foram adicionados 1 mL de etanol (95%) e 0,5 mL de hidróxido de potássio (50%). A mistura foi agitada e levada ao banho-maria, na temperatura de 45 °C durante duas horas. Em seguida, foram adicionados 3 mL de hexano e, após agitação, o tubo foi centrifugado por dez minutos (500xg). A camada hexânica foi removida e a operação repetida mais uma vez, sendo as fases hexânicas reunidas em outro recipiente. O extrato hexânico foi evaporado sob atmosfera de nitrogênio, em banho-maria a 37 °C, e posteriormente ressuspensionado em 2,0 mL de etanol absoluto.

Determinação do retinol por CLAE

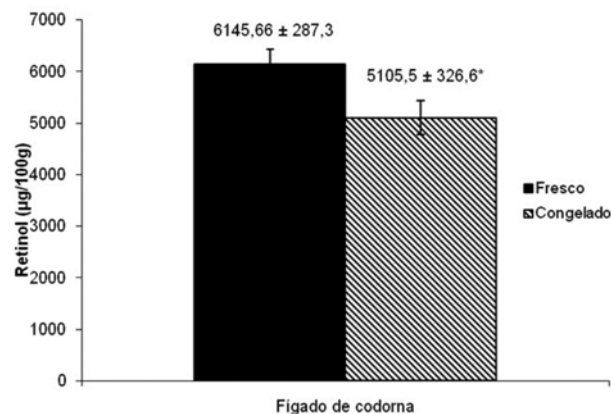
A concentração de retinol das amostras foi determinada pela Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em cromatógrafo LC-10 AD Shimadzu, acoplado a um detector SPD-10 A Shimadzu UV-VIS e integrador Chromatopac C-R6A Shimadzu, com uma coluna e pré-coluna CG nucleosil C₁₈ de 4,6 mm x 25 cm. Foram injetados 20 µL da amostra e o cromatograma evoluiu nas seguintes condições: fase móvel metanol 100% e fluxo 1,0 mL/min.

A identificação e a quantificação do retinol nas amostras foram estabelecidas por comparação com o tempo de retenção e a área do respectivo padrão de all-trans retinol – SIGMA. As concentrações dos padrões foram confirmadas pelo coeficiente de extinção específico (E1%, 1 cm = 1850) em etanol absoluto a 325 nm para retinol¹².

Para testar as diferenças entre as médias dos dados foi utilizado o Test-t Student em amostras pareadas. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

O valor médio de retinol encontrado nas amostras frescas de fígado de codorna foi de $6145,7 \pm 287,3$ µg/100g. Após um período de 60 dias de congelamento, o valor médio atingiu $5105,5 \pm 326,6$ µg/100g, demonstrando uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), representando uma redução de 17% nos níveis de retinol nos fígados de codorna após 60 dias de congelamento. As concentrações de retinol nos fígados de codornas frescos e congelados são mostradas na Figura 1.



* Diferença estatisticamente significativa do fígado fresco ($p < 0,05$)

Figura 1. Níveis de retinol em fígado de codornas, em momentos distintos de 60 dias

Tabela 1. Contribuição do fígado de codorna para as necessidades diárias de retinol

Idade	Recomendação diária	Porcentagem de cobertura*	
		Fresco	Congelado
1 – 3	300µg	123%	102%
4 – 8	400µg	92%	76%
Mulheres > 14	700µg	52%	43%
Homens > 14	900µg	50%	34%

*Considerando a quantidade de ingestão equivalente a 6 g de fígado de codorna.

Considerando a recomendação diária de retinol equivalente para crianças na faixa de 1 a 3 anos de 300 µg; 400 µg/dia para crianças entre 4 e 8 anos; adultos de 900 µg para homens e 700 µg para mulheres⁸ e, levando-se em consideração os níveis de retinol encontrados nos fígados de codorna frescos e congelados do presente estudo, verificou-se que o consumo de um fígado de codorna, que equivale a 6 g, pode cobrir em torno de 123 e 102% das recomendações diárias de retinol equivalente para crianças na faixa de 1 a 3 anos, 92 e 76% para crianças entre 4 a 8 anos, 41 e 34% para homens, e 52 e 43% para mulheres (Tabela 1).

DISCUSSÃO

Em estudo realizado com fígado de diferentes animais, Majchrzak et al.⁷ observaram nível médio de retinol no fígado de galinha (5600 µg/100g) semelhante ao encontrado no presente estudo.

Os níveis de retinol dos fígados frescos de codorna encontrados neste estudo foram superiores aos

encontrados por Karadas et al.⁹, que também analisaram o nível de retinol em fígado de codorna, encontrando uma concentração de 4787 µg/100g.

Em estudo realizado com leite, Vidal-Valverde et al.¹³ observaram perdas significativas no conteúdo de retinol após um período de 4 a 8 meses de congelamento.

Ao comparar os resultados obtidos com os apresentados em tabelas de alimentos para retinol no fígado de frango e galinha, observou-se que a média de retinol encontrada neste estudo para os fígados frescos de codorna (6145,66 µg/100g) foi superior ao da tabela americana USDA¹⁴ para fígado de galinha (3290 µg/100g) e a da TACO¹⁵ para fígado de frango (3683 µg/100g).

Os valores encontrados demonstram que o fígado de codorna é uma excelente fonte de vitamina A. No entanto, para que o seu consumo seja incentivado como medida de combate à deficiência de vitamina A, alguns critérios devem ser considerados, como: o hábito alimentar da população, o custo e a disponibilidade desse alimento na região. O fígado de codorna atende a estes critérios, além de ser um produto alimentício pouco aproveitado por criadores de codorna, visto que não apresenta valor comercial.

É necessário ressaltar que em populações que apresentam um bom estado nutricional em vitamina A, a ingestão desse alimento deve ser moderada, principalmente por mulheres em idade gestacional, devido aos efeitos tóxicos e teratogênicos de uma ingestão excessiva de vitamina A.

CONCLUSÃO

Verificou-se uma significativa redução nos níveis de retinol no fígado de codorna após 60 dias de congelamento, ocasionando uma perda de 17% nesses níveis. Porém, os fígados de codorna analisados apresentaram uma alta concentração de retinol, mostrando que esse alimento é uma importante fonte de vitamina A, sendo uma boa alternativa para a alimentação da população, combatendo a deficiência dessa vitamina. Entretanto, seu consumo deve ser moderado, especialmente por mulheres em período gestacional e que possuam um bom estado nutricional para vitamina A.

A partir dos resultados deste estudo sugerimos o aproveitamento do fígado de codorna desperdiçado pela indústria de alimentos no enriquecimento de preparações utilizadas na dieta habitual da população, principalmente aquela localizada em áreas de risco de desenvolvimento de deficiência de vitamina A. Essa utilização pode ser semanal, na quantidade de 12 g *per capita*.

REFERÊNCIAS

1. Mahan LK, Escott-Stump S. Krause: Alimentos, nutrição e dietoterapia, 8ª ed., São Paulo: Ed. Roca; 1998.
2. Dimenstein R, Nascimento THCR, Melo ILP, Ribeiro KDS. Avaliação dos níveis de retinol no colostro humano e sua relação com o estado nutricional materno em vitamina A. *Rev Bras Med*. 2006;65(5):206-10.
3. Geraldo RRC, Paiva SAR, Pitas AMCS, Godoy I, Campana AO. Distribuição da hipovitaminose A no Brasil nas últimas quatro décadas: ingestão alimentar, sinais clínicos e dados bioquímicos. *Rev Nutr*. 2003;16(4):443-60.
4. Sarni RS, Kochi C, Ramalho RA, Schoeps DO, Sato K, Mattoso LCQ et al. Vitamina A: nível sérico e ingestão dietética em crianças e adolescentes com déficit estatural de causa não hormonal. *Rev Assoc Med Bras*. 2002;48(1):48-53.
5. Vliet TV, Boelsma E, Vries AJ, Berg HVD. Retinoic acid metabolites in plasma are higher after intake of liver paste compared with a vitamin A supplement in women. *J Nutr*. 2001;131:3197-203.
6. Organização Mundial da Saúde. Vitamina A na gestação e na lactação: recomendações e relatório de uma consultoria. Recife: A Organização; 2001.
7. Majchrzak D, Fabian E, Elmadfa I. Vitamin A content (retinol and retinyl esters) in livers of different animals. *Food Chem*. 2005;98(4):704-10.
8. Institute of Medicine. Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. Washington, DC: National Academy Press; 2001.
9. Karadas F, Surai PF, Sparks NHC, Grammenids E. Effects of maternal dietary supplementation with three sources of carotenoids on the retinyl esters of egg yolk and developing quail liver. *Comp Biochem Physiol*. 2005;140(4):430-5.
10. National Research Council. Nutrients requirements of poultry. Washington DC: National Academy of Sciences; 1994.
11. Gebre-Medhin M, Vahlquist, A. Vitamin A Nutrition in the Human Fetus: a comparison in Sweden and Ethiopia. *Acta Paediatr Scand*. 1984;73:333-40.
12. Nierenberg DW, Nann SL. A method for determining concentration of retinol, tocopherol, and five carotenoids in human plasma and tissue samples. *Am J Clin Nutr*. 1992;56:417-26.
13. Vidal-Valverde C, Ruiz R, Medrano A. Stability of retinol in milk during frozen and other storage conditions. *Eur Food Res Technol*. 1992;6:562-5.
14. USDA. National Nutrient Database for Standard Reference, Release 19 2007. [acesso 08 fev 2007]. Disponível em: [http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/list_nut_edit.pl].
15. TACO-Tabela Brasileira de Composição de Alimentos/NEPA – UNICAMP-Versão II. Campinas: NEPA-UNICAMP; 2006.

Anticorpo monoclonal de alta eficiência no desenvolvimento de imun química aplicada – análise de ocratoxina em vinho

Silva DLD. **Monoclonal antibody with high efficiency in the development of applied immunochemistry – analysis of OTA in wine.** Londrina, PR. 2010. [Tese de Doutorado – Área de concentração: Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos – UEL]. Orientadora: Elisa Yoko Hirooka

O controle de Ocratoxina A (OTA) em vinho é exigência da legislação sanitária, mas o alto custo de importação de *kits* analíticos restringe o controle de qualidade. Visando à produção de imunorreagente nacional, procedeu-se com o cultivo de hibridoma OTA.1 em meio sintético e o anticorpo monoclonal (AcM) IgG anti-OTA obtido foi aplicado no desenvolvimento de ELISA competitivo indireto (ic-ELISA) e coluna de imunoafinidade (CIA). O cultivo de hibridoma OTA.1 iniciado em meio RPMI com 10% de soro fetal bovino foi gradativamente adaptado até 100% de meio *Hybridoma-Serum Free Medium* (H-SFM). O ic-ELISA foi desenvolvido com AcM, produzido em meio 100% H-SFM sob título de 1:10.000 com o conjugado OTA-BSA em diluição 1:30.000. Procedeu-se validação intralaboratorial em comparação com CLAE para análise de OTA em vinho tinto (VT), rosado (VR) e branco (VB), avaliando-se limite de detecção e quantificação; exatidão; linearidade; precisão e incerteza-padrão máxima. O ic-ELISA apresentou correlação de $R=0,975$ com CLAE, na análise de 14 amostras positivas, do total de 70 vinhos comerciais (47 VT e 23 VB). CLAE detectou OTA em 14 amostras, divididas em 10 VT (0,14 a 0,99 ng/mL) e 4 VB (0,33 a 0,90 ng/mL). O ic-ELISA detectou 12 amostras positivas, sendo 8 VT (0,26 a 0,86 ng/mL) e 4 VB (0,29 a 1,12 ng/mL). Paralelamente, CIAs baseadas em suporte ativado Affi-Gel foram confeccionadas com AcM obtido de cultivo em 75 e 100% H-SFM (1:1) em concentrações de 5, 10 e 20 mg de IgG/mL de gel, sendo as CIAs denominadas CIA 5, 10 e 20, respectivamente. Etanolamina foi utilizada para capeamento pós-imobilização de IgG, proporcionando taxa de imobilização acima de 85% para as três CIAs. Quanto à capacidade de retenção de OTA (20 ng), CIA 5 e CIA 10 apresentaram as maiores taxas de 72,08% e 76,85%. CIA 5 foi validada em comparação com CIA comercial quanto à eficiência na recuperação de OTA de vinho tinto artificialmente contaminado. CIA 5 recuperou 80,5 %, 76, 87% e 76,75 % de OTA de vinho contaminado com 0,5; 2 e 5 ng de OTA/mL, respectivamente, em relação à CIA comercial que recuperou 77%, 86,14% e 84,97%, para as mesmas concentrações. A aplicabilidade de CIA 5 foi testada perante 14 amostras naturalmente contaminadas (10 VT e 4 VB) obtendo-se alta correlação com CIA comercial ($R=0,954$), confirmando a possibilidade de uso desta imunoferramenta desenvolvida no controle de qualidade de vinho.

Palavras-chave. anticorpo monoclonal, ic-ELISA, coluna de imunoafinidade, ocratoxina.

Tese disponível na Biblioteca da Universidade Estadual de Londrina – UEL.
E-mail: danilucedoro@yahoo.com.br

Determinação de bifenilos policlorados em leite em pó e ingestão diária estimada por pré-escolares

Coelho AN. **Determination of polychlorinated biphenyls in powder milk and estimated daily ingestion in pre-schoolers.** Santa Maria, RS. 2010. [Dissertação de Mestrado – Área de concentração: Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria – UFSM]. Orientadora: Ijoni Hilda Costabeber.

Os bifenilos policlorados (PCBs) são compostos sintéticos que causam danos à saúde. Foram amplamente utilizados na indústria como óleos para transformadores e capacitores elétricos, tintas, conservantes para pesticidas e lubrificantes. Devido à sua bioacumulação e grande toxicidade, permanecem no ambiente, contaminando a cadeia alimentar e, conseqüentemente, o homem. Alimentos mais lipídicos têm sido reconhecidos como principal fonte de ingestão de PCBs. A preocupação quanto a esses compostos está relacionada à sua toxicidade, sobretudo sua relação com o câncer. Leite e derivados constituem uma importante fonte de macronutrientes benéficos (proteínas, vitaminas e sais minerais) à saúde. Logo, este estudo teve por objetivo investigar a presença de PCBs em leite em pó integral e estimar a ingestão desses compostos a partir do consumo desse alimento por pré-escolares. Foram coletados dados de peso e consumo de leite em pó integral por pré-escolares do município de Imbé/RS. O consumo de leite em pó foi de 32 g⁻¹ dia, equivalente a 8,3 g de gordura/dia. Para avaliar a presença dos PCBs 28, 52, 153, 138 e 180 no leite em pó integral, utilizado pelo Programa Nacional de Alimentação Escolar (PNAE) de Imbé e consumido pelos pré-escolares da rede de ensino municipal, procedeu-se com a reconstituição do leite, seguida de centrifugação para obtenção da fração lipídica. Os compostos foram extraídos através da técnica de cromatografia em coluna, utilizando florissil como fase estacionária. A identificação e a quantificação foram realizadas através de GC- μ ECD, seguido de confirmação por GC-MS. As concentrações dos compostos foram detectadas em ordem decrescente: PCB 180 (0,157 ng g⁻¹ de gordura) > PCB 138 (0,073 ng g⁻¹) > PCBs 28, 53 e 153 (<LQ). O somatório de PCBs foi de 0,230 ng g⁻¹ de gordura, variando de 0,000 a 2,857 ng g⁻¹. A ingestão diária estimada de PCBs, calculada pelo somatório de PCBs, a partir de leite em pó, foi 0,0013 ng g⁻¹ de gordura. Este valor, quando comparado com o limite de referência admitido pela legislação brasileira, fica abaixo do estabelecido. Com base nos resultados obtidos, conclui-se que o leite consumido pelos pré-escolares do PNAE no município de Imbé não oferece risco toxicológico. Todavia, sugere-se a importância de outros trabalhos com a finalidade de monitorar a presença de resíduos de PCBs em produtos lácteos destinados ao público infantil, uma vez que esses podem provocar efeitos adversos à saúde de uma população mais suscetível.

Palavras-chave. bifenilos policlorados, leite em pó integral, ingestão diária estimada, pré-escolares.

Dissertação disponível na Biblioteca do Centro de Ciências Rurais
da Universidade Federal de Santa Maria – UFSM.
Email: ijonicostabeber@gmail.com

Molecular typing of strains of vancomycin-resistant *Enterococcus* spp isolated in hospitals in the city of São Paulo in the period of 1999 to 2008

Sacramento AG. **Tipagem molecular de cepas de *Enterococcus* spp resistentes à vancomicina, isoladas em hospitais da cidade de São Paulo, no período de 1999 a 2008.** São Paulo, SP, 2010. [Dissertação de Mestrado – Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo]. Orientadora: Rosemeire Cobo Zanella.

In São Paulo, the first report of isolation of vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE) was in 1997 and, since then, this bacteria has been reported in Brazil as responsible for an outbreak of hospital infection. The present study was to investigate the genetic similarity of samples of VRE in order to analyze the spread of genetic types and subtypes circulating in 26 hospitals in the São Paulo city and region during 10 years. We analyzed 239 strains of VRE isolated from clinical specimens such as urine (n = 107), blood (n = 81) and liquid cavity (n = 51). Molecular typing of strains of VRE was performed by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). Electrophoretic patterns were analyzed according to Tenover criteria and the percentage of genetic similarity obtained through the program Bionumerics. The results of molecular analysis of strains of vancomycin-resistant *E. faecium* (VRE-EFM) showed greater genetic diversity with nine types, whereas vancomycin-resistant *E. faecalis* (VRE-EF) showed three types. The dendrogram analysis showed that the most common subtypes of VRE-EF (A1 and A8) and VRE-EFM (P1 and P6) showed a genetic similarity of 83% and 96% respectively. Among the hospitals evaluated showed the greatest spread of VRE-EF (85%), although the presence of both species occurred in 50% of hospitals. This study represents an important tracking of strains of VRE in São Paulo, where it has had an opportunity to characterize strains from various hospitals, both public and private and thus observe the spread intra and inter-hospital.

Keywords. molecular typing, vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE), electrophoresis pulsed field gel electrophoresis (PFGE), hospital infection, São Paulo City.

Suport: Instituto Adolfo Lutz Projeto # CCD-BM 10/96; Masters scholarship CAPES.
Tese disponível na Biblioteca da Coordenadoria de Controle de Doenças,
Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, São Paulo, SP.
E-mail: ags139@yahoo.com.br

Caracterização e propriedades funcionais de óleos extraídos de castanhas e nozes

Costa T. **Characterization and functional properties of oils extracted from nuts and walnuts.** São José do Rio Preto, SP. 2011. [Dissertação de Mestrado – Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto – UNESP]. Orientadora: Neuza Jorge.

Estudos epidemiológicos têm demonstrado uma relação inversa entre a ingestão de castanhas e nozes e as doenças crônicas, tais como doenças cardiovasculares e câncer. As castanhas e nozes possuem ácidos fenólicos e flavonoides, além de serem ricas em tocoferóis, fitosteróis e esqualeno. São fontes de carboidratos, ácidos graxos essenciais e minerais. Os possíveis efeitos benéficos desses compostos se devem à sua atividade antioxidante e antiproliferativa. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar os óleos extraídos de castanhas e nozes a fim de identificar compostos bioativos benéficos para aplicação destes óleos especiais em alimentos. Foi realizada a determinação da composição centesimal de castanhas do Brasil (*Bertholletia excelsa*), Sapucaia (*Lecythis pisonis*), Cotia (*Couepia edulis*) e Gurguéia (*Dipteryx lacunifera*) e das nozes Pecã (*Carya illinoensis*) e Noz (*Juglans regia*). Os óleos foram extraídos das castanhas e nozes a frio e analisados quanto à caracterização físico-química (teor de ácidos graxos livres, índice de acidez, de peróxidos, de iodo, de refração, índice de saponificação, matéria insaponificável e estabilidade oxidativa), composição em ácidos graxos, tocoferóis e compostos fenólicos totais. Os resultados foram submetidos a análises de variância e testes de Tukey para médias a 5%, empregando o programa ESTAT versão 2.0. Pelos resultados, verificou-se que as castanhas e nozes estudadas possuem composição centesimal distinta, porém constituíram fontes significativas de lipídios (35,74-68,89%), sendo uma fonte alternativa para óleos vegetais comestíveis. As propriedades físico-químicas dos óleos extraídos das castanhas e nozes foram comparáveis às de óleos convencionais de boa qualidade, além de possuírem como ácidos graxos majoritários o palmítico, o esteárico, o oleico e o linoleico, perfazendo 87-99% de sua composição. Quanto aos teores de compostos fenólicos e tocoferóis, o óleo da castanha de Cotia destacou-se com 2,02 mg EAG/g e 484,50 mg/kg, respectivamente. Porém, de modo geral, as oleaginosas apresentaram quantidades significativas de compostos fenólicos totais e tocoferóis.

Palavras-chave. óleos vegetais, alimentos funcionais, oleaginosas, ácidos graxos, tocoferóis, estabilidade oxidativa.

Dissertação disponível na Biblioteca do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.
E-mail: tay_costa@yahoo.com.br

Errata

RIAL 70(1), 2011-11-22

Página 63

Onde se lê: constiui (1º parágrafo, segunda linha)

Leia-se: constitui

Onde se lê: Universidade do Sudoeste da Bahia/UESB (6º parágrafo, quinta linha)

Leia-se: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia/UESB

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 esta parte, retomando o objetivo do trabalho ou serem apresentadas em item separado.

E) Agradecimentos: Este item é opcional e pode ser utilizado para mencionar os nomes de pessoas que, embora não preencham os requisitos de autoria, prestaram colaboração ao trabalho. Será preciso explicitar o motivo do agradecimento, por exemplo, consultoria científica, revisão crítica do manuscrito, coleta de dados etc. Deve haver permissão expressa dos nomeados e o autor responsável deve anexar a Declaração de Responsabilidade pelos Agradecimentos. Também pode constar desta parte apoio logístico de instituições.

2.3 CITAÇÃO NO TEXTO: A exatidão das referências é de responsabilidade dos autores. Devem ser indicadas pelo seu número na listagem, na forma de expoente, sem uso de parênteses, colchetes e similares. Nos casos em que há citação do nome do autor, o número da referência deve ser colocado a seguir do nome do autor. Trabalhos com dois autores devem fazer referência aos dois autores ligados por “e”. Nos outros casos apresentar apenas o primeiro autor (seguido de et al, em caso de autoria múltipla).

Exemplos: Nos Estados Unidos e Canadá, a obrigatoriedade da declaração dos nutrientes no rótulo do alimento é mais antiga e foram desenvolvidos métodos hidrolíticos, como o AOAC 996.061, de extração e determinação da GT por cálculo a partir dos AG obtidos por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (GC/DIC)2,3.

Segundo Chang et al³¹, o aumento do tamanho das partículas resulta numa redução da área de superfície conferindo uma melhora na retenção e estabilidade das mesmas.

2.4 REFERÊNCIAS: Listadas ao final do texto, devem respeitar a quantidade definida para cada categoria de artigos aceitos pela RIAL. As referências devem ser normalizadas de acordo com o estilo *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication*, numeradas consecutivamente na ordem em que foram mencionadas a primeira vez no texto.

Os títulos de periódicos devem ser referidos de forma abreviada, de acordo com o Medline, disponível no endereço <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=journals>. Para consultar periódicos nacionais e latino-americanos: <http://portal.revistas.bvs.br/main.php?home=true&lang=pt>.

No caso de publicações com até seis autores, citam-se todos; acima de seis, citam-se os seis primeiros, seguidos da expressão latina “et al”. Referências de um mesmo autor devem ser organizadas em ordem cronológica crescente.

Exemplos:

Artigos de periódicos:

Aued-Pimentel S, Zenebon O. Lipídios totais e ácidos graxos na informação nutricional do rótulo dos alimentos embalados: aspectos sobre legislação e quantificação. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2009;68(2):121-6.

Weihrauch JL, Posati LP, Anderson BA, Exler J. Lipid conversion factors for calculating fatty acids contents of foods. *J Am Oil Chem Soc*. 1977;54:36-40.

Hennington EA. Acolhimento como prática interdisciplinar num programa de extensão. *Cad Saude Coletiva* [Internet]. 2005;21(1):256-65. Disponível em: [<http://www.scielo.br/pdf/csp/v21n1/28.pdf>].

Livros:

Ringsven MK, Bond D. *Gerontology and leadership skills for nurses*. 2ª ed. Albany (NY):Delmar Publishers;1996.

Lopez D, organizador. *Estudos epidemiológicos qualitativos*. São Paulo: James Martim; 2009.

Institute of Medicine (US). *Looking at the future of the Medicaid program*. Washington (DC): The Institute; 1992.

Foley KM, Gelband H, editors. Improving palliative care for cancer. Washington: National Academy Press 2001 [acesso 2003 Jul 13]. Disponível em: [http://www.nap.edu/catalog.php?record_id=10149].

Capítulos de livro:

Wirdh L. História da Epidemiologia. In: Lopez D, organizador. Estudos epidemiológicos qualitativos. São Paulo: James Martim; 2009.p.64-76.

Dissertações, teses e monografias:

Santos EP. Estabilidade química da manteiga da terra [dissertação de mestrado]. Bananeiras (PB): Universidade Federal da Paraíba;1995.

Moreschi ECP. Desenvolvimento e validação de métodos cromatográficos e avaliação da estabilidade de vitaminas hidrossolúveis em alimentos [tese de doutorado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2006.

Trabalhos de congressos, simpósios, encontros, seminários e outros:

Barboza et al. Descentralização das políticas públicas em DST/AIDS no Estado de São Paulo. III Encontro do Programa de Pós-Graduação em Infecções e Saúde Pública; agosto de 2004; São Paulo: Rev Inst Adolfo Lutz. p. 34 [resumo 32-SC].

Dados eletrônicos:

Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo – SABESP. O que fazemos/Qualidade da água. [acesso 2008 Set 17]. Disponível em: [http://www.sabesp.com.br/CalandraWeb/CalandraRedirect/?temp=4&proj=sabesp&pub=T&db=&doc].

Legislação:

Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil. Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1, nº7-E. p.45-53.

Autoria institucional:

Instituto Adolfo Lutz (São Paulo - Brasil). Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 4ª ed. [1ª ed. digital]. São Paulo (SP): Instituto Adolfo Lutz; 2008. [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.

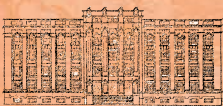
6. PROVAS: Após sua aprovação pelos editores, o manuscrito será revisado quanto à redação científica. O autor responsável pela correspondência receberá as provas gráficas para revisão por correio eletrônico em formato pdf (*portable document format*). O prazo máximo para a revisão da prova é de dois 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:



Instituto Adolfo Lutz



SECRETARIA
DA SAÚDE



ISSN 0073-9855



9 770073 985009