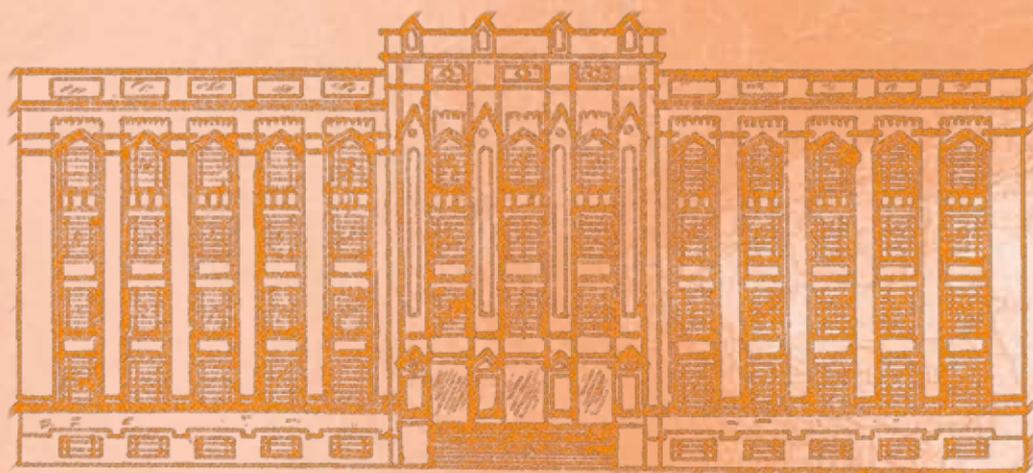


REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

ISSN 0073-9855
RIALA6



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE

Volume 70 número 1, 2011



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

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Volume 70 número 1, 2011
Janeiro - Março 2011

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

INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Diretor Geral do Instituto Adolfo Lutz

Alberto José da Silva Duarte

Editor Chefe

Adriana Bugno

Editor Adjunto

Luis Fernando de Macedo Brígido

Editores Assistentes

Christiane Asturiano Ristori Costa

Jacqueline Tanury Macruz Peresi

Lucile Tiemi Abe Matsumoto

Márcia Liane Buzzo

Maria Helena Iha

Maria Helena Martini

Miriam Solange Fernandes Caruso

Neuza Kasumi Shirata

Raquel dos Anjos Fazioli

Núcleo de Acervo

Rocely Aparecida Bueno Moita

Conselho Editorial / Editorial Board

Adele Caterino-de-Araújo, São Paulo, Brasil.
Alexandre Januário da Silva, Atlanta, EUA.
Antonio Ruffino Netto, Ribeirão Preto, Brasil.
Bernadette Dora G. de Melo Franco, São Paulo, Brasil.
Delia Rodrigues Amaya, Campinas, Brasil.
Elizabeth de Souza Nascimento, São Paulo, Brasil.
Elizabeth Castañeda, Bogotá, Colômbia.
Eliseu Alves Waldman, São Paulo, Brasil.
Fernando C. Schimitt, 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(1)

ISSN 0073-9855 CDD₁₈ 614.07205

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

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

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

- 1336 Mastites clínicas e subclínicas em bovinos leiteiros ocasionadas por *Staphylococcus coagulase-negativa***
Dairy cattle with clinical and subclinical mastitis caused by coagulase negative *Staphylococcus*
LÍVIA LIMA DOS SANTOS, GERALDO MÁRCIO DA COSTA, ULISSES DE PÁDUA PEREIRA,
MARISA ARAÚJO SILVA, NIVALDO DA SILVA 1-7
- 1337 Queijo Minas Frescal: perfil higiênico-sanitário e avaliação da rotulagem**
Minas *Frescal* Cheese: hygienic-sanitary characteristic and assessment of label information
RAFAELLA GUEDES VISOTTO, MARIA APARECIDA DE OLIVEIRA, SONIA DE PAULA TOLEDO PRADO,
ALZIRA MARIA MORATO BERGAMINI 8-15
- 1338 Características físico-químicas e sensoriais de pão de forma enriquecido com concentrado proteico de soro de leite e carbonato de cálcio**
Physical-chemical and sensory characteristics of sandwich loaf enriched with whey protein concentrate and calcium carbonate
NAÁRA MEDEIROS ARAÚJO LIMA OLIVEIRA, JANEYRE FERREIRA MACIEL, ADRIANA DE SOUSA LIMA, ÉRICA MENEZES SALVINO,
CARINE ELLEN PINTO MACIEL, DIVA PRISCILLA MENEZES NERY DE OLIVEIRA, LARISSA RAPHAELA GONÇALVES DE FARIAS..... 16-22
- 1339 Comportamento do consumidor em relação ao uso da linhaça na alimentação**
Views on the consumer's opinion in using the linseed in diets
MARIA INÊS DE SOUZA DANTAS, LISIANE LOPES DA CONCEIÇÃO, ALINE CRISTINA ARRUDA, NAIARA SPERANDIO,
JULIANA FERNANDES LELIS, HÉRCIA STAMPINI DUARTE MARTINO..... 23-27
- 1340 Influência da temperatura sobre as alterações físicas, físico-químicas e químicas de geleia da casca de banana (*musa spp.*) Cv. Prata durante o armazenamento**
Effects of temperature on the physical, physicochemical, chemical and microbiological alterations during of the storage of jelly made from Cv. Prata banana (*Musa spp.*) peel
CYNTHIA SAVASSI DIAS, SORAIA VILELA BORGES, FABIANA QUEIROZ, PATRÍCIA APARECIDA PIMENTA PEREIRA 28-34
- 1341 Influência do teor de NaCl no caviar à base de ovas de tainha (*Mugil platanus*)**
Effect of NaCl contents in the mullet (*Mugil platanus*) spawn-based caviar
FABIANO DE ANDRADE FERREIRA, NÁDIA CARBONERA, MILTON LUIZ PINHO ESPÍRITO SANTO 35-40
- 1342 Teor de cianeto total e livre nas etapas de processamento do tucupi**
Total and free cyanide contents determination during the processing steps for preparing tucupi
RENAN CAMPOS CHISTÉ, KELLY DE OLIVEIRA COHEN 41-46

1343	Aplicação de ácido fítico em produto cárneo tipo hambúrguer Phytic acid addition into hamburger-type meat product FABRÍCIO BARROS BRUM, FERNANDA TEIXEIRA MACAGNAN, MAGDA AITA MONEGO, TIAGO ANDRÉ KAMINSKI, LEILA PICOLLI DA SILVA.....	47-52
1344	Ensaios de atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> e mutagênica <i>in vivo</i> com extrato de <i>Vernonia polyanthes</i> Less (Assa-peixe) Analysis on the <i>in vitro</i> antimicrobial activity and <i>in vivo</i> mutagenicity by using extract from <i>Vernonia polyanthes</i> Less (Assa-peixe) GIOVANNA VALLIM JORGETTO, MARCELO FABIANO GOMES BORILOLO, LUCIMARA MARIA SILVA, DENISMAR ALVES NOGUEIRA, THIAGO DONIZETE DA SILVA JOSÉ, GRAZIELLE ESTEVES RIBEIRO, NELMA DE MELLO SILVA OLIVEIRA, JOÃO EVANGELISTA FIORINI.....	53-61
1345	Atividade antioxidante e correlação com fenólicos totais em genótipos de Urucum (<i>Bixa orellana</i> L.) Antioxidant activity and correlation with total phenolic in genotypes of Annatto (<i>Bixa orellana</i> L.) ALANA ROCHA LEMOS, NEWTON OLIVEIRA RÊGO JÚNIOR, ABEL REBOUÇAS SÃO JOSÉ, MARA LÚCIA ALBUQUERQUE PEREIRA, MARCONDES VIANA DA SILVA.....	62-68
1346	Acetilação e funcionalidade das proteínas das amêndoas da munguba (<i>Pachira aquatica</i> Aubl) Acetylation and of proteins from munguba (<i>Pachira aquatica</i> Aubl) CLAUDIA CARNEIRO DE AZEVEDO, PUSHKAR SINGH BORA, BERNADETE DE LOURDES DE ARAÚJO SILVA.....	69-76
■ COMUNICAÇÃO BREVE/BRIEF COMMUNICATION		
1347	Padronização da técnica de eletroforese de isoenzimas para certificação de linhagens celulares Standardization of isoenzymes electrophoresis technique for cell lines certification ANA CRISTINA SCARPARO DE MIRANDA, CLÁUDIA REGINA GONÇALVES, TAMIKO ICHIKAWA IKEDA, AUREA SILVEIRA CRUZ	77-80
1348	<i>Enterobacteriaceae</i> in processed cocoa products Enterobactérias em produtos processados de cacau MARISTELA DA SILVA DO NASCIMENTO, ÉRIKA MARQUES REOLON, ALINE REGINA BARBOSA SANTOS, VANESSA ELIANA MOREIRA, IVONE FRANCISCA DA SILVA, NEUSELY DA SILVA	81-85
1349	Ciclamato de sódio em refrigerantes de baixa caloria Sodium cyclamate in low calorie soft drinks HENRIQUE PETRARCA, MARIA TEREZINHA ELIZENE DA SILVA BONIFÁCIO, MAGALI MONTEIRO.....	86-91
■ RESUMOS DE TESES E DISSERTAÇÕES		
	Avaliação da composição química de óleos extraídos de sementes de abóboras (<i>Cucurbita</i> sp) Evaluation of chemical composition of pumpkin seed oil (<i>Cucurbita</i> sp) VERONEZI CM	92
	Dinâmica de circulação de <i>Leishmania</i> spp. no ambiente enzoótico de duas regiões do Estado de São Paulo, Brasil Dynamics of circulation of <i>Leishmania</i> spp in the enzootic forested environment in two regions of the State of São Paulo, Brazil TANIGUCHI HH	93
■ ERRATA		94
■ INSTRUÇÕES AOS AUTORES.....		95-100

Mastites clínicas e subclínicas em bovinos leiteiros ocasionadas por *Staphylococcus* coagulase-negativa

Dairy cattle with clinical and subclinical mastitis caused by coagulase negative *Staphylococcus*

RIALA6/1336

Lívia Lima dos SANTOS¹, Geraldo Márcio da COSTA², Ulisses de Pádua PEREIRA²,
Marisa Araújo SILVA¹, Nivaldo da SILVA^{1*}

*Endereço para correspondência: ¹Laboratório de Doenças Bacterianas, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6.627, Campus da UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil, Caixa Postal – 567, tel: 31 3409-2094, e-mail: nivsilva@gmail.com

² Laboratório de Microbiologia, Setor de Medicina Veterinária Preventiva, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil.

Recebido: 23.11.2010 – Aceito para publicação: 31.03.2011

RESUMO

Os objetivos deste estudo foram avaliar a participação de *Staphylococcus* coagulase-negativa (SCN) na etiologia da mastite em rebanhos bovinos leiteiros da região sul de Minas Gerais, identificar as espécies bacterianas envolvidas e traçar os perfis de susceptibilidade destas às drogas antimicrobianas. Foram analisadas 2.492 vacas de 35 rebanhos, sob diferentes sistemas de manejo, no período de 2004 a 2008. Os índices de mastite clínica e subclínica foram de 9,87% e 52,2%, respectivamente. Foram cultivadas 1.645 amostras de leite de quartos mamários individuais, e 120 cepas de SCN foram isoladas. A frequência média de isolamentos de SCN entre os rebanhos foi de 8,35%, com variações de 0% a 27,27%. Observou-se grande diversidade de espécies de SCN, sendo as mais frequentes *Staphylococcus hyicus* (15,0%), *Staphylococcus chromogenes* (12,5%), *Staphylococcus gallinarum* (12,5%), *Staphylococcus lentus* (12,5%) e *Staphylococcus epidermidis* (10,8%). Os testes de antibiograma apontaram que 28% dos isolados eram resistentes à penicilina, 21% à estreptomicina, 18% à ampicilina e 14% à tetraciclina. Todas as amostras isoladas apresentaram 100% de sensibilidade frente a danofloxacina, enrofloxacin e florfenicol. Baixa frequência de amostras multirresistentes às drogas antimicrobianas foi observada na população estudada.

Palavras-chave. doenças infecciosas, infecção intramamária, antimicrobianos, resistência.

ABSTRACT

This study aimed at assessing the feasibility of coagulase-negative *Staphylococcus* (SCN) as the etiologic agent of clinical and subclinical mastitis in dairy cattle in the southern region of Minas Gerais state, and to identify the bacteria species involved and to trace their profiles of susceptibility to antimicrobial drugs. The study included 2,492 cows from 35 herds, under different management systems, in the period of 2004-2008. The rates of clinical and subclinical mastitis were of 9.87% and 52.2%, respectively. The aseptically collected milk samples (1,645) from infected udders were cultivated, and 120 strains of SCN were isolated. The average frequency of isolation was found in 8.35% among the herds, varying from 0% to 27.27%. A high diversity of SCN species was isolated, and the most frequent were *Staphylococcus hyicus* (15.0%), *Staphylococcus chromogenes* (12.5%), *Staphylococcus gallinarum* (12.5%), *Staphylococcus lentus* (12.5%) and *Staphylococcus epidermidis* (10.8%). The antimicrobial susceptibility testing showed that 28% of the strains were resistant to penicillin, 21% to streptomycin, 18% to ampicillin and 14% to tetracycline. All strains showed 100% susceptibility to danofloxacin, enrofloxacin and florfenicol. Low frequency of multiresistant strains was found in the studied population.

Keywords. infectious diseases, intramammary infection, antimicrobials, resistance.

INTRODUÇÃO

Staphylococcus coagulase-negativa (SCN) constituem um grupo bastante heterogêneo de micro-organismos associados a infecções da glândula mamária de bovinos, sendo comumente encontrados no ambiente dos estabelecimentos de ordenha, em equipamentos de ordenha e na pele dos tetos^{1,2}.

O aumento da prevalência das mastites bovinas por SCN é assinalado por diversos autores, principalmente em rebanhos que adotaram programas efetivos de controle das infecções intramamárias (IIM) causadas por agentes contagiosos como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*^{3,4,5,6,7}. No entanto, a relevância de SCN como agentes de mastites clínicas e subclínicas, bem como o impacto dos mesmos nas contagens de células somáticas do leite do tanque (CCSLT) tem sido objeto de intensas discussões. Alguns estudos apontam maior frequência de isolamentos de SCN em vacas de primeira lactação e a sua associação com infecções subclínicas e baixas contagens de células somáticas no leite (CCS)^{1,8,9,10,11}. Outros estudos^{12,13} sugerem que quartos infectados por estes patógenos apresentam maior resistência a infecções por *S. aureus* e *S. agalactiae*, apesar de haver estudos que demonstram que este efeito protetor não existe e que, apesar de serem considerados menos patogênicos que *S. aureus*, as taxas de cura espontânea das infecções causadas por SCN são consideradas baixas, ocasionando infecções que podem persistir por toda a lactação. Como resultado, as mastites causadas por esses micro-organismos causam fibrose interalveolar do tecido mamário, perda da função secretória e alterações qualitativas e quantitativas do leite produzido pelos quartos afetados, ocasionando expressivas perdas de produção^{14,15,16}.

Neste trabalho, foi avaliada a participação dos SCN na etiologia da mastite em rebanhos bovinos leiteiros da região sul de Minas Gerais, identificando-se as espécies envolvidas e a sua susceptibilidade frente aos antimicrobianos utilizados nos tratamentos das IIM.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado no período de 2004 a 2008 e envolveu 2.492 vacas em diferentes estágios de lactação, de 35 rebanhos leiteiros da região sul do estado de Minas Gerais. Na Tabela 1, foram compiladas as informações sobre o número de vacas em lactação, tipo de manejo e produção diária média.

Tabela 1. Características dos 35 rebanhos de bovinos da região sul de Minas Gerais avaliados no período de 2004 a 2008

Rebanho	Vacas em lactação	Manejo	Produção Diária (L)
1	42	Piquetes	450
2	44	Piquetes	600
3	42	Free-stall	716
4	105	Semiconfinado	2.300
5	22	Piquetes	180
6	16	Piquetes	180
7	80	Free-stall	1.200
8	65	Free-stall	1.400
9	28	Confinamento total	800
10	32	Piquetes	430
11	140	Semiconfinado	2.100
12	63	Piquetes	700
13	51	Piquetes	400
14	77	Semiconfinado	1.200
15	56	Semiconfinado	900
16	56	Piquetes	740
17	46	Piquetes	400
18	31	Semiconfinado	600
19	27	Piquetes	500
20	220	Semiconfinado	2.900
21	86	Piquetes	1.100
22	35	Piquetes	400
23	40	Piquetes	600
24	66	Semiconfinado	700
25	78	Piquetes	1.100
26	130	Confinamento total	2.000
27	102	Piquetes	2.500
28	142	Free-stall	3.300
29	70	Piquetes	800
30	61	Semiconfinado	600
31	120	Semiconfinado	2.100
32	190	Semiconfinado	4.400
33	22	Semiconfinado	3.500
34	35	Semiconfinado	4.500
35	68	Piquetes	1.600

As vacas lactantes foram submetidas ao teste da caneca de fundo escuro e ao CMT (California Mastitis Test), visando ao diagnóstico da mastite clínica e subclínica, respectivamente. Quartos mamários positivos frente ao teste de CMT (+, ++ ou +++) ou que apresentavam mastite clínica, sem tratamento com antimicrobianos, foram amostrados para avaliação microbiológica.

Previamente à coleta das amostras de leite, foi realizada a higienização dos tetos com água, quando necessário, e a antisepsia com álcool iodado 1%. Foram coletadas amostras de leite de 1.645 quartos mamários individuais acometidos pela mastite (238 de casos clínicos e 1.407 de casos subclínicos) para análises microbiológicas. As amostras foram semeadas em placas contendo ágar sangue (5% de sangue ovino), incubadas a 37 °C por 18-24 horas e avaliadas quanto ao crescimento de colônias sugestivas de *Staphylococcus* spp. O crescimento de mais de dois tipos de micro-organismos foi interpretado como indício de contaminação na coleta, conforme preconizado por Brito e Brito¹⁷.

A identificação de SCN foi realizada segundo Quinn et al.¹⁸ e a identificação das espécies foi realizada por meio das chaves de identificação fenotípica propostas por Holt et al.¹⁹. Os micro-organismos isolados foram preservados em meio de congelamento (caldo infusão de cérebro e coração adicionado de 20% de glicerol), em temperatura de -70 °C, até a realização dos ensaios.

A avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos foi realizada por meio da técnica de difusão em ágar, de acordo com as normas do Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI²⁰. Foram testados os seguintes princípios ativos antimicrobianos: ampicilina (10µg), cefalotina (30µg), cefotaxima (30µg), ceftiofur (30µg), cefquimona (30µg), cloranfenicol (30µg), danofloxacina (10µg), enrofloxacina (10µg), estreptomina (10µg), florfenicol (30µg), gentamicina (10µg), lincomicina (15µg), neomicina (30µg), nitrofurantoína (300UI), novobiocina (30µg), penicilina G (10µg), polimixina B (300 UI), tetraciclina (30µg) e as associações de sulfametoxazol (23,75µg) e trimetoprim (1,25µg) e de neomicina, bacitracina e tetraciclina (NBT). Determinou-se, a partir dos resultados dos testes de antibiograma, o índice de resistência múltipla (índice MAR) para os isolados. O índice MAR é determinado pela proporção percentual de resistência aos agentes antimicrobianos testados²¹. As amostras de *S. aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 foram utilizadas para controle dos testes de antibiograma.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As taxas de mastite clínica e subclínica observadas foram respectivamente de 9,8% e 52,2%. Dos 1.645 quartos mamários amostrados para fins de determinação da etiologia da mastite, foram isoladas 120 cepas de SCN, sendo seis isolados provenientes de mastite clínica e 114 de mastite subclínica. Os isolados foram obtidos em cultura pura em 75% das amostras positivas para SCN.

A frequência média de isolamentos de SCN foi de 8,35%, com variações entre os rebanhos de 0% a 27,27% (Tabela 2). Levantamentos realizados em diversas regiões do Brasil apontaram prevalências de SCN variáveis entre 12,3% e 46,3%^{17,22,23,24,25}.

Embora SCN tenha sido associado com IIM na maior parte dos rebanhos estudados (85,7%), verificou-se a maior frequência de isolamentos (>10% das amostras analisadas positivas para SCN) em dez dos rebanhos analisados, dos quais quatro (11,42%) adotavam programa de controle efetivo da mastite contagiosa, e apresentavam baixas frequências de isolamentos por *S. aureus* e *S. agalactiae* (Tabela 2), conforme assinalaram Laffranchi et al.⁶, Sears e McCarthy¹ e Tenhagen et al.²⁶. Estudos prévios^{12,13} sugerem que quartos infectados por patógenos menores, dentre os quais se incluem os SCN, apresentam maior resistência à infecção pelos patógenos maiores *S. aureus* e *S. agalactiae*, porém tal fato ainda não foi devidamente elucidado. Além disso, Schukken et al.¹¹ verificaram maior produção de leite em quartos infectados por SCN em relação àqueles não infectados ou infectados por patógenos maiores, tais como *S. aureus* e *S. agalactiae*. Contudo, alguns estudos apontam que as infecções ocasionadas por este grupo de agentes podem se tornar persistentes, com repercussões negativas na qualidade do leite^{14,16}.

As espécies de SCN identificadas e respectivas frequências de isolamento encontram-se relacionadas na Tabela 3. Foram identificadas como as mais frequentes *S. hyicus* (15,0%), *S. chromogenes* (12,5%), *S. gallinarum* (12,5%), *S. lentus* (12,5%) e *S. epidermidis* (10,8%). As espécies *S. haemolyticus*, *S. caprae*, *S. simulans*, *S. hominis*, *S. sciuri*, *S. capitis* e *S. carnosus* ocorreram com menor frequência, perfazendo juntas, 22,5% dos isolados. Neste trabalho, *S. sciuri* representou apenas 2,5% dos isolamentos e não foram isoladas amostras de *S. xylosus*, espécies tipicamente ambientais. Outras 17 amostras de SCN (14,3%) não puderam ser identificadas por meio dos testes utilizados e foram caracterizadas

Tabela 2. Taxas de isolamento de *Staphylococcus* coagulase-negativa (SCN), índices de mastite subclínica (IMSC) e adoção de medidas de controle para mastite nos rebanhos estudados

Rebanho	SCN (%)	IMSC (%)	PRÉ-DIP	PÓS-DIP	MAN. ORD.	TVS	HIG. ORD.
3	0,00	58,75	Sim	Sim	Não	Sim	Satisfatória
6	0,00	60,32	Não	Sim	Sim	Sim	Insatisfatória
13	0,00	70,20	Não	Sim	Não	Não	Insatisfatória
25	0,00	53,16	Não	Não	Não	Não	Insatisfatória
35	0,00	35,66	Sim	Sim	Não	Sim	Satisfatória
16	1,69	85,45	Não	Sim	Não	Sim	Insatisfatória
31	2,56	34,16	Sim	Sim	Sim	Não	Satisfatória
26	3,33	43,56	Sim	Sim	Não	Não	Satisfatória
29	3,39	71,83	Não	Não	Sim	Seletivo	Satisfatória
5	3,85	57,95	Não	Não	Não	Não	Insatisfatória
19	4,00	50,00	Sim	Sim	Não	Sim	Insatisfatória
30	4,17	69,75	Sim	Sim	Não	Não	Insatisfatória
22	5,26	35,41	Não	Sim	Não	Sim	Insatisfatória
17	5,41	53,88	Não	Não	Não	Não	Insatisfatória
11	6,25	51,92	Não	Sim	Não	Seletivo	Satisfatória
12	6,25	76,58	Não	Sim	Não	Não	Insatisfatória
27	6,82	17,14	Sim	Sim	Não	Sim	Satisfatória
14	7,27	80,55	Não	Sim	Não	Seletivo	Insatisfatória
7	7,41	66,66	Sim	Sim	Não	Sim	Insatisfatória
28	8,33	36,98	Sim	Sim	Não	Sim	Insatisfatória
18	8,70	22,40	Sim	Sim	Sim	Sim	Insatisfatória
33	8,70	40,00	Sim	Sim	Sim	Sim	Satisfatória
21	8,77	69,61	Não	Não	Não	Não	Insatisfatória
4	9,52	62,26	Sim	Sim	Não	Seletivo	Insatisfatória
20	9,62	30,26	Sim	Sim	Sim	Sim	Satisfatória
24	10,42	67,30	Não	Sim	Não	Não	Insatisfatória
1	10,77	65,13	Não	Não	Não	Não	Satisfatória
15	12,24	47,80	Não	Sim	Sim	Sim	Insatisfatória
23	14,00	54,60	Não	Sim	Não	Não	Insatisfatória
2	15,22	41,24	Sim	Sim	Não	Sim	Insatisfatória
10	17,24	58,59	Não	Sim	Não	Não	Satisfatória
8	18,18	17,42	Sim	Sim	Sim	Sim	Satisfatória
34	22,22	63,57	Sim	Sim	Sim	Sim	Satisfatória
32	23,40	27,13	Sim	Sim	Não	Sim	Satisfatória
9	27,27	50,00	Sim	Sim	Sim	Sim	Satisfatória

SCN (%) = taxa de isolamento de *Staphylococcus* coagulase-negativa; IMSC (%) = taxa de mastite subclínica; PRÉ-DIP = Pré-dipping; PÓS-DIP = Pós-dipping; MAN. ORD.= Manutenção da ordenhadeira mecânica; TVS = Tratamento de vacas secas; HIG. ORD. = Higiene da ordenha

como *Staphylococcus* spp. Resultados semelhantes foram descritos por Sears e McCarthy¹ e Lüthje e Schwarz²⁷, que verificaram maiores frequências de isolamentos de *S. chromogenes* e *S. epidermidis* e baixos índices de *S. sciuri*, *S. capitis*, *S. hominis* e *S. caprae* em IIM de bovinos. Taponen et al.¹⁶, por outro lado, obtiveram maior frequência de isolamentos de *S. simulans* (43,6%), seguido de *S. chromogenes* (23,3%) entre SCN isolados de casos de mastite bovina, enquanto Brabes et al.⁴ identificaram *S. chromogenes* (11,8%), *S. sciuri* (9,4%), *S. simulans* (7,0%), *S. hyicus* (6,3%) e *S. xylosus* (4,7%) como as espécies mais frequentes em rebanhos de Minas Gerais e São Paulo.

As variações observadas quanto às espécies de SCN identificadas e quanto às frequências de participação das mesmas na etiologia das IIM podem ser justificadas pela ampla diversidade de espécies existentes entre os SCN e possivelmente por diferentes condições de ordenha e fatores relacionados ao manejo dos animais, conforme assinalado por Mendonça et al.²⁸. Além disso, verifica-se uma grande heterogeneidade no grupo de SCN que possui dezenas de espécies¹⁸ com características predominantes de agente contagioso, mas com a existência de espécies tipicamente ambientais, como *S. sciuri* e *S. xylosus*¹.

Os perfis de susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos obtidos das 120 cepas de SCN encontram-se na Tabela 4. Dentre os isolados, 33 (28%) foram resistentes à penicilina, 25 (21%) à estreptomicina, 22 (18%) à ampicilina e 17 (14%) à tetraciclina. Verificaram-se índices de resistência inferiores a 5% para as cefalosporinas, gentamicina, novobiocina, cloranfenicol, nitrofurantoína, polimixina B e para as associações de sulfametoxazol e trimetoprim e de neomicina, bacitracina e tetraciclina. Dentre os antimicrobianos de utilização em medicina veterinária para tratamento das IIM, danofloxacina, enrofloxacina e florfenicol foram aqueles que apresentaram maior efetividade *in vitro* (100%) frente aos isolados testados, fazendo destes uma opção de tratamento das mastites ocasionadas por SCN.

Os betalactâmicos, ampicilina e penicilina, e a tetraciclina, antimicrobianos amplamente empregados no tratamento da mastite e de outros processos infecciosos em bovinos, demonstraram, comparativamente aos demais antimicrobianos testados, baixa efetividade *in vitro* contra SCN, em concordância com estudos prévios^{29,30,31}. Tal fato orienta para que a utilização destas bases seja realizada após criteriosa avaliação de sua eficiência contra os patógenos presentes no rebanho.

Tabela 3. Identificação de espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativa isoladas em casos de mastite em bovinos da bacia leiteira do sul de Minas Gerais, no período de 2004 a 2008

Espécie	Nº de isolados	Percentual
<i>Staphylococcus hyicus</i>	18	15,0
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	15	12,5
<i>Staphylococcus gallinarum</i>	15	12,5
<i>Staphylococcus lentus</i>	15	12,5
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	13	10,8
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	07	5,8
<i>Staphylococcus caprae</i>	06	5,0
<i>Staphylococcus simulans</i>	05	4,2
<i>Staphylococcus hominis</i>	04	3,3
<i>Staphylococcus sciuri</i>	03	2,5
<i>Staphylococcus capitis</i>	01	0,8
<i>Staphylococcus carnosus</i>	01	0,8
<i>Staphylococcus</i> spp.	17	14,3
Total	20	100

O percentual de multirresistência revelado pelos diferentes isolados de SCN estudados foi bastante reduzido, verificando-se que 55,1% deles foram sensíveis a todas as bases testadas e que somente 13,0% das mesmas apresentaram índice MAR maiores que 0,20, o que caracteriza a multirresistência²¹. Embora os resultados dos antibiogramas tenham demonstrado a susceptibilidade dos isolados testados para a maioria das bases utilizadas na rotina de tratamento das mastites bovinas, a determinação dos perfis de sensibilidade aos antimicrobianos fornece subsídios para o controle mais racional das mastites causadas por estes micro-organismos, permitindo a escolha mais criteriosa das bases a serem utilizadas, minimizando a pressão de seleção dos micro-organismos envolvidos na etiologia das IIM no rebanho.

A baixa frequência de isolamentos de SCN e a susceptibilidade dos mesmos para a maioria dos antimicrobianos testados podem sugerir que estes tenham importância secundária na etiologia das IIM nos rebanhos estudados. No entanto, estudos recentes demonstraram que as infecções por esses agentes são de extrema relevância para vacas primíparas^{1,9,10}, adquirindo maior expressão em rebanhos nos quais as infecções por patógenos maiores foram controladas, nos quais podem representar a principal causa de elevação da CCSLT^{11,14,16}.

Tabela 4. Avaliação da resistência aos antimicrobianos de 120 cepas de *Staphylococcus* coagulase-negativa isoladas de casos subclínicos e clínicos de mastite em 35 rebanhos bovinos da região sul de Minas Gerais, no período de 2004 a 2008

Espécie (Nº de isolados)	Número de cepas resistentes aos antimicrobianos																			
	AMP	CFL	CTX	CFQ	CFT	CLO	DAN	ENR	EST	FLO	GEN	LIN	NBT	NEO	NIT	NOV	PEN	POL	SUT	TET
<i>S. capitis</i> (1)	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0
<i>S. caprae</i> (6)	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1
<i>S. chromogenes</i> (15)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>S. epidermidis</i> (13)	3	0	0	0	0	1	0	0	5	0	0	1	0	1	0	0	3	0	0	1
<i>S. gallinarum</i> (15)	3	0	1	1	1	0	0	0	3	0	0	2	0	1	0	1	5	0	0	3
<i>S. haemolyticus</i> (7)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1
<i>S. hominis</i> (4)	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2
<i>S. hyicus</i> (18)	2	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2
<i>S. lentus</i> (15)	3	0	0	1	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	1
<i>S. sciuri</i> (3)	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1
<i>S. simulans</i> (5)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1
Outras (17)	4	2	0	1	2	2	0	0	6	0	2	4	1	1	1	4	12	1	3	4
% de resistência	18	3,3	0,8	1,7	3,3	3,3	0	0	21	0	3,3	9,2	0,8	2,5	1,7	5	28	3,3	3,3	14

AMP: Ampicilina; CFL: Cefalotina; CTX: Cefotaxima; CFQ: Cefquinoma; CFT: Ceftiofur; CLO: Cloranfenicol; DAN: Danofloxacina; ENR: Enrofloxacina; EST: Estreptomicina; FLO: Florfenicol; GEN: Gentamicina; LIN: Lincomicina; NBT: associação de Neomicina, Bacitracina e Tetraciclina; NEO: Neomicina; NIT: Nitrofurantoína; NOV: Novobiocina; PEN: Penicilina; POL: Polimixina B; SUT: Trimetoprim / Sulfametoxazol; TET: Tetraciclina

CONCLUSÃO

Staphylococcus coagulase-negativa apresentaram ampla disseminação entre os rebanhos estudados, verificando-se maior frequência de isolamentos em rebanhos onde as IIM ocasionadas por patógenos contagiosos maiores foram controladas.

Observou-se grande diversidade entre as espécies de SCN na população estudada, sendo *Staphylococcus hyicus* a espécie mais frequente.

A população testada apresentou baixa resistência *in vitro* aos antimicrobianos utilizados no tratamento de IIM de bovinos.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

REFERÊNCIAS

- Sears PM, Mccarthy, KK. Management and treatment of staphylococcal mastitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 2003; 19(1): 171-85.
- Costa EO, Mota RA, Santos FGB, Mármore C, Arcaro JRP, Peres AAC. Contagem de células somáticas de amostras de leite de glândulas mamárias de fêmeas bovinas em lactação infectadas por microrganismos dos gêneros *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Corynebacterium*. *Rev Napgama*. 2005; 8(2): 3-7.
- Sargeant JM, Scott HM, Leslie KE, Ireland MJ, Bashiri A. Clinical mastitis in dairy cattle in Ontario: frequency of occurrence and bacteriological isolates. *Can Vet J*. 1998; 39(1): 33-8.
- Brabes KCS, Carvalho EP, Dionísio FL, Pereira, ML, Garino F, Costa EO. Participação de espécies coagulase positivas e negativas produtoras de enterotoxinas do gênero *Staphylococcus* na etiologia dos casos de mamite bovina em propriedades de produção leiteira dos Estados de São Paulo e Minas Gerais. *Rev Napgama*. 1999; 2(3): 4-11.
- Silva N. Diagnóstico de mamite em animais de importância econômica. III Encontro de Pesquisadores em Mamites. Botucatu: Anais. Botucatu: FMVZ-UNESP, 1999. p. 51-55.
- Laffranchi A, Muller EE, Freitas JC, Pretto-Giordano LG, Dias JA, Salvador R. Etiologia das infecções intramamárias em vacas primíparas ao longo dos primeiros quatro meses de lactação. *Ciênc Rural*. 2001; 31(6): 1027-32.

7. Rajala-Schulz PJ, Smith KL, Hogan JS, Love BC. Antimicrobial susceptibility of mastitis pathogens from first lactation and older cows. *Vet Microbiol*. 2004; 102(1-2): 33-42.
8. Costa EO, Ribeiro AR, Watanabe ET, Prada RB, Silva JAB, Costa, EO et al. Prevalence of intramammary infections in primigravid Brazilian dairy heifers. *Prev Vet Med*. 1996; 29(2): 151-55.
9. Piepers S, De Vlieghe S, de Kruijff A, Opsomer G, Barkema HW. Impact of intramammary infections in dairy heifers on future udder health, milk production, and culling. *Vet Microbiol*. 2009; 134(1-2): 113-20.
10. Sampimon OC, Barkema HW, Berends IM, Sol J, Lam TJ. Prevalence and herd-level risk factors for intramammary infection with coagulase-negative staphylococci in Dutch dairy herds. *Vet Microbiol*. 2009; 134(1-2): 37-44.
11. Schukken YH, González RN, Tikofsky LL, Schulte HF, Santisteban CG, Welcome FL et al. CNS mastitis: Nothing to worry about? *Vet Microbiol*. 2009; 134(1-2): 9-14.
12. Lam TJ, Schukken YH, van Vliet JH, Grommers FJ, Tielen MJ, Brand A. Effect of natural infection with minor pathogens on susceptibility to natural infection with major pathogens in the bovine mammary gland. *Am J Vet Res*. 1997; 58(1): 17-22.
13. White LJ, Schukken YH, Lam TJ, Medley GF, Chappell MJ. A multispecies model for the transmission and control of mastitis in dairy cows. *Epidemiol Infect*. 2001; 127(3): 567-76.
14. Zadoks RN, Allore HG, Barkema HW, Sampimon OC, Wellenberg GJ, Gröhn YT, Schukken YH. Cow- and quarter-level risk factors for *Streptococcus uberis* and *Staphylococcus aureus* mastitis. *J Dairy Sci*. 2001; 84(12): 2649-63.
15. Silva, N. Doença da glândula mamária/Mamite bovina. In: Marques, D. C. Criação de bovinos/ Dorcimar da Costa Marques. 7ª ed. rev., atual e ampl. – Belo Horizonte – CVP Consultoria Veterinária e Publicações; 2003. p. 435-51.
16. Taponen S, Simojoki H, Haveri M, Larsen HD, Pyörälä S. Clinical characteristics and persistence of bovine mastitis caused by different species of coagulase-negative staphylococci identified with API or AFLP. *Vet Microbiol*. 2006; 115(1-3): 199-207.
17. Brito MAVP, Brito JRF, Ribeiro MT, Veiga VMO. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários de vacas em lactação. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 1999; 51(2): 129-35.
18. Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR. *Clinical veterinary microbiology*. London: Wolfe; 1994.
19. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Williams ST. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9ª ed. Baltimore (USA): Williams & Wilkins; 1994.
20. CLSI. Performance standards for antimicrobial disk and dilution tests for bacteria isolated from animals; approved standard. CLSI Document M31-A3. 3ª ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
21. Kruperman PH. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. *Appl Environ Microbiol*. 1983; 46(1): 165-70.
22. Nader Filho A, Iturrino RPS, Rossi-Junior OD. Mastite subclínica em rebanhos produtores de leite gordura 3,2%. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 1984; 36(5): 549-58.
23. Pardo RB, Sturion DJ, Basile JR, Chaves Neto AF, Duarte DDS, Fernandes AA et al. Levantamento dos agentes etiológico da mastite bovina na região de Arapongas (PR). *Unopar Cient: Ciênc Biol Saúde*. 1999; 1(1): 25-30.
24. Barbalho TCF, Mota RA. Isolamento de agentes bacterianos envolvidos na mastite subclínica bovina no Estado do Pernambuco. *Rev Bras Saúde Prod Anim*. 2001; 2(2): 31-6.
25. Donatele DM, Motta OV, Folly MM. Perfil antimicrobiano de linhagens de *Staphylococcus* spp coagulase positiva na mastite subclínica de vacas leiteiras nas regiões norte e noroeste do Estado do Rio de Janeiro. *Rev Napgama*. 2002; 5(2): 3-6.
26. Tenhagen BA, Köster G, Wallmann J, Heuwieser W. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. *J Dairy Sci*. 2006; 89(7): 2542-51.
27. Lüthje P, Schwarz S. Antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococci from bovine subclinical mastitis with particular reference to macrolide-lincosamide resistance phenotypes and genotypes. *J Antimicrob Chemother*. 2006; 57(5): 966-9.
28. Mendonça CL, Fioravanti MCS, Silva JABA, Sousa MIL, Eurides D, Langoni H. Etiologia da Mamite Bovina. *Vet Notic*. 1999; 5(1): 107-18.
29. Benites NR, Melville PA, Guerra JL, Costa EO. Avaliação do status microbiológico de diferentes estruturas de glândulas mamárias de vacas leiteiras abatidas. *Rev Napgama*. 2000; 3(3): 10-13.
30. Cunha AP, Silva LBG, Pinheiro Júnior JW, Silva DR, Oliveira AAF, Silva KPC et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana de agentes contagiosos e ambientais isolados de mastite clínica e subclínica de búfalas. *Arq Inst Biol*. 2006; 73(1): 17-21.
31. Sampimon OC, Vernooij JC, Mevius DJ, Sol J. Sensitivity to various antibiotics of coagulase-negative staphylococci isolated from samples of milk from Dutch dairy cattle. *Tijdschr Diergeneeskd*. 2007; 132(6): 200-4.

Queijo Minas Frescal: perfil higiênico-sanitário e avaliação da rotulagem

Minas *Frescal* Cheese: hygienic-sanitary characteristic and assessment of label information

RIALA6/1337

Rafaella Guedes VISOTTO, Maria Aparecida de OLIVEIRA, Sonia de Paula Toledo PRADO, Alzira Maria Morato BERGAMINI*

*Endereço para correspondência: Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas, Centro de Laboratório Regional de Ribeirão Preto VI, Instituto Adolfo Lutz, Rua Minas, 877, Campos Elíseos, Ribeirão Preto, SP, Brasil, CEP: 14085-410, tel: 16 3625-5046, ramal 206, fax: 16 3635-7994, e-mail: alzirabergamini@bol.com.br

Recebido: 06.12.2010 – Aceito para publicação: 28.03.2011

RESUMO

O queijo Minas Frescal, em função do alto teor de umidade, torna-se susceptível a contaminações por micro-organismos. Vários estudos têm mostrado a ocorrência variável de patógenos em queijo Minas Frescal, sendo comuns altas contagens de coliformes termotolerantes. Neste estudo, foram analisadas as condições higiênico-sanitárias, a presença de micro-organismos potencialmente patogênicos e as informações no rótulo em 30 amostras (22 industrializadas e oito caseiras) de queijos Minas Frescal, comercializadas na região de Ribeirão Preto-SP. A qualidade microbiológica foi avaliada por enumeração de coliformes termotolerantes e de estafilococos coagulase-positiva e pela pesquisa de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*, seguindo-se a Resolução – RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, da ANVISA. Foram também realizadas a enumeração de coliformes totais e a pesquisa de *Shigella* spp. A análise do rótulo foi efetuada seguindo-se as legislações da ANVISA/MS, do MAPA e do INMETRO. Do total de amostras, 63,4% apresentaram coliformes termotolerantes acima de $1,1 \times 10^3$ NMP/g, sendo 23,4% e 40,0% correspondentes, respectivamente, às amostras de queijos dos tipos caseiro e industrializado. Não foram isoladas *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e *Shigella* spp. Das 22 amostras industrializadas, 71% apresentaram rótulos em não conformidade. As amostras caseiras e as industrializadas mostraram baixa qualidade microbiológica.

Palavras-chave. queijo Minas Frescal, qualidade microbiológica, rotulagem de alimentos.

ABSTRACT

Minas *Frescal* Cheese is prone to be contaminated by microorganisms due to high water contents. Several studies have shown that pathogens occurring in this kind of cheese are highly variable, and high counting of fecal coliforms is very common. This study aimed at analyzing the hygienic-sanitary conditions, the presence of pathogens, and to evaluate the label information in 30 samples of Minas *Frescal* Cheese, marketed in the region of Ribeirão Preto, SP. Microbiological quality was assessed searching for total and thermotolerant coliforms, coagulase positive staphylococci, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, according to Resolution – RDC n° 12, January 2, 2001, ANVISA. Also, coliforms counting and *Shigella* spp. searching were carried out. The label information was assessed following the ANVISA/MS, MAPA and INMETRO legislations. Of the total samples, 63.4% showed fecal coliforms above 1.1×10^3 MPN/g, and 23.4% and 40.0% corresponded to homemade samples and industrialized cheese, respectively. Neither *Salmonella* spp., nor *Listeria monocytogenes* and *Shigella* spp. was isolated from any samples. Of 22 industrialized samples, 71% presented unconformity in labels. The industrialized and homemade cheese samples showed low microbiological quality.

Keywords. Minas *Frescal* cheese, microbiological quality, label information.

INTRODUÇÃO

O leite e seus derivados, assim como as carnes e os ovos, correspondem à maior parte da parcela proteica de origem animal ingerida pelo homem. Dentre os vários produtos derivados do leite, o queijo se destaca por ser o mais consumido, sendo que a produção brasileira em 2008 foi de aproximadamente 670 mil toneladas¹. Sua popularidade é atribuída ao sabor, à conveniência, versatilidade de uso e ampla variedade de tipos, além do alto valor nutricional². De acordo com Perry³, o processo básico de fabricação de queijos é comum aos mais diferentes tipos, dependendo de variações como: origem do leite, técnicas de processamento e tempo de maturação. O comércio mundial disponibiliza aos consumidores cerca de 1.000 tipos de queijos e a França, sozinha, fabrica 400 desses tipos.

Os produtos derivados do leite, em especial os queijos, são considerados veículos comuns de patógenos, pois constituem um meio apropriado para a sobrevivência desses micro-organismos. Os queijos frescos e macios, em particular, fornecem excelentes condições de multiplicação de micro-organismos deteriorantes e potencialmente patogênicos, tais como *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, e têm sido implicados com frequência em surtos alimentares ocorridos em vários países⁴⁻⁸. Estudos retrospectivos realizados por De Buyser et al.⁹ mostraram que em diferentes países no período de 1983-1999, *L. monocytogenes* foi o patógeno responsável pela ocorrência de 10 surtos alimentares envolvendo leite e produtos lácteos: dois associados com leite pasteurizado, dois com manteiga e seis com queijo (três fabricados com leite *in natura*). Os autores descrevem também a ocorrência de um surto em 1985 com mais de 140 casos de morte devido a um tipo de queijo produzido com leite pasteurizado.

No Brasil, dentre os diferentes tipos de queijo, destaca-se o queijo Minas Frescal, o qual é classificado como queijo fresco, devido ao seu alto conteúdo de umidade, por ser processado em temperaturas de 32-35 °C, não ser submetido à cura e apresentar baixa percentagem de sal. De massa branca, tem consistência mole e textura fechada, podendo apresentar olhaduras irregulares, e o seu sabor vai do suave ao levemente ácido^{1,3}. É um produto perecível, susceptível a fenômenos bioquímicos e microbiológicos que afetam as suas características de qualidade, rendimento e durabilidade, apresentando uma vida de prateleira curta, mesmo sob condições adequadas de refrigeração¹⁰.

A extensão da vida útil e a qualidade dos produtos lácteos dependem, em muitas ocasiões, da matéria-prima

utilizada no seu processamento. Quando o número de micro-organismos inicialmente presente no leite *in natura* é elevado, a qualidade do produto final tende a ficar aquém do desejado, sendo que essa qualidade ainda poderá sofrer influência de outros fatores, tais como: leite de baixa qualidade ou não pasteurizado, condições de fabricação inadequadas, ineficiência ou mesmo ausência de etapas de refrigeração ao longo da cadeia produtiva^{11,12}. A utilização de leite *in natura* ou de seus produtos é uma importante fonte de veiculação de micro-organismos patogênicos e pode ser responsável pela ocorrência de surtos alimentares¹³.

Segundo Almeida Filho et al.¹⁴, um importante problema brasileiro é o hábito de consumir leite e seus derivados não inspecionados, o qual tem origem no baixo nível cultural da população que julga os produtos de origem clandestina superiores aos inspecionados, por considerar mais “saudáveis”, consistentes, saborosos e nutritivos em relação aos alimentos submetidos aos processos tecnológicos. Essa também é uma preocupação para muitos outros países. Nos Estados Unidos, Oliver et al.⁵ realizaram uma revisão sobre o envolvimento do leite e seus produtos na ocorrência de surtos no período de 2000 a 2008. Nos surtos investigados, muitas pessoas ficaram doentes, algumas foram hospitalizadas e outras morreram. Os autores concluíram que na maioria dos surtos o micro-organismo responsável foi isolado do leite ou de seus produtos fabricados com leite não pasteurizado ou proveniente de fontes suspeitas. Aqueles autores observaram também que, durante o período investigado, poucos surtos foram associados ao consumo de leite pasteurizado.

No comércio podemos encontrar queijos Minas Frescal de produção industrial ou caseira, sendo que se considera como caseiro os queijos produzidos sem qualquer tecnologia e que geralmente são vendidos sem rótulo. O queijo Minas Frescal é um queijo fresco, de pouca maturação e que tem algumas diferenças em relação ao queijo Minas Artesanal, o qual é produzido em fazendas mineiras das regiões do Cerrado, Araxá, Serro, Canastra e Vertente e é elaborado com leite *in natura*, exatamente como é ordenhado da vaca. Seu sabor característico é bem mais pronunciado, a massa é mais firme e seca e ele é mais caro que o frescal¹⁵.

No Brasil, visando à proteção da saúde da população e à qualidade microbiológica dos produtos alimentícios, a Resolução – RDC nº 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA/MS, de 02 de

janeiro de 2001, estabelece os padrões microbiológicos sanitários para alimentos, em que a tolerância é máxima e os padrões são mínimos para os diferentes grupos de produtos alimentícios, para fins de registro e fiscalização¹⁶. Para queijos de muita alta umidade (>55%), como o Minas Frescal, elaborados por coagulação enzimática e sem ação de bactérias lácticas, a legislação brasileira¹⁶ delimita uma tolerância de $5,0 \times 10^2$ NMP/g para coliformes termotolerantes e $5,0 \times 10^2$ UFC/g para estafilococos coagulase-positiva e também estabelece ausência de *Salmonella* spp. e de *Listeria monocytogenes* em 25 g desse produto.

A legislação brasileira define rotulagem como “toda inscrição, legenda, imagem ou toda matéria descritiva ou gráfica, escrita, impressa, estampada, gravada, gravada em relevo ou litografada ou colada sobre a embalagem do produto de origem animal”¹⁷. Há uma enorme variedade e complexidade de produtos alimentícios em todo o mundo. No Brasil, para reforçar a fiscalização dos alimentos embalados, a ANVISA, o MAPA e o INMETRO publicaram e estão continuamente revisando legislações a serem utilizadas na avaliação dos dizeres de rotulagem dos produtos disponibilizados ao consumidor. De acordo com Câmara et al.¹⁸, a rotulagem dos alimentos auxilia escolhas alimentares apropriadas, ao orientar o consumidor sobre a qualidade e a quantidade dos constituintes nutricionais dos produtos, sendo indispensável, no entanto, a fidedignidade das informações.

Diante do exposto, este estudo teve como objetivos verificar as condições higiênico-sanitárias, a presença de micro-organismos potencialmente patogênicos, assim como avaliar os dizeres de rotulagem de amostras de queijos Minas Frescal, comercializadas na região de Ribeirão Preto-SP.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização deste estudo foram utilizadas 30 amostras (oito caseiras e 22 industrializadas) de queijo Minas Frescal, adquiridas aleatoriamente em supermercados, feiras livres e mercados municipais da cidade de Ribeirão Preto-SP e região, coletadas no período de agosto a novembro de 2009.

Vinte e duas amostras (nove tradicionais e 13 *light*) foram consideradas industrializadas por possuírem rótulo contendo as devidas informações e serem inspecionadas pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF). As oito amostras restantes (seis tradicionais e duas *light*), apesar de estarem

condicionadas em embalagem plástica, fechada com feixe metálico, não continham qualquer informação sobre seu conteúdo, origem, data de fabricação e/ou validade, sendo consideradas caseiras. O peso líquido de cada amostra era de aproximadamente 0,500 Kg.

Esses queijos foram avaliados quanto a suas condições higiênico-sanitárias, por meio dos seguintes parâmetros microbiológicos: *Listeria monocytogenes*, conforme método de análise descrito no BAM/FDA¹⁹, e coliformes totais/termotolerantes, estafilococos coagulase-positiva, *Shigella* spp. e *Salmonella* spp., segundo Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods²⁰.

A enumeração de coliformes totais foi realizada com a finalidade de complementar os dados sobre o nível de contaminação desses produtos por bactérias indicadoras de higiene. Por outro lado, em estudos como o de Garcia et al.²¹, podemos verificar a ocorrência de surtos alimentares por *Shigella* spp., o que torna relevante a pesquisa desse patógeno em queijos Minas Frescal.

A existência de não conformidades em relação aos dizeres de rotulagem foi avaliada de acordo com as legislações brasileiras em vigor^{17, 22-25}. Além dos itens obrigatórios, algumas informações úteis também foram avaliadas, tais como: telefone ou SAC, e-mail ou site da empresa e/ou caixa postal. Todos os procedimentos foram realizados no Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas do Instituto Adolfo Lutz – Centro de Laboratório Regional de Ribeirão Preto VI.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nas análises microbiológicas (Tabela 1) evidenciam a baixa qualidade higiênico-sanitária das amostras de queijo Minas Frescal avaliadas, sendo que a contaminação encontrada em algumas amostras representa um risco potencial à saúde do consumidor.

A maioria dos queijos avaliados (90%) apresentou populações de coliformes totais acima de $1,1 \times 10^3$ NMP/g (Tabela 1). Tal resultado é similar ao encontrado por Ferreira et al.²⁶, que, ao avaliarem a qualidade microbiológica de 20 amostras de queijos Minas Frescal comercializadas em feiras livres da cidade de Uberlândia-MG, obtiveram populações de coliformes totais superiores a $1,0 \times 10^3$ NMP/g em 70% do total de amostras analisadas, evidenciando, assim, o alto nível de contaminação desses produtos. Populações elevadas de micro-organismos indicadores de higiene no produto final

Tabela 1. Populações de coliformes totais, coliformes termotolerantes e estafilococos coagulase positiva em amostras de queijo Minas Frescal comercializadas na região de Ribeirão Preto, SP, Brasil

Amostras	Tipo de fabricação	Coliformes	Coliformes	Estafilococos
		Totais (NMP/g) ¹	Termotolerantes (NMP/g) ¹	coagulase positiva (UFC/g) ²
1	Industrializada	>1,1x10 ⁵	>1,1x10 ⁵	<10 ²
2	Industrializada	>1,1x10 ⁵	<0,3	<10 ²
3	Industrializada	4,6x10 ⁴	4,6x10 ⁴	<10 ²
4	Industrializada	>1,1x10 ⁵	<0,3	<10 ²
5	Industrializada	<0,3	<0,3	<10 ²
6	Industrializada	>1,1x10 ⁵	>1,1x10 ⁵	<10 ²
7	Industrializada	<0,3	<0,3	<10 ²
8	Industrializada	>1,1x10 ⁵	1,1x10 ⁴	3,9x10 ⁵
9	Industrializada	>1,1x10 ⁵	>1,1x10 ⁵	<10 ²
10	Industrializada	>1,1x10 ⁵	>1,1x10 ⁵	<10 ²
11	Industrializada	>1,1x10 ⁵	3,6x10 ²	<10 ²
12	Industrializada	<0,3	<0,3	<10 ²
13	Industrializada	>1,1x10 ⁵	>1,1x10 ⁵	<10 ²
14	Industrializada	>1,1x10 ⁵	4,6x10 ⁴	<10 ²
15	Industrializada	1,1x10 ⁴	4,6x10 ²	<10 ²
16	Industrializada	>1,1x10 ⁵	>1,1x10 ⁵	<10 ²
17	Industrializada	>1,1x10 ⁵	>1,1x10 ⁵	<10 ²
18	Industrializada	>1,1x10 ⁵	1,1x10 ⁵	<10 ²
19	Industrializada	>1,1x10 ⁵	2,4x10 ²	<10 ²
20	Industrializada	>1,1x10 ⁵	1,1x10 ³	3,1x10 ⁷
21	Industrializada	>1,1x10 ⁵	3,9x10 ¹	<10 ²
22	Industrializada	>1,1x10 ⁵	2,4x10 ⁴	<10 ²
23	Caseira	>1,1x10 ⁵	1,1x10 ³	<10 ²
24	Caseira	>1,1x10 ⁵	4,6x10 ⁴	1,3x10 ⁶
25	Caseira	>1,1x10 ⁵	2,4x10 ³	<10 ²
26	Caseira	>1,1x10 ⁵	3,9x10 ³	<10 ²
27	Caseira	>1,1x10 ⁵	1,1x10 ⁵	<10 ²
28	Caseira	>1,1x10 ⁵	4,6x10 ³	<10 ²
29	Caseira	>1,1x10 ⁵	1,2x10 ⁴	<10 ²
30	Caseira	>1,1x10 ⁵	1,1x10 ⁵	6,4x10 ⁷

¹ Número mais Provável por grama; ² Unidade Formadora de Colônia por grama

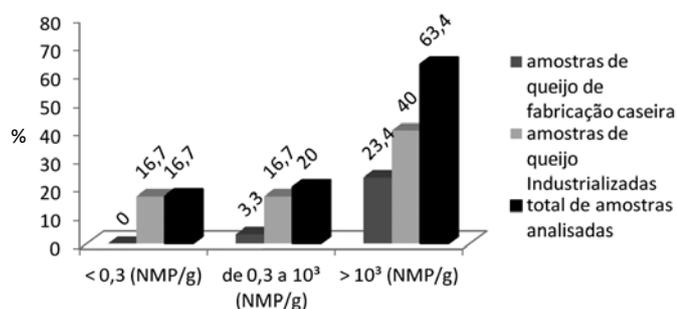


Figura 1. Populações de coliformes termotolerantes em amostras de queijo Minas Frescal comercializadas na região de Ribeirão Preto, SP, Brasil

sugerem que o queijo pode ter sido produzido com matéria prima de má qualidade ou que houve falhas ao longo do processo de fabricação e armazenamento do mesmo^{11,12}.

Do total de amostras de queijo Minas Frescal analisadas, observou-se que 63,4% apresentaram populações de coliformes termotolerantes acima de 1,1 x 10³ NMP/g, sendo que 23,4% e 40,0% correspondiam às amostras de queijos dos tipos caseiro e industrializado, respectivamente, confirmando que a contaminação encontrada nas amostras industrializadas foi maior que a encontrada nas consideradas caseiras (Figura 1). Contudo, esses resultados diferem dos encontrados por Salotti et al.²⁷, que também avaliaram a qualidade microbiológica de 60 amostras de queijo Minas Frescal e evidenciaram índices de contaminação maiores em amostras consideradas caseiras em relação às amostras submetidas ao Serviço de Inspeção Federal (SIF).

No Brasil, já foram realizados vários estudos que tinham por finalidade avaliar a qualidade microbiológica de amostras de queijo Minas Frescal. Gonzales et al.²⁸ analisaram 44 amostras comerciais de queijo Minas Frescal, das quais conseguiram isolar 385 linhagens de *Escherichia coli*, sendo cinco cepas enteropatogênicas. Ferreira et al.²⁶ avaliaram a qualidade microbiológica de queijos Minas Frescal comercializados em feiras livres da cidade de Uberlândia-MG e encontraram populações de coliformes termotolerantes acima de 1,0 x 10³ NMP/g em 65% das 20 amostras avaliadas. Ao investigarem a qualidade de 30 amostras de queijo Minas Frescal, Peresi et al.²⁹ constataram que 43,3% das amostras artesanais também continham elevadas populações de coliformes termotolerantes. Rocha et al.⁷ também avaliaram as condições de processamento e comercialização de 26 lotes de sete marcas diferentes de queijos Minas Frescal e observaram que a maioria (61%) das amostras analisadas estava contaminada por coliformes termotolerantes. Todos esses resultados são similares ao do presente estudo, no qual 50% e 53,3% das amostras dos tipos caseiro e industrializado, respectivamente, apresentaram populações desses micro-organismos indicadores acima de 5,0 x 10³ NMP/g (Tabela 1).

Lisita et al.¹¹ realizaram, em um laticínio com capacidade média de processamento de quatro mil litros de leite, o monitoramento da produção de queijo Minas Frescal e encontraram altas populações de coliformes termotolerantes. Aqueles autores consideraram as etapas de coagulação e de corte como as principais responsáveis pela contaminação por coliformes no laticínio monitorado.

A salmoura também pode recontaminar o produto e, por isso, conforme o regulamento de inspeção industrial e sanitária dos produtos de origem animal é proibido o emprego de salmouras turvas e sujas, sendo somente permitida a recuperação dessas salmouras após fervura e filtração. Esse regulamento não estabelece critérios microbiológicos para as salmouras, dificultando um controle mais rígido dessas³⁰.

Na Tabela 1 podemos observar que quatro amostras, duas industrializadas e duas caseiras, continham populações de estafilococos coagulase-positiva acima de $1,0 \times 10^5$ UFC/g. Esse resultado é preocupante, uma vez que a intoxicação estafilocócica pode ocorrer com a ingestão de alimento contaminado com menos de $1,0 \mu\text{g}$ de toxina produzida por *Staphylococcus aureus*. Essa quantidade de toxina é produzida quando a população desse patógeno é maior ou igual a $1,0 \times 10^5$ UFC/g do alimento e em um meio com atividade de água igual ou superior a $0,86$ ³¹. *S. aureus* encontra-se largamente distribuído no meio ambiente e tem como principal habitat a pele, glândulas e membranas mucosas do homem e animais. A presença desse micro-organismo no leite e em seus produtos pode sugerir a utilização de matéria-prima proveniente de animais infectados (mastite) ou uma provável contaminação por manipuladores portadores assintomáticos⁸.

Muitos são os relatos sobre a elevada contaminação de queijos, principalmente queijos “frescos”, por estafilococos coagulase-positiva. Loguercio e Aleixo³² isolaram estafilococos coagulase-positiva, com populações acima de $1,0 \times 10^3$ UFC/g em 96,67% das 30 amostras que avaliaram de queijo Minas Frescal produzidas em Cuiabá-MT. Similarmente, em outro estado brasileiro, Carvalho et al.³³ pesquisaram a contaminação microbiológica de amostras de leites e queijos vendidos em Alfenas-MG e encontraram populações de estafilococos coagulase-positiva acima de $1,0 \times 10^3$ UFC/g, em 47,83% e 34,78% das 46 amostras de queijo Minas Frescal (23 caseiras e 23 industrializadas) avaliadas, respectivamente. Ao investigarem os alimentos e patógenos responsáveis pela ocorrência de dois surtos alimentares em Minas Gerais, Carmo et al.³⁴ coletaram amostras de queijos e leite *in natura*. No primeiro surto, 50 pessoas adoeceram após a ingestão de queijo Minas Frescal e no segundo surto, 328 pessoas apresentaram sintomas (diarreia, vômitos, tonturas, calafrios e dores de cabeça) após a ingestão de leite *in natura*. Os resultados obtidos mostraram que *S. aureus* estava presente ($2,4 \times 10^2$ a $2,0 \times 10^8$ UFC/g) e produziu as enterotoxinas SEA, SEB e SEC.

Em outros países também é grande a preocupação com a presença de micro-organismos patogênicos nos produtos de leite, principalmente o queijo, oferecidos à população. No Reino Unido, Little et al.³⁵ verificaram a qualidade de queijos produzidos com leite *in natura* e leite pasteurizado. De acordo com os autores, os dois tipos de queijo apresentaram elevadas populações de estafilococos coagulase-positiva, $1,0 \times 10^3$ UFC/g para queijos produzidos com leite pasteurizado e $1,0 \times 10^4$ UFC/g para queijos produzidos com leite *in natura*. Em um estudo realizado por Almeida et al.³⁶, em Portugal, com 70 amostras de queijos fabricados com leite *in natura*, os autores observaram que 37 amostras estavam insatisfatórias por conterem populações de *Escherichia coli* e/ou *Staphylococcus aureus* com populações acima de 10^2 , sendo 11 amostras consideradas inaceitáveis e potencialmente perigosas por conterem *S. aureus* e/ou *Salmonella* spp. ou *L. monocytogenes*.

Shigella spp., *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* não foram detectadas no presente estudo. A ausência desses micro-organismos potencialmente patogênicos, dentre vários motivos, pode ter ocorrido devido à baixa capacidade de competição dessas espécies, em relação às outras bactérias presentes nos queijos analisados. Peresi et al.²⁹, ao avaliarem a qualidade microbiológica de 60 amostras de queijo Minas adquiridas em feiras livres da cidade de São José do Rio Preto-SP, também não encontraram *L. monocytogenes*. Porém, isolaram *Salmonella* spp. de duas (6,7%) amostras.

Neste estudo, foi constatada a presença de *L. innocua* em 5% do total de amostras de queijo Minas Frescal analisadas. Esse resultado foi semelhante ao encontrado por Feitosa et al.³⁷, que detectaram *Listeria* spp. em 9% do total de amostras de queijos, produzidos no Estado do Rio Grande do Norte. A detecção de apenas uma espécie de *Listeria* (*L. innocua*) no presente estudo corrobora o relato de Farber e Peterkin³⁸, de que as espécies *L. innocua* e *L. monocytogenes* são mais comumente encontradas em alimentos.

A frequência dos casos de listeriose veiculados por queijos evidencia a importância desse alimento e outros derivados do leite na cadeia epidemiológica de transmissão de *Listeria* spp. Diversos surtos de doenças graves têm sido associados à ingestão de produtos lácteos, em razão principalmente da presença de *L. monocytogenes*¹¹. De acordo com Vasconcelos e Marin³⁹, no Brasil ainda é escasso o acervo literário sobre o consumo de queijo e a ocorrência de casos de listeriose e sua severidade, sendo que essas

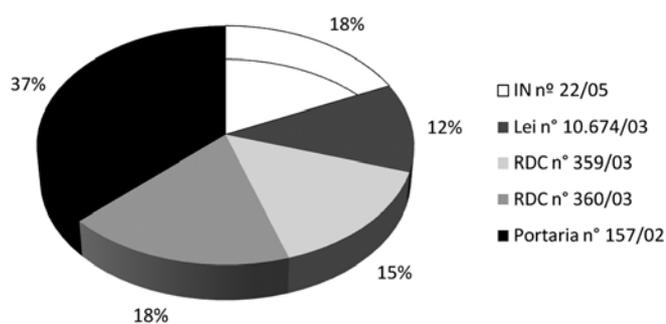


Figura 2. Distribuição percentual dos rótulos das amostras de queijo Minas Frescal em desacordo, segundo as normas legais vigentes

informações são imprescindíveis para estudos detalhados sobre avaliação de risco de *L. monocytogenes* em queijo Minas Frescal, proveniente de vários estados brasileiros.

Quanto ao não isolamento de *Shigella* spp., Pereira e Silva⁴⁰ confirmam em seu estudo que as shigelas são fracas competidoras frente a metabólitos de outras bactérias, como a formação de ácidos por *Klebsiella* spp., *Proteus* spp. e *E. coli*. Ressaltam ainda a dificuldade de encontrar um método que seja o ideal para isolar esse micro-organismo em alimentos.

Os problemas com a produção de queijo no Brasil estão relacionados às péssimas condições do leite produzido, às condições de fabricação dos queijos e à falta ou ineficiência do sistema de refrigeração ao longo da cadeia produtiva, que agravam a situação e criam condições de contaminação e multiplicação de micro-organismos⁷. A qualidade e a durabilidade de um produto dependem, em grande parte, da matéria-prima utilizada na sua fabricação. É difícil melhorar a qualidade de um produto, se o número de micro-organismos inicialmente presente no leite *in natura* for elevado⁶.

Quanto à avaliação da conformidade dos dizeres de rotulagem das embalagens de queijos Minas Frescal analisadas, foi constatado que 71% das amostras consideradas industrializadas estavam em desacordo com a legislação em vigor²³.

Em relação à Instrução Normativa nº 22/05¹⁷, 18% das amostras (Figura 2) apresentaram-se em desacordo por não apresentarem listagem de ingredientes e/ou indicação de origem, mas também, principalmente, devido ao prazo de validade estar expresso por período. Segundo a legislação, deve constar pelo menos o dia e o mês para produtos que tenham prazo de validade não superior a três meses ou o mês e o ano para todos os produtos que tenham prazo de validade superior a três meses.

Já para a Lei nº 10.674/03²², 12% dos rótulos não apresentavam a expressão “não contém glúten” ou a apresentavam de forma incorreta, sem o destaque, nitidez e facilidade de leitura que é exigido pela legislação (Figura 2). Câmara et al.¹⁸ ressaltam que a presença de glúten é prejudicial para portadores da doença celíaca, que é classificada como uma intolerância permanente ao glúten (proteína do trigo), doença esta que agride e danifica o intestino, prejudicando a absorção dos alimentos.

A Resolução nº 359/03²³ estabelece as porções em medidas caseiras de alimentos embalados para fins de rotulagem nutricional e, conforme observado na Figura 2, 15% dos rótulos não apresentaram essas porções caseiras ou, quando presentes, as mesmas estavam expressas de forma incorreta.

Considerando a Resolução nº 360/03²⁴, 18% dos rótulos apresentaram-se em desacordo (Figura 2), principalmente devido à não adequação das indústrias à legislação em vigor, que obriga a rotulagem nutricional e, ainda, a declaração dos seguintes nutrientes: valor energético, carboidratos, proteínas, gorduras totais, gorduras saturadas, gorduras *trans*, fibra alimentar e sódio. Muitas indústrias ainda utilizam a antiga rotulagem nos seus produtos, o que pode ocasionar confusão e escolha equivocada do produto por parte do consumidor.

A Portaria nº 157/02²⁵ estabelece a forma de expressar a indicação quantitativa do conteúdo líquido dos produtos pré-medidos e 37% dos rótulos apresentaram problemas para expressar essa indicação (Figura 2). Na maioria das amostras o principal problema encontrado foi com relação às etiquetas que o estabelecimento comercial colocou nas embalagens, uma vez que o produto queijo tipo Minas Frescal deve ser pesado na presença do consumidor. Essas etiquetas continham os pesos líquidos dos queijos, porém de uma maneira incorreta, muitas vezes com abreviaturas, o que pode induzir o consumidor ao erro.

Segundo Câmara et al.¹⁸ é inegável a contribuição do conjunto de normas e leis à rotulagem, no entanto é necessário tornar prática a legislação por meio de uma fiscalização mais rigorosa, para que o consumidor possa exercer a vigilância sobre o que compra e, sobretudo, consome.

CONCLUSÃO

As elevadas populações de coliformes totais, coliformes termotolerantes e/ou estafilococos coagulase-positiva encontradas na maioria das amostras

avaliadas sugerem o uso de matérias-primas de baixa qualidade, como leite *in natura*, condições inadequadas de processamento ou ainda armazenamento e transporte dos produtos inadequados. De um modo geral, as amostras consideradas industrializadas evidenciaram contaminação maior do que as amostras consideradas caseiras. Tal resultado vem a confirmar ainda mais a necessidade de uma fiscalização mais efetiva, por parte dos órgãos competentes.

A segurança microbiológica de um produto só é possível quando conseguimos atuar em todas as fases de fabricação do alimento, minimizando os níveis iniciais de contaminação, prevenindo ou limitando o potencial de multiplicação de micro-organismos deteriorantes e eliminando aqueles potencialmente patogênicos.

Cabe às indústrias a utilização de matérias-primas de qualidade e a implementação de boas práticas de fabricação nas linhas de produção desses produtos. Ressalta-se também a importância das informações que são colocadas nos rótulos das embalagens, não induzindo o consumidor a erros que possam causar riscos à sua saúde. Ressalta-se, ainda, a necessidade de uma fiscalização mais efetiva e direcionada ao cumprimento fiel das normas existentes relacionadas à rotulagem desse tipo de alimento.

REFERÊNCIAS

1. Dias B. Manual de queijos. In: Supermercado moderno. 2009; p. 50-6. [acesso 2010 Abr. 10]. Disponível em: [http://www.sm.com.br/publique/media/Manual_Queijos_2009_08.pdf].
2. Melo ACM, Alves LMC, Costa FN. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo tipo Minas Padrão comercializado na cidade de São Luis, MA. *Arq Inst Biol*. 2009; 76 (4): 547-51.
3. Perry KSP. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. *Quim Nova*. 2004; 27 (2): 293-300.
4. Rudolf M, Scherer S. High incidence of *Listeria monocytogenes* in European red smear cheese. *Int J Food Microbiol*. 2001; 63 (1/2): 91-8.
5. Oliver SP, Boor KJ, Murphy SC, Murinda SE. Food safety hazards associated with consumption of raw milk. *Foodborne Pathog Dis*. 2009; 6 (7): 793-806.
6. Makino SI, Kawamoto K, Takeshi K, Okada Y, Yamasaki M, Yamamoto S et al. An outbreak of food-borne listeriosis due to cheese in Japan, during 2001. *Int J Food Microbiol*. 2005; 104 (2): 189-96.
7. Rocha JS, Buriti FCA, Saad SMI. Condições de processamento e comercialização de queijo-de-minas frescal. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2006; 58 (2): 263-72.
8. Lejeune JT, Rajala-Schultz PJ. Unpasteurized Milk: A Continued Public Health Threat. *Clin Infect Dis*. 2009; 48 (1): 93-100.
9. De Buyser ML, Dufour B, Maire M, Lafarge V. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialized countries. *Int J Food Microbiol*. 2001; 67 (1/2): 1-17.
10. Carvalho JDG, Viotto WH, Kuaye AY. The quality of Minas Frescal cheese produced by different technological processes. *Food Control*. 2007; 18 (3):262-7.
11. Lisita MO, Porto E, Cruz AG, Faria JAF, Sant'Ana AS. Monitoramento Microbiológico no Processamento do Queijo Minas Frescal. *Rev Leite Deriv*. 2009; 110 (17): 82-9.
12. Pereira ML, Gastelois MCA, Bastos EMAF, Caiaffa WT, Faleiro ESC. Enumeração de coliformes fecais e presença de *Salmonella* sp. em queijo Minas. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 1999; 51 (5): 427-31.
13. Oliver SP, Jayarao BM, Almeida RA. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. *Foodborne Pathog Dis*. 2005; 2 (2): 115-29.
14. Almeida Filho ES, Lindner AL, Almeida DS, Sigarini CO, Ferreira MB. Perfil microbiológico de queijo tipo Minas Frescal, de produção artesanal e inspecionada, comercializado no município de Cuiabá, MT. *Hig Aliment*. 2002; 16 (92/93): 51-6.
15. Laticínio.net. Informações técnicas: tipos diferentes de queijos minas. [acesso 2011 Mai. 13]. Disponível em: [http://www.laticinio.net/inf_tecnicas.asp?cod=292].
16. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1, nº 7-E. p. 45-53.
17. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 22, de 24 de novembro de 2005. Aprova o Regulamento Técnico para Rotulagem de Produto de Origem Animal Embalado. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 25 nov. 2005. Seção 1, nº 226. p. 15-6.
18. Câmara MCC, Marinho CLC, Guilam MC, Braga AMCB. A produção acadêmica sobre a rotulagem de alimentos no Brasil. *Rev Panam Salud Publica*. 2008; 23 (1): 52-8.
19. Hitchins AD. Food and Drug Administration (FDA)/Center for Food and Safety & Applied Nutrition (CFSAN). 2003. Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. *Bacteriological Analytical Manual*. [acesso 2009 Jul. 08]. Disponível em: [http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-10.html].
20. Downes FP, Ito K. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4th ed. Washington, D. C.: American Public Health Association (APHA); 2001.
21. Garcia-Fulgueiras A, Sanches S, Guillén JJ, Marsilha B, Aladueña A, Navarro C. A large outbreak of *Shigella sonnei* gastroenteritis associated with consumption of fresh pasteurised milk cheese. *Eur J Epidemiol*. 2001; 17 (6): 533-8.
22. Brasil. Lei Federal nº 10.674, de 16 de maio de 2003. Obriga a que os Produtos Alimentícios Comercializados Informem sobre a Presença de Glúten, como Medida Preventiva e de Controle da Doença Celíaca. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 19 maio 2003. p. 1.
23. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 359, de 23 de dezembro de 2003. Regulamento Técnico de Porções de Alimentos Embalados para Fins de Rotulagem Nutricional. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 26 dez. 2003.

24. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 360, de 20 de dezembro de 2003. Regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 26 dez. 2003.
25. Brasil. Portaria INMETRO nº 157, de 19 de agosto de 2002. Aprova o Regulamento Técnico Metrológico, Estabelecendo a Forma de Expressar a Indicação Quantitativa do Conteúdo Líquido dos Produtos Pré-Medidos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 20 ago. 2002.
26. Ferreira RM, Spini JCM, Carrazza LG, Santa'ana DS, Oliveira MT, Alves LR, Carrazza, TG. Quantificação de coliformes totais e termotolerantes em queijo Minas Frescal artesanal. *PUBVET*. 2011; 5 (5): Ed. 152, Art 1022.
27. Salotti BM, Carvalho ACFB, Amaral LA, Vidal-Martin AMC, Cortez A.L. Qualidade Microbiológica do Queijo Minas Frescal comercializado no Município de Jaboticabal, SP, Brasil. *Arq Inst Biol*. 2006; 73 (2): 171-5.
28. Gonzalez AGM, Rosa ACP, Andrade JRC, Tibana A. Enteropathogenicity markers in *Escherichia coli* strains isolates from soft white cheese and poultry in Rio de Janeiro, Brazil *Food Microbiol*. 2000; 17 (3): 321-8.
29. Peresi JTM, Graciano RAS, Almeida IAZC, Lima SI, Ribeiro AK, Carvalho IS et al. Queijo Minas tipo frescal artesanal e industrial: qualidade microscópica, microbiológica e teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos. *Hig Aliment*. 2001; 15 (83): 63-70.
30. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Decreto nº 2244, de 04 de junho de 1997. Aprova o Regulamento Técnico de Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 05 jun. 1997. Seção 1, p. 11555.
31. Food and Drug Administration/Center for Food Safety & Applied Nutrition (FDA/CFSAN). Foodborn pathogenic microorganisms and natural toxins handbook. The "Bad Bug Book". 1998. [acesso 2009 Dez. 12]. Disponível em: [<http://www.cfsan.fda.gov/~mow/intro.html>].
32. Loguercio AP, Aleixo JAG. Microbiologia de queijo tipo Minas Frescal produzido artesanalmente. *Cien Rural*. 2001;31(6): 1063-7.
33. Carvalho PLN, Carvalho PR, Hofer EC, Reis EMF, Veiga SMOM. Research about *Listeria* sp., *Salmonella* sp. and others contamination indicators to Milk's and Cheese's samples sale in the south of Minas Gerais State. *Aust J Basic Appl Sci*. 2009; 3 (4): 4422-31.
34. Carmo SL, Dias RS, Linardi RV, Sena, MJ, Santos AD, Faria ME, Pena EC, Jett M, Heneine G. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas Cheese and raw milk in Brasil. *Food Microbiol*. 2002; 19 (1): 9-14.
35. Little CL, Rhoades JR, Sagoo SK, Harris J, Greenwood M, Mithani V, Grant K, McLauchlin J. Microbiological quality of retail cheeses made from raw, thermized or pasteurized milk in the UK. *Food Microbiol*. 2008; 25 (2): 304-12.
36. Almeida G, Figueiredo A, Rôla M, Barros RM, Gibbs P, Hogg T, Teixeira P. Microbiological Characterization of Randomly Selected Portuguese Raw Milk Cheeses with Reference to Food Safety. *J Food Prot*. 2007; 70 (7): 1710-6.
37. Feitosa T, Borges M.F, Nassu RT, Azevedo EHF, Muniz CR. Pesquisa de *Salmonella* sp., e *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. *Cien Tecn Alimen*. 2003; 23 (supl.): 162-5.
38. Farber JM, Peterkin PI. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev*. 1991; 55 (3): 476-511.
39. Vasconcelos RM, Marin VA. *Listeria monocytogenes* em Queijo Minas Frescal e Critérios para a Avaliação de Risco. *Rev Segurança Alimentar e Nutricional*. 2008; 15 (2): 32-45.
40. Pereira ML, Silva EN. *Shigella* em Alimentos. *Hig Aliment*. 1993; 7 (25): 5-11.

Características físico-químicas e sensoriais de pão de forma enriquecido com concentrado proteico de soro de leite e carbonato de cálcio¹

Physical-chemical and sensory characteristics of sandwich loaf enriched with whey protein concentrate and calcium carbonate

RIALA6/1338

Naára Medeiros Araújo Lima OLIVEIRA*, Janeeyre Ferreira MACIEL, Adriana de Sousa LIMA, Érica Menezes SALVINO, Carine Ellen Pinto MACIEL, Diva Priscilla Menezes Nery de OLIVEIRA, Larissa Raphaela Gonçalves de FARIAS

*Endereço para correspondência: Departamento de Tecnologia e Química de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária, s/n, Campus Universitário I, Bairro Castelo Branco, João Pessoa, Paraíba, PB, Brasil, CEP: 58051-900, tel: 83 3216-7384, e-mail: naara-jp@ig.com.br

Recebido: 10.12.2010 – Aceito para publicação: 31.03.2011

¹ Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Lauro Wanderley da Universidade Federal da Paraíba em processo de número 0120/2009, com base na Resolução nº 196/96 do CNS/MS.

RESUMO

Neste estudo foi produzida uma nova formulação de pão de forma, com adição de concentrado proteico de soro de leite (CPS) e carbonato de cálcio, em concentrações que resultassem em produto final rico em cálcio, considerando-se que a média nacional de ingestão desse mineral encontra-se bem abaixo do recomendado. Foram elaboradas quatro formulações de pães de forma. As amostras de massa fresca e os produtos prontos foram submetidos às análises de pH e acidez. O volume específico foi realizado somente nos produtos prontos. Todas as amostras de pães foram avaliadas quanto à aceitação, e o teor de cálcio foi determinado nas formulações F1, F2 e F3. A composição química foi determinada nos pães selecionados na etapa sensorial e com teor mínimo de cálcio de 300 mg/100 g de pão. Todos os produtos foram aceitos, obtendo-se escores médios acima de 6,0 (“gostei ligeiramente”). A formulação F2 mostrou melhor aceitação quanto aos atributos sabor, maciez e aparência e teor de cálcio de 697 mg/100 g de pão. O uso de 7,5% de CPS permitiu obter um produto fonte de proteínas, e a complementação de 2% de carbonato de cálcio elevou o teor desse mineral a aproximadamente 70% da IDR de adultos, tornando o alimento rico em cálcio.

Palavras-chave. pão de forma, concentrado proteico de soro, carbonato de cálcio, valor nutritivo.

ABSTRACT

Aiming at increasing the protein and calcium contents in sandwich loaf, formulations were prepared by adding whey protein concentrate (WPC) and the calcium carbonate in order to get an end calcium-enriched product, whereas the national average of dietary calcium intake is rather below the recommended one. Four formulations of breads were prepared. Samples of fresh dough and end breads were analyzed on pH and acidity. The specific volume was analyzed only on end breads. All of bread formulations were evaluated on acceptance criterium, and the calcium contents were determined in F1, F2 and F3. The chemical composition was determined in bread samples selected for the sensorial tests and containing a minimum calcium content of 300 mg/100 g bread. All the products were well accepted, and the mean scores were above 6.0 (“like it slightly”). The formulation F2 showed the best acceptance for flavor, tenderness and appearance, and the calcium contents were of 697 mg/100 g bread. The use of 7.5% of WPC achieved to be a source of protein, and by complementing with 2% calcium carbonate increased this mineral contents in approximately 70% of the DRI for adults, turning into a product rich in calcium.

Keywords. sandwich loaf, whey protein concentrate, calcium carbonate, nutritive value.

INTRODUÇÃO

No Brasil, alguns estudos sobre consumo alimentar mostram que dos nutrientes avaliados o cálcio é o que apresenta maior inadequação¹⁻⁴. Pinheiro et al.⁵, ao conduzirem uma pesquisa com 2.420 pessoas acima de 40 anos, em 150 municípios das cinco regiões do país, revelaram que 90% dos entrevistados ingeriam, em média, 400 mg de cálcio, o que equivale a 40% do recomendado pela IDR (Ingestão Diária Recomendada) para esse grupo populacional⁶.

A falta de cálcio resulta em distúrbios orgânicos, tais como raquitismo, retardo do crescimento e osteoporose⁷. Além da perda de massa óssea, pode acarretar câibras e irritabilidade, por ser um mineral necessário na transmissão nervosa e na regulação dos batimentos cardíacos⁸.

A prevenção à deficiência nutricional de cálcio deveria ser alcançada, preferencialmente, por meio da ingestão de alimentos fontes e ricos nesse mineral, tais como leite e derivados, vegetais de folhas verdes, nozes e peixes. No entanto, alguns fatores como o custo elevado de alguns alimentos, hábitos culturais e alimentares limitam o consumo desse micronutriente^{9,10}.

Outras estratégias que podem ser adotadas para minimizar os danos causados pela deficiência de cálcio são a fortificação de alimentos e a suplementação com esse mineral em populações de risco.

O pão tem sido muito usado para fins de enriquecimento nutricional, especialmente por ser uma das principais fontes calóricas da dieta em muitos países e ser amplamente consumido por indivíduos de diversas classes sociais^{11,12}.

A adição de leite e/ou derivados às formulações de pães contribui para a elevação no teor de cálcio, destacando-se dentre os derivados o soro de leite em pó e o concentrado proteico de soro (CPS).

Rodrigues¹³, ao adicionar 7,5% de CPS à formulação de pão de forma, encontrou teor de cálcio médio de 134,63 mg/100 g pão, sendo essa concentração insuficiente para classificar o produto final como alimento fonte de cálcio para adultos. A adição de concentração mais elevada desse ingrediente (10%) resultou em produto final com baixa umidade, devido à menor capacidade de absorção de água da massa durante a mistura. Portanto, em excesso, as proteínas do soro de leite poderão ter efeitos negativos nas características sensoriais dos pães, devido à interação entre essas proteínas e as proteínas do glúten¹⁴.

Uma solução para incrementar o percentual de cálcio na composição química do pão é adicionar sais inorgânicos, que parecem ser tão bem absorvidos e retidos como os sais orgânicos¹¹.

Dentre os sais de cálcio utilizados para o enriquecimento de alimentos, destacam-se fosfato, sulfato e carbonato de cálcio, sendo este último amplamente usado devido a sua alta concentração em cálcio (40%) e por ser economicamente mais barato¹².

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma nova formulação de pão de forma contendo CPS e carbonato de cálcio, em concentrações que permitissem classificar o produto final como alimento rico em cálcio, oferecendo aos consumidores uma importante alternativa de elevação no consumo desse mineral.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

O concentrado proteico de soro de leite em pó (CPS) e o carbonato de cálcio foram fornecidos, respectivamente, pelas empresas ALIBRA Ingredientes Ltda e Plury Química Ltda. Os demais ingredientes usados na elaboração dos pães de forma foram: farinha de trigo especial (1.500 g), água (825 g), fermento biológico seco instantâneo (15 g), sal (25,5 g), açúcar cristal (90 g) e gordura vegetal hidrogenada (45 g), adquiridos em estabelecimentos comerciais de João Pessoa, PB.

Métodos

Formulações e Processo de elaboração dos pães de forma

Um total de quatro formulações de pães de forma foi elaborado, sendo uma convencional (CONV.: sem adição de CPS e sal de cálcio) e três adicionadas de 7,5% de CPS e carbonato de cálcio, cujos percentuais foram 1,5, 2,0 e 2,5% (F1, F2, F3, respectivamente), tomando como base 100 g de farinha de trigo.

Todos os ingredientes secos foram homogeneizados em um misturador tipo espiral, na velocidade lenta por 15 minutos (até atingir o ponto de véu), sendo feita a adição da água refrigerada a 10 °C. Em seguida, a massa fresca, que se encontrava com temperatura de 24 °C, foi boleada e submetida a descanso de 10 minutos, sendo posteriormente dividida em unidades de 750 g. Após modelagem manual, porções individuais foram colocadas em formas (22 x 11 cm), previamente untadas com gordura vegetal

hidrogenada, e transportadas até a câmara de fermentação, permanecendo por, aproximadamente 1 hora e 40 minutos, a $35\pm 1^\circ\text{C}$. Ao final desse processo, os pães foram assados a 200°C por 20 minutos e resfriados por três horas, sendo posteriormente fatiados, embalados em sacos plásticos de polietileno e armazenados à temperatura ambiente até a realização das análises.

Análises físico-químicas

Nesta pesquisa, o termo massa fresca se refere à massa obtida logo após a etapa de mistura, conforme descrito na etapa do processo de elaboração dos pães. Foram coletadas dez gramas de massa fresca, de cada uma das quatro formulações elaboradas, para as determinações de pH¹⁵, em potenciômetro da marca WTW-Germany, modelo 330i, e acidez titulável¹⁵, expressa em mL de NaOH 0,1N consumido por 10 g de pão, até pH 8,5.

Com relação aos produtos prontos, amostras das quatro formulações de pães de forma (CONV.; F1; F2 e F3), obtidas 24 horas após o processamento, foram coletadas para a realização das análises de pH¹⁵, acidez¹⁵, conforme descrito para a massa fresca e volume específico¹⁶. Todas as análises foram efetuadas em triplicata.

Avaliação sensorial

Amostras das formulações CONV.; F1; F2 e F3 foram avaliadas 24 horas após seu processamento, no laboratório de Análise Sensorial da Universidade Federal da Paraíba, em cabines individuais sob luz branca, sendo servidas de forma monádica, em pratos brancos descartáveis codificados (três dígitos aleatórios), acompanhados de ficha de avaliação, um copo com água mineral para enxágue bucal e caneta esferográfica.

O teste de aceitação foi conduzido com 40 provadores não treinados, utilizando escala hedônica estruturada de 9 pontos, com escores variando de 9 “gostei extremamente” a 1 “desgostei extremamente”¹⁷, que avaliaram as amostras em relação aos atributos aparência, maciez e sabor, sendo consideradas aceitas aquelas que obtivessem escores médios iguais ou superiores a 6,0 (equivalente ao termo hedônico “gostei ligeiramente”).

Determinação da concentração de cálcio nos pães

As três formulações de pães de forma enriquecidas com concentrado proteico de soro (7,5%) e carbonato de cálcio, nas concentrações de 1,5, 2 e 2,5%, tiveram o teor de cálcio determinado por volumetria com EDTA (396/IV)¹⁸. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Composição química do produto selecionado

Das quatro formulações de pães de forma elaboradas, apenas uma teve sua composição química determinada, sendo selecionada com base nos resultados dos testes sensoriais e teor de cálcio (mínimo: 300 mg/100 g pão).

O produto final selecionado foi submetido às análises de umidade¹⁸ (012/IV); proteínas¹⁸ (036/IV); lipídios¹⁸ (032/IV); cinzas¹⁸(437/IV); cálcio¹⁸(396/IV); cloretos¹⁸ (028/IV); e carboidratos, por diferença. Todas as análises foram efetuadas em triplicata.

Análise estatística

Os resultados das análises físico-químicas dos pães tiveram, inicialmente, suas médias e desvios-padrão determinados, para posteriormente serem realizados os testes de Shapiro Wilk e Bartlett, a fim de serem verificadas a normalidade e homocedasticidade. Os dados que não se enquadraram na distribuição normal foram submetidos a testes não paramétricos de Kruskal Wallis e Wilcoxon-Mann-Whitney¹⁹. No teste de aceitação, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Todos os dados foram processados utilizando o pacote estatístico “R”, versão 2.9.1¹⁹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação físico-química da massa fresca e dos pães

As médias e os desvios-padrão das determinações físico-químicas provenientes da massa fresca e dos produtos prontos das quatro formulações (CONV.; F1; F2; F3) de pães de forma elaboradas estão apresentados nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Médias e desvios-padrão dos resultados das determinações de pH e acidez da massa fresca dos pães de forma convencional e adicionados de CPS e carbonato de cálcio, em três diferentes concentrações

Variáveis	Massa Fresca			
	CONV	F1	F2	F3
pH*	5,64 ^d ± 0,15	6,64 ^a ± 0,10	6,80 ^b ± 0,08	6,99 ^a ± 0,09
Acidez (mL de NaOH/10g)	3,23 ^a ± 0,49	2,97 ^{ab} ± 0,73	2,61 ^{bc} ± 0,73	2,21 ^c ± 0,44

CONV.: pão de forma sem CPS e carbonato de cálcio; F1: pão de forma contendo 7,5% de CPS e 1,5% de CaCO₃; F2: pão de forma contendo 7,5% de CPS e 2,0% de CaCO₃; F3: pão de forma contendo 7,5% de CPS e 2,5% de CaCO₃

*Médias seguidas de letras iguais na linha não diferem significativamente entre si, pelos testes de ANOVA e Tukey, ao nível de 5% de significância

Tabela 2. Médias e desvios-padrão dos resultados das determinações de pH, acidez e volume específico dos pães de forma convencional e dos adicionados de CPS e carbonato de cálcio, em três diferentes concentrações

Variáveis	Pães de Forma			
	CONV	F1	F2	F3
pH*	5,50 ^a ± 0,25	6,91 ^b ± 0,04	7,06 ^a ± 0,08	7,18 ^a ± 0,09
Acidez*				
(mL de NaOH/ 10g pão)	3,35 ^a ± 0,43	2,00 ^b ± 0,22	1,58 ^c ± 0,20	1,27 ^d ± 0,20
Volume específico**	4,45 ^a ± 0,14	4,62 ^b ± 0,07	4,49 ^a ± 0,08	4,55 ^c ± 0,05

CONV.: pão de forma sem CPS e carbonato de cálcio; F1: pão de forma contendo 7,5% de CPS e 1,5% de CaCO₃; F2: pão de forma contendo 7,5% de CPS e 2,0% de CaCO₃; F3: pão de forma contendo 7,5% de CPS e 2,5% de CaCO₃

*Médias seguidas de letras iguais na linha não diferem significativamente entre si, pelos testes de ANOVA e Tukey, com nível de 5% de significância

**Médias seguidas de letras iguais na linha não diferem significativamente entre si, pelos testes de Kruskal Wallis e Wilcoxon-Mann-Whitney (teste U), ao nível de 5% de significância

O pH médio da massa fresca, para todas as quatro formulações de pães de forma avaliadas, variou de 5,64 a 6,99, tendo sido verificada elevação do mesmo com o aumento na concentração de carbonato de cálcio. O aumento no pH foi acompanhado por redução gradativa da acidez, de 3,23 para 2,21 mL de NaOH 0,1N/10 g pão. Esses efeitos atribuídos ao carbonato de cálcio já eram esperados, tendo em vista seu uso extensivo como aditivo regulador de acidez em diversos grupos de alimentos^{20,21}.

Segundo Quaglia²², as condições ótimas para o desenvolvimento das leveduras, durante a fermentação da massa fresca, são estabelecidas com valores de pH em torno de 5,0. Quando essa variável atinge valores acima de 6,0, a fermentação pode ficar prejudicada, favorecendo a produção excessiva de glicerina e ácido acético, além do álcool etílico. Como consequência, podem ocorrer problemas de qualidade sensorial nos pães, como sabor desagradável e volume reduzido, o que interfere diretamente na textura do produto.

Os valores médios de pH e acidez do pão de forma convencional foram próximos aos verificados na massa fresca desse tipo de pão (Tabela 2). Martinez-Anaya et al.²³ também verificaram pequena variação de pH e acidez entre massa fresca e pães prontos. Quando os pães

contendo carbonato de cálcio foram comparados com suas respectivas massas frescas, foi verificado aumento no pH e redução na acidez (Tabela 2), indicando que a presença do sal de cálcio favoreceu uma maior desacidificação dos pães após o assamento.

O volume específico dos pães de forma ficou acima de 4,0 cm³/g, variando de 4,45 cm³/g a 4,62 cm³/g, resultados considerados satisfatórios quando comparados aos valores encontrados em outros estudos envolvendo pães^{13,24,25,26}. Os pães adicionados de carbonato de cálcio, nas diferentes concentrações testadas, ao contrário do que se esperava, apresentaram aumento ou mantiveram o volume específico similar ao do pão de forma convencional. Esse comportamento também foi verificado por Kajishima et al.¹², ao avaliarem o desempenho de pães tipo francês elaborados com farinha de trigo enriquecida com alguns sais de cálcio.

Um dos fatores que pode ter contribuído para a obtenção de resultados satisfatórios nas determinações de volume dos pães com cálcio foi a adição do concentrado proteico de soro de leite (CPS), que esteve ausente no pão convencional e presente na concentração de 7,5%, nas três formulações que receberam o sal de cálcio. Kulp et al.²⁷ afirmaram que a adição de proteínas do soro de leite ao pão de forma contribui para aumento no volume específico. Caldas²⁸ obteve volume específico de 4,0 cm³/g para o pão de forma com soro de leite fluido. Azevedo²⁴ e Rodrigues¹³ encontraram valores acima de 4,0 cm³/g para o volume específico de pães de forma adicionados de soro de leite em pó e concentrado proteico de soro (CPS), respectivamente.

Gurgel²⁶ observou redução no volume específico de pães de forma enriquecidos com 3% de carbonato de cálcio e 7,5% de soro de leite em pó. Ranhotra et al.²⁹ mostraram que quantidades em torno de 300 mg de cálcio em 453,6 g de pão não provocam efeito desfavorável na qualidade do produto.

Avaliação sensorial dos pães

Os resultados dos testes de aceitação realizados com as quatro formulações de pães de forma adicionados de CPS e carbonato de cálcio (F1, F2 e F3) e o pão convencional (CONV.) estão apresentados na Tabela 3.

Todas as amostras de pães testadas foram consideradas bem aceitas pelos provadores, apresentaram escores médios variando de 7,0 a 8,37, situados entre a faixa da escala hedônica “gostei regularmente” a “gostei moderadamente”.

Dentre as formulações adicionadas de CPS e carbonato de cálcio, pode-se verificar que, quanto aos atributos aparência e maciez, a formulação F2 apresentou maior aceitação, enquanto as formulações F1 e F3 não diferiram entre si ($p > 0,05$). Para o atributo sabor não houve diferença entre as amostras F1 e F2, sendo o menor escore médio verificado para a formulação F3. Com base nesses resultados, a formulação selecionada foi a F2, pois obteve melhor aceitação quanto aos atributos maciez e aparência, além da boa aceitação quanto ao sabor.

Lima et al.²⁵ encontraram escore médio de 7,7 para pão de forma convencional (sem CPS e carbonato de cálcio) e 7,8 para pão de forma com 7,5% de soro de leite em pó. Vasconcelos et al.³⁰ obtiveram notas médias entre 6,5 e 7,3 para pães de forma adicionados de farinha de soja e fibra alimentar. Battocchio et al.³¹ encontraram valores médios entre 5,96 e 6,81 para pães de forma integrais. Portanto, a adição de CPS e carbonato de cálcio, nas concentrações testadas, parecem não ter prejudicado a aceitação do pão de forma, tendo sido obtidos escores médios $\geq 7,0$ para todas as formulações.

Na Figura 1 estão apresentados os percentuais de notas referentes à aceitação dos pães de forma para cada atributo testado.

Com relação à frequência de notas atribuídas aos pães de forma foi observado que todas as formulações obtiveram índice de aceitação igual ou superior a 82,5%, com destaque para a formulação F2, que apresentou 100% de aceitação para todos os atributos avaliados. Enquanto a amostra F1 obteve um maior nível de rejeição (5%).

Determinação do teor de cálcio nos pães

Os pães de forma enriquecidos com 7,5% de CPS e 1,5, 2 e 2,5% de carbonato de cálcio apresentaram teores médios de cálcio de 512 mg/100 g, 697 mg/100 g e 817 mg/100 g pão, respectivamente. Todas as formulações alcançaram valores acima de 300 mg de cálcio/100 g pão, podendo ser classificadas como alimentos ricos em cálcio³².

Composição química do pão de forma selecionado

As médias e desvios-padrão da composição química da formulação de pão de forma selecionada estão expressos na Tabela 4. Para fins de comparação, foi determinada também a composição do pão de forma convencional.

Tabela 3. Médias dos escores do teste de aceitação para as quatro formulações de pães de forma elaboradas

Variáveis	CONV	F1	F2	F3
Aparência	8,37 ^a ± 0,49	7,6 ^{bc} ± 1,28	8,0 ^{ab} ± 0,82	7,1 ^c ± 1,13
Maciez	8,37 ^a ± 0,49	7,0 ^b ± 1,38	8,0 ^a ± 0,78	7,0 ^b ± 0,85
Sabor	8,07 ^a ± 0,74	7,5 ^{bc} ± 0,78	7,85 ^a ± 0,80	7,0 ^c ± 1,09

F1: pão de forma contendo 7,5% de CPS e 1,5% de CaCO₃; F2: pão de forma contendo 7,5% de CPS e 2,0% de CaCO₃; F3: pão de forma contendo 7,5% de CPS e 2,5% de CaCO₃

Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância

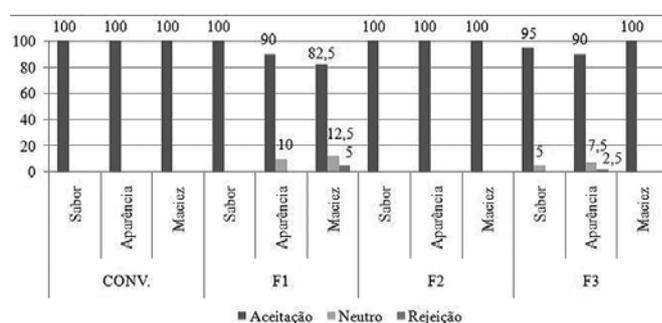


Figura 1. Percentagem de aceitação dos atributos (sabor, aparência e maciez) dos pães de forma

CONV: pão de forma sem CPS e carbonato de cálcio; F1: pão de forma contendo 7,5% de CPS e 1,5% de CaCO₃; F2: pão de forma contendo 7,5% de CPS e 2,0% de CaCO₃; F3: pão de forma contendo 7,5% de CPS e 2,5% de CaCO₃

Tabela 4. Médias e desvios-padrão dos resultados da composição química dos pães de forma convencional e enriquecido com concentrado proteico de soro de leite (CPS) e carbonato de cálcio

Nutrientes	CONV	F2
Umidade (%)	34,85 ^a ± 0,25	35,21 ^a ± 0,84
Proteínas (g/100g)	6,97 ^b ± 0,30	8,80 ^a ± 0,69
Lípidios (g/100g)	3,01 ^a ± 0,27	1,86 ^b ± 0,29
Carboidratos* (g/100g)	53,87	51,58
Cinzas (g/100g)	1,30 ^b ± 0,07	2,55 ^a ± 0,23
Cloretos** (mg/100g)	242,81 ^a ± 6,18	167,69 ^b ± 0,36
Cálcio (mg/100g)	31,83 ^a ± 0,11	697,11 ^a ± 28,80

CONV.: pão de forma convencional (determinado por LIMA et al., 2009); F2: pão de forma contendo 7,5% de CPS e 2% de CaCO₃

* Obtidos por diferença; ** Cloretos em Cloreto de Sódio

Médias seguidas de letras iguais na linha não diferem significativamente entre si, pelos testes "t" de Student, ao nível de 5% de significância

A umidade média dos pães de forma convencional e adicionado de 7,5% de CPS e de 2% de sal de cálcio foram, respectivamente, 34,85% e 35,21%. Na literatura, foram verificados valores bastante variáveis para a umidade deste tipo de pão, entre 32 e 37%^{25,33}.

Com relação à legislação brasileira, durante muitos anos (1978-2005) a umidade dos pães foi controlada, sendo estabelecido inicialmente um limite máximo de 30%³⁴. Posteriormente, esse valor foi alterado para 38%³⁵, e, a partir de 22 de setembro de 2005, essa característica foi extinta. O teor elevado de umidade em pães aumenta a atividade microbiana, deixa o produto grudento e borrachudo, alterando sua textura, sendo este um dos fatores responsáveis pela perda da qualidade do produto.

A adição de concentrado proteico de soro (CPS) ao pão de forma promoveu elevação no teor de proteínas, o que possibilitou a classificação do produto como alimento fonte desse nutriente para todos os grupos de indivíduos, incluindo gestantes e lactantes, que apresentam maior necessidade^{6,32}. Esse incremento na concentração das proteínas, devido à adição de CPS, também contribuiu para reduzir a deficiência em aminoácidos de cadeia ramificada e essenciais, especialmente isoleucina, lisina e valina, presentes em baixas concentrações na farinha de trigo, principal ingrediente da formulação do pão.

O teor de lipídios na formulação F2 foi menor que o do pão convencional (Tabela 4), estando abaixo de 3%, podendo ser classificado como produto com baixo teor de gorduras totais³², constituindo-se em importante vantagem do produto, tendo em vista que a ingestão excessiva de gordura pode levar à obesidade, doença de caráter endêmico e que hoje está sendo considerado um problema sério de saúde pública no Brasil³⁶.

O teor de cinzas da formulação F2 foi maior (2,55 g/100 g) que o encontrado para o pão convencional (1,30 g/100 g), o que era esperado, uma vez que a adição de carbonato de cálcio eleva o teor desse mineral, e consequentemente o de cinzas. Berno et al.³⁷ encontraram teor de cinzas de 1,63% em pão de forma enriquecido com 15% de concentrado proteico de soro. Quanto ao teor de cloretos, a formulação F2 também apresentou menor concentração desse nutriente em relação ao pão convencional (Tabela 4), outra característica positiva do produto, pois o sal (cloreto de sódio) é a causa primária de pressão arterial elevada, que pode levar a complicações cardiovasculares, incluindo ataque cardíaco e doenças relacionadas³⁸.

O valor médio obtido para o cálcio na formulação F2 foi 697,11 mg/100 g, bem acima da quantidade

necessária (300 mg/100 g) para classificar o produto como alimento rico nesse mineral^{32,39}. Nessa concentração, o pão de forma irá fornecer em torno de 70% da IDR de cálcio para adultos.

CONCLUSÃO

O uso de 7,5% de CPS na formulação de pão de forma permitiu a obtenção de um produto fonte de proteínas para todos os grupos de indivíduos, incluindo gestantes e lactantes; a complementação dessa formulação com 2% de carbonato de cálcio elevou o teor desse mineral a um nível correspondente a aproximadamente 70% da IDR de adultos, tornando o produto rico em cálcio.

O pão de forma com CPS e carbonato de cálcio na concentração selecionada (2%) apresentou boa aceitação sensorial, especialmente quanto aos atributos maciez, sabor e aparência.

O enriquecimento do pão de forma com CPS e carbonato de cálcio se constitui em uma importante alternativa de elevação no consumo de cálcio, tendo em vista o amplo consumo de pães por indivíduos de diversas classes sociais, especialmente por sua boa aceitação sensorial e baixo custo quando comparado ao leite e derivados, principais fontes desse mineral.

REFERÊNCIAS

1. Sampaio LR. Avaliação da dieta de idosos residentes no município de São Paulo [dissertação de mestrado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo;1997.
2. Montilla RNG, Aldrighi JM, Marucci MFN. Avaliação do estado nutricional e do consumo alimentar de mulheres no climatério. *Rev. Assoc. Med. Bras.* [internet]. 2003; 49(1): 91-95. Disponível em: [http://www.scielo.br/pdf/ramb/v49n1/15387.pdf].
3. Lopes ACS, Caiaffa WT, Sichiêre R, Mingoti AS, Lima-Costa MF. Consumo de nutrientes em adultos e idosos em estudo de base populacional: projeto Bambuí. *Cad Saúde Pública* [internet]. 2005; 21(4): 1201-1209. Disponível: [http://www.scielo.br/pdf/csp/v21n4/22.pdf].
4. Félix LN. Avaliação nutricional em instituição geriátrica do Distrito Federal: análise por diferentes instrumentos [dissertação de mestrado]. Brasília (DF): Universidade de Brasília; 2006.
5. Pinheiro MM, Jaques NO, Genaro OS, Ciconelli RM, Ferraz MB, Martini LA. Nutrient intakes related to osteoporotic fractures in men and women- The Brazilian Osteoporosis Study (BRAZOS). *Nutr J*, 2009; 8(6): 1-8.
6. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 269 de 22 de setembro de 2005. Aprova o Regulamento Técnico sobre a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 23 de set. de 2005. Seção 1. p.1.

7. Cozzolino SMF. Biodisponibilidade de Nutrientes. Barueri(SP): Manole; 2005.
8. Mahan LK, Escott-Stump S. Krause: Alimentos, Nutrição e Dietoterapia. 12ª ed. São Paulo: Roca; 2010.
9. Miller GD, Jarvis JK, Bean MC. The importance of meeting calcium needs with foods. *Am J Clin Nutr* 2001; 20(2): 168-85.
10. Levy-Costa RB, Sichieri R, Pontes NS, Monteiro AS. Disponibilidade domiciliar de alimentos no Brasil: distribuição e evolução (1974-2003). *Rev Saude Pública*. 2005; 39(4): 530-40.
11. Ranhotra GS, Gelroth JA, Leinen SD. Utilization of calcium in breads highly fortified with calcium, as calcium carbonate or as dairy calcium. *Cer Chem*. 2000; 77(3): 293-6.
12. Kajishima S, Pumar M, Germani R. Efeito da adição de diferentes sais de cálcio nas características da massa e na elaboração de pão francês. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2003; 23(2): 222-5.
13. Rodrigues FFG. Elaboração de pão de forma com adição de concentrado proteico de soro de leite [dissertação de mestrado]. João Pessoa (PB): Universidade Federal da Paraíba; 2008.
14. Renner E, Abdel-Salam MH. Application of ultrafiltração in the dairy industry. London: Elsevier Appl Sci; 1991.
15. Hervé R, Gabriel V, Lefebvre D, Rabier P, Vayssier Y, Fontagné-Faucher C. Study of the behaviour of *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc* starters during a complete wheat sourdough breadmaking process. *LWT*. 2006; 39 (3): 256-65.
16. Gutkoski LC, Klein B, Pagnussatt FA, Pedó I. Características tecnológicas de genótipos de trigo (*triticum aestivum* L.) cultivados no cerrado. *Ciênc e Agro, Lavras*. 2007; 31(3): 786-92.
17. Rocha LS, Cardoso Santiago RA. Implicações nutricionais e sensoriais da polpa e casca de baru (*Dipterix Alata* vog.) na elaboração de pães. *Ciênc Tecnol Aliment [internet]*. 2009; 29(4): 820-825. Disponível: [<http://www.scielo.br/pdf/cta/v29n4/19.pdf>].
18. Brasil. Instituto Adolfo Lutz. (IAL). Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz - Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos. 4ª ed. Brasília: 2005.1018p.
19. R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2006.
20. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 45 de 03 de novembro de 2010. Aprova o Regulamento Técnico sobre aditivos alimentares autorizados segundo as Boas Práticas de Fabricação (BPF). Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 03 de nov. de 2010. Seção 1. p.1.
21. Rizzon LA, Gasparin AM. O carbonato de cálcio na desacidificação do vinho Isabel. *Ciênc. Rural [internet]*. 2005; 35 (3): 720-723. Disponível em: [<http://www.scielo.br/pdf/cr/v35n3/a39v35n3.pdf>].
22. Quaglia G. Ciencia y Tecnologia de la Panificaci3n. Zaragoza(Espanha):Acr3bia; 1991.
23. Martinez-Anaya MA, Pitarch B, Bayarri P, Barber CB. Microflora of the sourdoughs of wheat flour bread x interactions between yeasts and lactic acid bacteria in wheat doughs and their effects on bread quality. *Cer Chem*. 1990; 67 (1): 85-91.
24. Azevedo FLAA. Elaboração de pão de forma com adição de soro de leite em pó [dissertação de mestrado]. João Pessoa (PB): Universidade Federal da Paraíba; 2007.
25. Lima AS, Maciel JF, Queiroga RCRE, Neto EAL, Anjos UU, Farias LRG. Avaliação físico-química e sensorial de pães de forma enriquecidos com soro de leite em pó. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2009; 68(3):366-72.
26. Gurgel CSS. Enriquecimento nutricional de pão de forma com soro de leite em pó e carbonato de cálcio [dissertação de mestrado]. João Pessoa (PB): Universidade Federal da Paraíba; 2010.
27. Kulp K, Chung H, Doerry W, Baker A, Olewnik M. Utilization of whey as a white pan bread ingredient. *Cereal Foods World*. 1988; 33 (5): 441-7.
28. Caldas MCS. Aproveitamento de soro de leite na elaboração de pão de forma [dissertação de mestrado]. João Pessoa (PB): Universidade Federal da Paraíba; 2007.
29. Ranhotra GS, Gelroth JA, Leinen SD. Utilization of Calcium in Breads Highly Fortified with Calcium as Calcium Carbonate or as Dairy Calcium. *Cer Chem*. 2000; 77(3).
30. Vasconcelos AC, Pontes DF, Garruti DS, Silva APV. Processamento e aceitabilidade de pães de forma a partir de funcionais: farinha de soja e fibra alimentar. *Alim Nutr, Araraquara*. 2006; 17 (1): 43-9.
31. Battochio JR, Cardoso JMP, Kikuchi M, Macchione M, Modolo JS. Perfil sensorial de pão de forma integral. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2006; 26 (2): 428-33.
32. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 31 de 13 de janeiro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico referente à Alimentos adicionados de nutrientes essenciais. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 16 de jan. de 1998. Seção1. p.1789.
33. Tebaldi LS, Massapust FC, Araújo LFL, Silva MVA, Trindade MB, Kronenberger G et al. Umidade e pH como parâmetros de qualidade em pães de forma. *Rev Hig Aliment*. 2006; 20 (143): 69-71.
34. BRASIL. Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Resolução nº.12 de 1978. Aprova Normas Técnicas especiais, do Estado de São Paulo revistas pela CNNPA, relativas a alimentos (e bebidas), para efeito em todo território brasileiro. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, Poder Executivo, 24 jul. 1978. Seção 1, pt. I.
35. BRASIL. Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 90 de 18 de outubro de 2000. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Pão. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 20 de outubro de 2000. Seção1. p.1.
36. Chiara V, Sichieri R, Martins PD. Sensibilidade e especificidade de classificação de sobrepeso em adolescentes, Rio de Janeiro. *Rev Saude Pública*. 2003; 37(2).
37. Berno LI, Spoto MHF, Canniatti-Brazaca, SG. Avaliação química e aceitabilidade de pão enriquecido com proteína concentrada do soro de leite bovino (whey protein). *Alim e Nutr, Araraquara*. 2007; 18(1): 41-9.
38. He FJ, MacGregor G. Blood pressure is the most important cause of death and disability in the world. *Eur Heart J Suppl*. 2007; 9: 23-8.
39. Institute of Medicine (IOM). Dietary reference intakes for calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D and fluoride. Washington: National Academy Press, 2006.

Comportamento do consumidor em relação ao uso da linhaça na alimentação

Views on the consumer's opinion in using the linseed in diets

RIALA6/1339

Maria Inês de Souza DANTAS^{1*}, Lisiane Lopes da CONCEIÇÃO², Aline Cristina ARRUDA²,
Naiara SPERANDIO¹, Juliana Fernandes LELIS¹, Hércia Stampini Duarte MARTINO¹

*Endereço para correspondência: ¹Departamento de Nutrição e Saúde, Universidade Federal de Viçosa, Av. P.H. Rolfs s/n, Viçosa, MG, Brasil, CEP: 36570-000, tel: 31 3899-1265, e-mail: msdantas@ufv.br

²Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa

Recebido: 22.02.2010 – Aceito para publicação: 31.03.2011

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Viçosa (protocolo nº 103/2009)

RESUMO

O comportamento dos consumidores quanto à linhaça foi avaliado por meio de pesquisa descritiva direta e estruturada em 395 consumidores. Neste contexto, foram investigados o perfil dos entrevistados, a inclusão de produtos contendo linhaça na alimentação, o conhecimento sobre os efeitos benéficos na saúde humana e os produtos contendo linhaça que despertariam interesse de consumo. Dos 395 entrevistados, 218 (55,2%) relataram conhecer a linhaça. Quanto aos benefícios na saúde, os mais citados foram a regularização intestinal (n=94, 41,2%) e a redução do colesterol (n=36, 15,8%). Do total dos entrevistados, o iogurte à base de linhaça foi o que despertou maior interesse de compra (n = 52, 13,3%), seguido da barra de cereal (n = 47, 12,1%). Observou-se correlação entre o conhecimento sobre os benefícios da linhaça e o consumo de produtos à base dessa semente, o que mostra a associação do uso da linhaça com a preocupação do consumidor na promoção da saúde e da qualidade de vida. Observou-se também que os participantes que tinham conhecimento sobre a semente, mas que não a consumiam, mostraram interesse em incluir os produtos à base de linhaça na alimentação. Esse fato indica um mercado a ser explorado e a necessidade de maior divulgação dos benefícios da linhaça.

Palavras-chave. microcistina, linhaça, consumidor, pesquisa de mercado.

ABSTRACT

A direct descriptive and structured survey was carried out among 395 consumers for inquiring into the linseed-containing food products. For this purpose, the following questions were investigated, the profile of the interviewees, the knowledge on the benefits of linseed for human health, and which kind of linseed-based food products would be attractive for consumers. Of 395 participants, 218 (55.2%) stated the knowledge on linseed. Concerning the benefits of linseed for human health, the intestinal functioning improvement (n=94, 41.2%) and the cholesterol reduction (n= 36, 15.8%) were the most cited. Among all participants, yoghurt was the most attractive linseed-containing food (n=52, 13.3%), followed by the cereal bar 12.1% (n=47). Correlation between the knowledge on the linseed benefits and in using up the products containing this seed was observed, which indicates an association between the use of linseed-based foods and the consumers' concern on health and life quality enhancement. Also, it was noted that the participants who have heard about linseed but have not tasted a linseed-containing food yet, they showed interest in consuming these new products. These findings indicate that there is a market to be explored, and that the benefits of linseed disclosure is required.

Keywords. linseed, consumer, market research.

INTRODUÇÃO

O crescente interesse dos consumidores em alimentos específicos ou componentes alimentares fisiologicamente ativos, com alegações de saúde, tem colocado os alimentos funcionais dentro de um novo segmento no mercado alimentício. Quando se considera os custos da sociedade com as doenças crônicas não transmissíveis, que podem ser influenciadas pela dieta, as perspectivas de crescimento desse segmento são mais evidentes¹. No Brasil, esse mercado é ainda incipiente, porém com grande potencial, considerando-se a disponibilidade de fontes naturais, a capacidade produtiva da indústria local e o tamanho do mercado consumidor².

As alegações de saúde da linhaça têm sido amplamente divulgadas, suas características químicas e nutricionais a qualificam como um alimento funcional, pois fornece nutrientes e compostos bioativos, que atuam no controle e prevenção de doenças³. A linhaça possui aproximadamente 40% de lipídios totais, sendo cerca de 50% de ácido α -linolênico (ω -3). Fornece também 28% de proteína e 35% de carboidrato^{3,4}. O teor de proteína da semente de linhaça se destaca pela quantidade e qualidade, pois é rica e equilibrada em aminoácidos de cadeia ramificada⁵. A demonstração da atividade clínica associada com o consumo de linhaça tem estimulado interesse no estudo desse alimento, especificamente por seus efeitos anticarcinogênico e antiaterogênico, vinculados ao conteúdo de lignanas, de ácido α -linolênico, de fibra alimentar e de compostos fenólicos, os quais são provavelmente benéficos na redução dos fatores de risco para doenças cardiovasculares e câncer^{6,7,8}.

O estudo do comportamento é fundamental para entender o que leva o consumidor a consumir ou não um determinado produto e quais fatores estão envolvidos no processo de compra de um alimento. O sucesso de um produto depende de como o consumidor reage a ele^{9,10,11}. As mudanças no comportamento dos consumidores estão fazendo com que as empresas pratiquem estratégias de marketing, denominadas segmentação de mercado, seleção-alvo e diferenciação de oferta. O sucesso empresarial no uso dessas estratégias depende, fundamentalmente, das habilidades mercadológicas. Portanto, é necessário repensar a importância dos estudos das variáveis comportamentais do consumidor, no processo de desenvolvimento de novos produtos alimentícios¹². Nesse sentido, a pesquisa de mercado tem se mostrado uma ferramenta bastante útil para elucidar o comportamento dos consumidores de alimentos¹³.

Dada a importância da linhaça e do estudo do comportamento do consumidor, fazendo referência às suas implicações na qualidade de vida e no desenvolvimento de novos produtos, torna-se necessário conhecer o consumidor de linhaça, bem como seus interesses e intenções. Assim sendo, o objetivo deste trabalho foi investigar se os consumidores estão incluindo na alimentação produtos à base de linhaça, se conhecem seus efeitos benéficos na saúde humana e quais produtos contendo linhaça despertariam interesse de compra.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizado um estudo descritivo, de caráter transversal para verificar se os consumidores estão incluindo na alimentação produtos à base de linhaça, se conhecem seus efeitos benéficos na saúde humana e quais produtos contendo linhaça despertariam interesse de compra. O formato básico deste trabalho foi baseado no levantamento de Babbie¹⁴.

Foi construída uma amostra, estatisticamente significativa, a partir de 395 consumidores, residentes em Viçosa-MG. Esse tamanho amostral foi baseado no critério de Cochran¹⁵. Para a definição desse tamanho amostral, utilizou-se um nível de confiança de 95% e uma margem de erro $E = 0,05$. Como não se conhecia o comportamento do mercado de linhaça nessa cidade, estimou-se uma variabilidade máxima de 50% (onde p e q estimados são iguais a 0,5). Assim, para a população do município analisado, o tamanho da amostra foi definido pela equação:

$$n = qpZ^2 / E^2$$

n = tamanho da amostra.

$Z = 1,96$ (abscissa da normal a um nível de confiança de 95%).

$p = 0,5$ (variabilidade máxima estimada).

$q = 1 - p$.

$E = 0,05$ (nível de precisão).

Os respondentes foram escolhidos aleatoriamente, em dois supermercados da cidade.

Para coleta dos dados, utilizou-se um questionário estruturado, contendo questões de caráter exploratório, com base em outros estudos com consumidores¹⁶. A fim de evitar viés e tendenciosidade nos resultados, optou-se por utilizar cartões circulares contendo as respostas

<p>1-Sexo: [1] Masculino [2] Feminino 2- Nasc: (Mês e ano) : _____ 3- Estado civil: [1] Solteiro [2] União estável [3] Viúvo [4] Outro 4-Grau de instrução: [1] Ensino fundamental incompleto [3] Ensino médio incompleto [2] Ensino fundamental completo [4] Ensino médio completo [5] Pós-grad. incomp [7] Superior completo [6]Pós-grad. comp. [8] Superior incompleto [9] Outro: _____ 5- Atividade profissional: [1] Estudante [2] Func. Público [3] Autônomo [4] Dona de casa [5] Empresário (proprietário de empresa) [6] Func. empresa privada [7] Outro: _____ 6-Em média, qual categoria de renda familiar mensal, você se enquadra? [1] 1 a 3 SM (até 1.140,00) [2] 4 a 6 SM (1.520,00 a 2.280,00) [3] 7 a 9 SM (2.660,00 a 3.420,00) [4] 10 a 12 SM (3.800,00 a 4.560,00) [5] 13 a 15 SM (4.940,00 a 5.700,00) [6] 16 a 18 SM (6.080,00 a 6.840,00) [7] 19 a 21 SM (7.220,00 a 7.980,00) [8] 22 a 24 SM (8.360,00 a 9.120,00) [9] 25 a 27 SM (9.500,00 a 10.260,00) [10] 28 a 30 SM (10.640,00 a 11.400,00) [11] 31 a 33 SM (11.780,00 a 12.540,00) [12] 34 a 36SM (12.920,00 a 13.680,00) [13] 37 a 39 SM (14.060,00 a 14.820,00) [14] 40 a 42 SM (15.200,00 a 15.960,00) [15] 43 a 45 SM (16.340,00 a 17.100,00) [16] 46 a 48 SM (17.480,00 a 18.240,00) [17] 49 a 51 SM (18.620 a 19.380,00) [18]Acima de 20.000,00</p>	<p>7- Você conhece a linhaça? [1] Sim [2] Não 8 – Você conhece algum benefício relacionado ao consumo da linhaça? [1] Perda de peso [2] Reduz riscos de doenças cardíacas [3] controle a da diabetes [4] Previne o câncer [5] Reduz o colesterol [6] Ajuda no combate a acne [7] Regulariza o intestino [8] não conheço nenhum 9- Você consome alimentos contendo linhaça? [1] Sim [2] Não 10 - Se não consome qual o motivo? [1] nunca ouviu falar [2] é caro [3] não gosto do sabor [4] Não sei preparar [5] Falta de linhaça/produtos com linhaça no mercado [6] Falta de interesse/curiosidade [7] Outros 11– Se consome, qual a frequência? [1] Diariamente [3] 1 vez/semana [4] 3 -5 vezes/semana [5] 1 vez por mês 12- Há quanto tempo você faz uso da linhaça: [1] menos de 6 meses [2] de 6 meses a 1 ano [3] a mais de 1 ano 13-Você já percebeu algum benefício com o consumo da linhaça?[1] redução do colesterol [2] mais disposição [3] emagrecimento [4] melhora da diabetes [5] regularização do intestino [6] Outros _____ 14 - Produtos contendo linhaça que você mais consome: [1] Pães [2] Semente de linhaça [3] Farinha de linhaça [4] óleo de linhaça [5]Macarrão [6]Barra de cereal [7] Outros _____ 15-Onde adquire os produtos contendo linhaça? [1] Supermercado [2] Padaria [3] Loja de produtos naturais [4] Quitanda [5] Feira livre [6] Outros _____ 16 – Que tipo de produto, contendo linhaça, que não existe no mercado, você teria interesse em comprar? [1] Barra de cereal [2] Pães [3] Bolos [4] Iogurte [5]Macarrão [6] Biscoito [7]Massa de pizza [8] Outros _____</p>
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Figura 1. Questionário para avaliar comportamentos dos consumidores em relação à linhaça

para que o respondente apontasse a sua opção. Teve-se o cuidado de variar a posição do cartão, ao apresentá-lo.

Um teste piloto foi realizado com 30 participantes para adequação do questionário. Os quesitos abordados no questionário podem ser observados na Figura 1.

Utilizou-se os softwares SigmaStat versão 2.03 e o *Statistical Package for the Social Sciences* – SPSS for Windows versão 13.0. A análise estatística foi feita com a realização do teste de Spearman's, por meio de correlações não paramétricas. Foi considerado significativo quando o valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A faixa etária predominante da população entrevistada foi de 20 a 49 anos 73,4% (n = 289), sendo a maioria do sexo feminino 64,8% (n = 256), solteiros 54,9% (n = 217) e estudantes 37,2% (n = 147). Em relação ao grau de instrução, 29,6% (n = 117) tinham curso superior incompleto e 43,5% (n=172) declararam ter uma renda familiar entre 1 a 3 salários mínimos (Figura 2).

Grande parte dos entrevistados, 55,2% (n = 218), relatou conhecer a linhaça e estes citaram a regularização

intestinal, 41,2% (n = 94), e a redução do colesterol, 15,8% (n = 36), como benefícios relacionados ao seu consumo para saúde humana. Entretanto, 22,8% dos entrevistados não souberam associar os benefícios da linhaça à saúde (Figura 3).

Apesar de conhecer a linhaça e seus benefícios à saúde, a maioria dos entrevistados, 58,2% (n = 127), não fazia uso de produtos contendo a semente. O motivo mais citado para justificar o não uso foi a falta de interesse e de curiosidade, 63,3% (n = 81).

Dentre os entrevistados que têm o hábito de consumir a linhaça (n = 91), 50,5% (n = 46) o faz a mais de um ano, sendo que 29,7% (n = 27) destes a consumiam diariamente. Dos benefícios observados pelos indivíduos que ingeriam a linhaça, a regularização intestinal foi relatada por 53,8% (n = 49) dos participantes. Entretanto, 25,3% não observaram nenhum benefício.

Não foi observada correlação significativa ($p < 0,05$) entre conhecimento de linhaça e idade ($p = 0,49$) e entre renda e consumo de linhaça ($p = 0,78$).

Dentre os produtos consumidos, o pão contendo linhaça foi o mais citado, 41,8% (n = 38), seguido da semente, 29,7% (n = 27), e da farinha de linhaça, 22% (n = 20) (Figura 4).

Quando questionados sobre o interesse em consumir produtos contendo linhaça, o iogurte foi o que despertou maior interesse de compra entre os entrevistados, 13,3% (n = 52), seguido da barra de cereal, 12,1% (n = 47) (Figura 5).

Esses resultados mostraram que já existe um segmento de mercado que consome produtos contendo linhaça e que há a possibilidade de explorá-lo por meio do desenvolvimento de novos produtos, com características sensoriais e nutricionais desejáveis. Tal fato permitirá agregar aos novos produtos à base de linhaça maior teor de fibra alimentar e de ácido graxo essencial ω -3, além de outros compostos bioativos³.

O supermercado foi, para grande parte dos consumidores, 57,8% (n = 52), o estabelecimento preferido para a compra do produto e seus derivados, seguido pela loja de produtos naturais, 31,1% (n = 28).

Observou-se correlação entre os entrevistados que conheciam os benefícios da linhaça e faziam uso de produtos à base dessa semente, demonstrando que o uso da linhaça está associado com a preocupação do consumidor na promoção de sua saúde e da qualidade de vida. Percebeu-se também que aqueles que conheciam a semente mostraram interesse em consumir novos produtos à base de linhaça, indicando um mercado a ser explorado e a necessidade de divulgação de seus benefícios entre aqueles que não a conhecem.

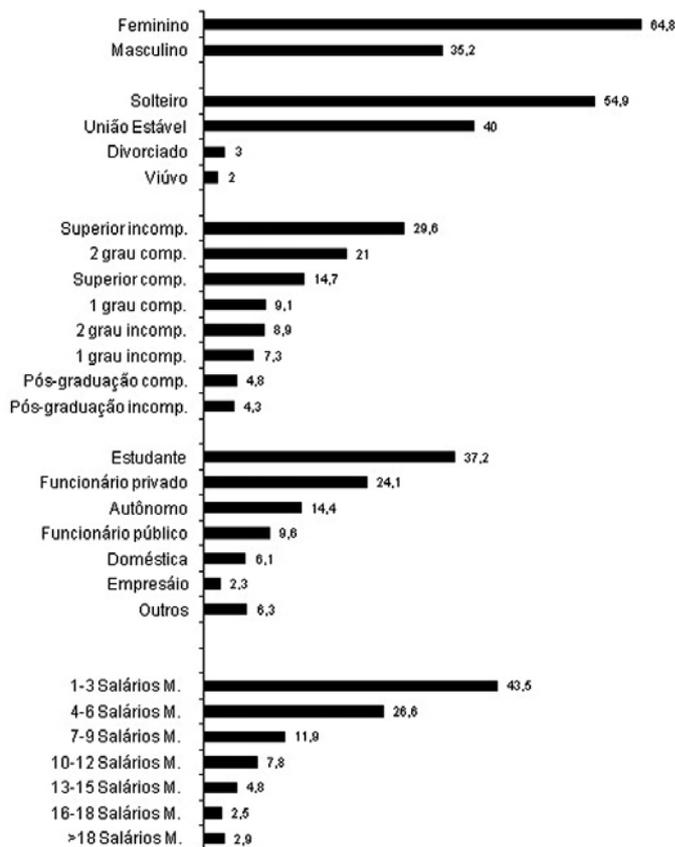


Figura 2. Perfil dos entrevistados (n = 395), expressos em porcentagem, residentes em Viçosa-MG

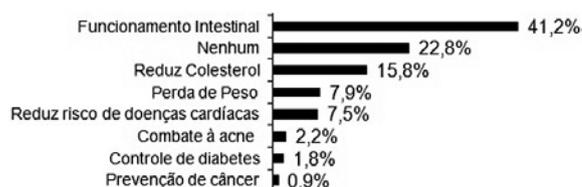


Figura 3. Grau de conhecimento dos consumidores que conheciam a linhaça (n = 218) quanto aos benefícios associados ao consumo da linhaça, em pesquisa de mercado em Viçosa-MG, em percentual

CONCLUSÃO

Este estudo mostrou que os consumidores que fazem uso da linhaça percebem os benefícios desta, além de sentirem as alegações funcionais desse produto em sua saúde, como regulação intestinal e controle do colesterol.

Existe um mercado a ser explorado composto de consumidores que têm conhecimento sobre o produto, mas não fazem uso dele. E também há aqueles que não conhecem o produto, mas que se mostraram interessados

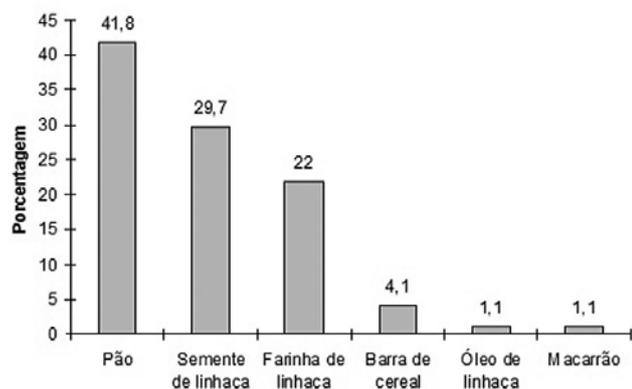


Figura 4. Produtos utilizados pelos consumidores de linhaça, em pesquisa de mercado em Viçosa-MG (n = 91)

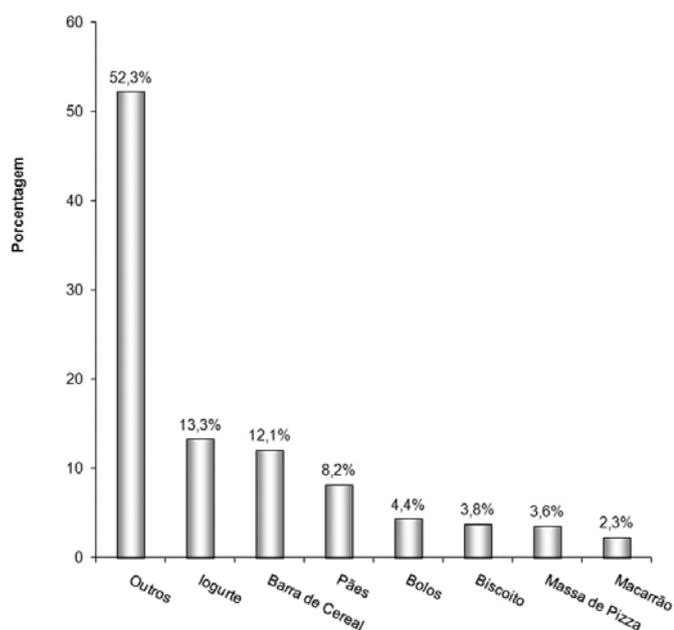


Figura 5. Produtos que não existem no mercado ou são pouco conhecidos que mais despertaram interesse de compra (n = 395)

em consumi-lo em outras formas de apresentações, tal como é o caso da barra de cereal e do iogurte.

O interesse do consumidor por alimentos à base de linhaça lança subsídios para o desenvolvimento de novos produtos, que satisfaçam o consumidor e despertem a intenção de compra do mesmo, ampliando as alternativas de produtos saudáveis, com alegações de funcionalidade na alimentação humana.

Diante do exposto, este estudo fornece indicações comportamentais que poderão orientar pesquisas e empresas alimentícias que tem interesse em diversificar a produção de alimentos à base de linhaça.

REFERÊNCIAS

1. Rafter JJ. Scientific basis of biomarkers and benefits of functional foods for reduction of disease risk: cancer. *Brit J Nut*. 2002; 88 (Suppl. 2): 219-24.
2. Behrens JH, Da Silva MAAP. Atitude do consumidor em relação à soja e produtos derivados. *Ciênc Tecnol Alim*. 2004; 24(3):431-9.
3. Babu US, Wiesenfels PW, Collins TFX, Sprando R, Flynn TJ, Black T, et al. Impact of high flaxseed diet on mitogen-induced proliferation, IL-2 production, cell subsets and fatty acid composition of spleen cells from pregnant and F1 generation Sprague-Dawley rats. *Food Chem Toxicol*. 2003; 41(6): 905-15.
4. Carter JF. Potential of flaxseed and flaxseed oil in baked goods and other products in human nutrition. *Cereal Foods World*. 1993; 38 (10):753-9.
5. Soncin MRSP. Efeito da inclusão de semente de linhaça integral (*linum usitatissimum* l.) na dieta de éguas através da taxa de crescimento folicular, concentração de metabólitos sanguíneos e da digestibilidade aparente. [Tese de mestrado] Paraná:Universidade Estadual de Maringá; 2006.
6. Dodin S, Cunnane SC, Mâsse B, Lemay A, Jacques H. Flaxseed on cardiovascular disease markers in health menopausal women: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Nutrition*. 2008; 24 (1):23-30.
7. Stavro PM, Marchie AL, Kendall CWC, Vuksan v, Jenkins DJA. Flaxseed, fiber, and coronary heart disease: Clinical Studies, 288- 300p. In: Thompson LU, Cunnane SC. Flaxseed in Human Nutrition. 2nd ed; 2003.
8. Lucas EA, Wild RD, Hammond LJ, Khalil DA, Juma S, Daggy BP, Stoecker B, Arjmandi BH. Flaxseed improves lipid profile without altering biomarkers of bone metabolism in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metabol*. 2002; 87(4):1527-32.
9. Dagevos H. Consumers as four-faced creatures: looking at food consumption from the perspective of contemporary consumers. *Appetite*. 2005; 45(1):32-9.
10. Rodrigues MA, Jupi VS. O comportamento do consumidor: fatores que influenciam em sua decisão de compra. *Rev Adm Nobel*. 2004; 3:59-70.
11. Solomon MR. Comportamento do consumidor: comprando, possuindo e sendo. 5ª ed. Porto Alegre (RS): Bookman; 2002.
12. Machado MD, Lima Filho DO. Ferramentas de marketing no processo de inovação de produtos agroindustriais. In: Zuin, LFS; Queiroz, TR. *Agronegócios: gestão e inovação*. São Paulo (SP): Saraiva; 2006.
13. Endo E; Bertoldi MC; Pinheiro NMS; Arruda AC; Minim VPR. Caracterização do mercado consumidor de "água aromatizada": hábitos e motivações para o consumo. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2009; 29(2):365-70.
14. Babbie E. Métodos de Pesquisas de Survey. Coleção Aprender. Belo Horizonte (MG): Editora UFMG; 2001.
15. Cochran, W. G. Técnicas de Amostragem. John Wiley & Sons, New York. Rio de Janeiro (RJ): USAID; 1965.
16. Arruda AC. Perfil dos consumidores de café de Viçosa-MG: Um estudo exploratório. In: V Simpósio de Pesquisa de Café no Brasil. Águas de Lindóia; 2007.

Influência da temperatura sobre as alterações físicas, físico-químicas e químicas de geleia da casca de banana (*Musa spp.*) Cv. Prata durante o armazenamento

Effects of temperature on the physical, physicochemical, chemical and microbiological alterations during of the storage of jelly made from Cv. Prata banana (*Musa spp.*) peel

RIALA6/1340

Cynthia Savassi DIAS*, Soraia Vilela BORGES, Fabiana QUEIROZ, Patrícia Aparecida Pimenta PEREIRA

*Endereço para correspondência: Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Rua Mannesmann, 147, Siderurgia, Ouro Branco, MG, Brasil, CEP: 36420-000, e-mail: cynthiasavassi@hotmail.com
Recebido: 21.09.2010 – Aceito para publicação: 31.03.2011

RESUMO

A elaboração de geleias por meio do processamento de cascas de frutas é uma alternativa para obter redução e agregação de valor aos resíduos das indústrias de alimentos; além disso, obtém-se um produto agradável sensorialmente e com vida prolongada. Sendo o Brasil um país que apresenta temperaturas bem variadas, o objetivo deste trabalho foi de avaliar o efeito da temperatura sobre as alterações físico-químicas, físicas e químicas durante o armazenamento de geleias de extrato da casca de banana. As diferentes temperaturas interferiram significativamente na estabilidade em relação aos açúcares redutores, à atividade de água e à luminosidade. A interação tempo x temperatura interferiu nos parâmetros de pH, sólidos solúveis, adesividade, firmeza, coesividade e cor *b (amarela) da geleia da casca de banana-prata até o final dos 165 dias de armazenamento. O tempo foi o fator que mais influenciou na qualidade da geleia, ocorrendo-se diminuição da atividade de água, umidade, açúcares não redutores, luminosidade, valor absoluto da adesividade e firmeza e aumento de acidez.

Palavras-chave. geleia da casca de banana, armazenamento, temperatura.

ABSTRACT

Manufacturing jellies by processing the fruit peel is an alternative for reducing and adding value to the waste from food industries. In addition, a pleasant sensory and long-lived product is achieved. As in Brazil occurs varied temperatures according to the country regions, the objective of this study was to evaluate the effect of temperature changes on the physical-chemical, physical and chemical characteristics during the storage of jellies made from banana peel. The storage of this product at different temperatures caused significant difference in the stability of reducing sugars, water activity and luminosity. The interaction of time versus temperature affected the pH, soluble solids, adhesiveness, firmness, cohesiveness and color b* (yellow) parameters on the banana *Prata* peel jelly by the end of 165 days of storage. The time length was the factor which mostly affected on the jelly quality, water activity, moisture, non-reducing sugars, luminosity, adhesiveness absolute value, product firmness, and also caused an increased acidity.

Keywords. banana peel jelly, storage, temperature.

INTRODUÇÃO

A banana é um fruto climatérico, que apresenta grande importância econômica nos países tropicais¹. A área cultivada do Brasil (511 mil hectares) somente é superada pela área cultivada da Índia (709 mil hectares), e a produtividade brasileira ocupa a 5ª posição entre os países produtores de bananas², tendo essa fruta papel fundamental como alimento, cultura fixadora de mão de obra no meio rural e gerador de divisas para o País^{3,4}. Embora exista um número expressivo de variedades de banana no Brasil, destaca-se a variedade Prata, a de maior produção⁵. De cada 100 kg de frutas colhidas, 46 kg não são aproveitados, sendo que para cada tonelada de banana industrializada aproximadamente 440 kg de cascas são gerados⁶.

Nos últimos anos, vários pesquisadores brasileiros vêm estudando o aproveitamento de resíduos, como as cascas de frutas acumuladas pelas agroindústrias para a produção de alimentos ou ingredientes. Essas cascas podem ser incluídas na dieta humana, como, por exemplo, as cascas de maracujá, de laranja, de limão, de banana, de maçã e de outras frutas. A utilização econômica de resíduos de frutas, oriundos do mercado *in natura* ou das agroindústrias, aliada ao desenvolvimento de tecnologias para minimizar as perdas nos processos produtivos, pode contribuir de forma significativa para a economia do país e para a diminuição dos impactos ambientais⁷.

A elaboração de geleia, com resíduos de polpa e de casca de abacaxi, visando ao aproveitamento parcial dos resíduos de abacaxi gerados pela agroindústria mostrou ser viável⁸. Quando avaliados pela qualidade, os doces de albedo de maracujá em calda foram bem-aceitos pelos consumidores⁹. Em estudo da composição química, textura e aceitação sensorial de doces em massa elaborados com polpa de banana e com polpa e casca de banana, constatou-se que os doces de banana com polpa e casca se assemelharam ao doce tradicional, sendo significativamente mais aceito que o doce tradicional¹⁰. Para os biscoitos produzidos com casca de abóbora e bolo com casca de banana, observou-se que a presença das cascas nessas preparações não prejudicou sua aceitabilidade¹¹. A qualidade físico-química e sensorial de aguardentes de polpa de banana e banana integral submetidas à hidrólise enzimática possui similaridades em relação à qualidade¹².

As geleias constituem-se numa importante alternativa para o processamento, aproveitamento e consumo de frutas¹³. Os alimentos industrializados, ou não, mantêm constante atividade biológica, manifestada

por alterações de natureza química, física, microbiológica ou enzimática e levam à deterioração da qualidade. Essa se caracteriza pela inaptidão dos produtos para o consumo humano, como resultado da existência de contaminação microbiana ou de insetos, da perda de certos atributos específicos, como cor, sabor, pH, acidez, açúcares, textura, viscosidade.

Alguns pesquisadores têm descrito o efeito da temperatura sobre as propriedades dos produtos de frutas^{14,15}, mas as informações disponíveis sobre o efeito dessa variável em combinação com outras são escassas.

Sendo o Brasil um país que apresenta temperaturas bem variadas, o objetivo do presente trabalho foi estudar o efeito desse fator sobre as alterações físico-químicas, físicas, químicas e microbiológicas de geleias de extrato da casca de banana durante o armazenamento.

MATERIAL E MÉTODOS

Processamento da geleia

Para a elaboração das geleias foram utilizadas as cascas de frutos maduros (cascas totalmente amarelas com manchas marrons e sem defeitos-estágio de maturação 7) conforme Souza et al.¹⁶.

As bananas, após despençamento e seleção, foram lavadas em água corrente, sanitizada em hipoclorito de sódio a 200 mg.L⁻¹ por 15 min e descascadas manualmente, sendo as cascas processadas de forma a obter o extrato para a elaboração da geleia. As cascas foram submetidas a cozimento em água fervente por 30 min., em concentrador à pressão atmosférica. Após cozimento, filtrou-se o material e o extrato foi separado da casca, empregando-se uma prensa de aço inoxidável. Para a elaboração da geleia foram utilizados: pectina comercial de alto teor de metoxilação (ATM) da marca VETEC, grau de especificação (USA – SAG) 150, temperatura de geleificação 80 a 95 °C, grau de esterificação 71–75%, sacarose (açúcar refinado de marca UNIÃO), como adoçante, e ácido cítrico monoidratado P.A. da marca Nuclear.

A mistura (extrato/sacarose) foi concentrada através da cocção em concentrador atmosférico, até obter a concentração de 60 °Brix, quando foi adicionada a pectina. Em seguida, quando atingiu 68 °Brix, interrompeu-se a cocção e foi adicionada uma solução de ácido cítrico (33%), conforme recomendado por Mororó¹⁷. Após o processamento, o produto foi envasado a quente em potes de vidro esterilizados de 250 mL com fechamento hermético e estocado em câmara

climática com temperatura controlada (B.O.D.) nas temperaturas de 20, 30 e 40 °C para determinação da vida útil do produto.

Análises físico-químicas

As geleias foram analisadas quanto ao pH em potenciômetro digital pH-3B Labmeter, segundo metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz¹⁸; acidez titulável, segundo o método nº 942.15 da AOAC¹⁹ e expressa em % de ácido cítrico por 100 g da amostra; açúcares redutores (AR) e açúcares não redutores (ANR) pelo método redutométrico de Somogy, adaptado por Nelson, AOAC¹⁹; sólidos solúveis por refratometria (refratômetro manual Portable model 0-90 °Brix) de acordo com as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz¹⁸ e os resultados expressos em °Brix; atividade de água utilizando-se equipamento Aqualab (Decagon modelo 3 TE); umidade por meio do método gravimétrico, utilizado para produtos açucarados, recomendado por Pereira²⁰. Essas análises foram realizadas em triplicata.

Análise de Perfil de Textura (TPA)

A TPA foi realizada utilizando um analisador de textura TA TX2i Stable Micro Systems, (Goldaming, England), com sonda cilíndrica de alumínio P6 (6mm) e tempo, distância, velocidades de pré-teste, teste e pós-teste de 5 s, 1 mm, 5 mm/s, 2 mm/s e 5 mm/s, respectivamente. Os resultados obtidos da curva força x tempo foram calculados pelo Software Texture Expert Versão 1.22. Os parâmetros analisados foram: fraturabilidade, coesividade, adesividade, mastigabilidade e gomosidade. Os resultados expressos são médias de oito determinações.

Análise de cor

A cor da geleia foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Giese²¹. Os valores de L*,

a* e b* foram determinados com aparelho colorímetro Minolta modelo CR 400 (Minolta Corporation, Osaka, Japão) trabalhando com D₆₅ (luz do dia) e usando os padrões CIE (L* a* b*): em que L* varia de 0 (preto) a 100 (branco), b* varia do azul (-) ao amarelo (+) e a* varia do verde (-) ao vermelho (+).

Delineamento experimental

Empregou-se um planejamento com Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) em fatorial completo 5x3, cujos fatores avaliados foram tempo de armazenamento nos níveis 0, 30, 75, 120 e 165 dias e temperatura de armazenamento nos níveis 20, 30 e 40 °C, sendo realizado em duas repetições.

Análise estatística

Os resultados das análises físico-químicas, de textura e de cor foram analisados empregando-se as seguintes metodologias estatísticas:

– Análise de Variância (ANOVA), para avaliar o nível de significância dos efeitos principais e interações, proposto por Ferreira²².

– Análise de regressão para avaliar as alterações ocorridas durante o armazenamento em relação ao tempo e à temperatura. Os resultados que não tiveram efeito significativo, segundo a ANOVA, não foram plotados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito do tempo e/ou temperatura nas análises químicas e físico-químicas

A Tabela 1 mostra o resumo da análise de variância para as análises químicas e físico-químicas. Somente houve interação tempo x temperatura significativa para o pH e sólidos solúveis. A acidez titulável somente teve efeito do tempo. A umidade, a atividade de água e açúcar redutor tiveram efeitos tanto do tempo como da temperatura.

Tabela 1. Resumo da análise de variância das características químicas e físico-químicas da geleia da casca de banana-prata durante o armazenamento

E.V.	F_{cal}							
	F_{tab}	AT	pH	a_w	SS	Umidade	AR	ANR
Tempo (T1)	3,06	15,43*	0,24	30,00*	10,42*	46,08*	37,22*	6,87*
Temperatura (T2)	3,68	1,71	63,42*	10,00*	1,91	4,22*	5,95*	1,32
T1 x T2	2,64	0,28	4,47*	2,00	5,75*	0,99	1,20	0,77

* Valor do teste F significativo ao valor nominal de 5% de probabilidade

AT: acidez titulável; a_w : atividade de água; SS: sólidos solúveis; AR: açúcares redutores; ANR: açúcares não redutores

Tabela 2. Equações de regressão com variáveis codificadas e coeficientes de determinação dos modelos completos para as respostas das análises físico-químicas da geleia da casca de banana-prata

Resposta	Tempo (dias)	Temperatura (°C)	Modelo estimador	R ²
pH		20	$y = -0,002x + 3,656$	0,971
		30	$y = 1E-05x^2 - 0,004x + 3,668$	0,853
		40	$y = -0,004x + 3,793$	0,957
Acidez Titulável (g Ac. Cítrico/100g)	165		$y = 0,000x + 0,313$	0,888
Atividade de água	165		$y = 3E-06x^2 - 0,000x + 0,804$	0,886
Umidade	165		$y = -0,000x^2 + 0,111x + 36,12$	0,369
Sólidos Solúveis (°Brix)		20	$y = -0,000x^2 + 0,020x + 67,47$	0,363
		30	$y = 1E-04x^2 - 0,024x + 69,08$	0,975
		40	$y = -0,000x^2 + 0,018x + 67,50$	0,260
Açúcares não redutores	165		$y = 0,001x^2 - 0,180x + 24,81$	0,811
Açúcares redutores	165		$y = -0,001x^2 + 0,519x + 0,931$	0,938

Os modelos de regressão em nível de 5% de significância foram estabelecidos a partir dos resultados experimentais das variáveis estudadas. A adequabilidade dos modelos completos pode ser verificada pelos coeficientes de determinação (R²), que explicam entre 70 e 98% da variância total das respostas (Tabela 2). Para os parâmetros umidade e sólidos solúveis (20 °C) e sólidos solúveis (40 °C) não se ajustou um modelo matemático, pois seus coeficientes de determinação foram menores que 70%, significando que o modelo ajustado não se adequou aos dados experimentais.

Pode-se observar que a acidez titulável aumentou com o tempo de armazenamento. Na elaboração de geleias, a acidez deve ser controlada e permanecer entre 0,3 e 0,8%. Isso porque em acidez superior a 0,8% pode ocorrer sinérese²³. No presente trabalho, mesmo a acidez apresentando um aumento com o tempo de armazenamento, esta não ultrapassou o limite de 0,8%.

Observa-se também que houve uma diminuição do pH para todas as temperaturas até 120 dias. A partir desse período, ocorreu um aumento do pH para a temperatura de 30 °C. Resultados contrários foram verificados em estudos com geleia de morango²⁴. Miguel et al.²⁴ observaram um ligeiro aumento do pH até os 60 dias de armazenamento à temperatura de 20 °C, mantendo-se estável até 180 dias, enquanto que as amostras conservadas a 30 °C e a 40 °C apresentaram manutenção dos valores de pH ao longo do período de

armazenamento. Nachtigall et al.²⁵ observaram tendência semelhante ao presente trabalho, em que tiveram em sua formulação convencional de geleia de amora-preta uma diminuição do pH. Isso se deve provavelmente à liberação de íons H⁺ no meio em razão do ácido adicionado.

Diferentemente do pH, na atividade de água observa-se a influência significativa da temperatura e do tempo durante o armazenamento da geleia da casca de banana-prata.

A atividade de água das geleias diminuiu em relação ao tempo de armazenamento até 120 dias de armazenamento e, a partir desse período, houve um ligeiro aumento. Esse fato pode ser explicado pela hidrólise da sacarose através do aumento da acidez da geleia no mesmo período de armazenamento, fazendo com que se eleve o teor de açúcares redutores. Quando observado em relação à temperatura, houve redução da atividade de água. O teor de umidade apresentou pequena oscilação durante o armazenamento, sendo a temperatura de 30 °C a que mais influenciou na alteração da umidade.

Os valores de sólidos solúveis para a geleia da casca de banana-prata diminuíram até 120 dias, aumentando até o fim do período de armazenamento na temperatura de 30 °C. Já para as temperaturas de 20 °C e 40 °C, houve um comportamento inverso, havendo um aumento no início do período de armazenamento e uma queda no final. Em temperatura ambiente, a solubilidade da sacarose é 67,35%²⁶, o que indica que, ao final do armazenamento,

pode ter ocorrido uma tendência à cristalização, uma vez que, nesse período, a atividade de água aumentou.

Enquanto os açúcares redutores aumentaram até 120 dias de armazenamento, os açúcares não redutores mostram um comportamento contrário até o período de 90 dias. Esse fato pode ser explicado pela inversão da sacarose (açúcar não redutor) em meio ácido. A inversão da sacarose e a caramelização são importantes reações decorrentes da cocção em pressão atmosférica²⁷. Essa redução dos açúcares não redutores nesse período também pode ter sido decorrente do início da reação de Maillard, processo químico em que os açúcares se complexam com aminoácidos formando pigmentos escuros²⁸, durante o aquecimento e armazenamento prolongado do produto²⁹.

Efeito do tempo e/ou temperatura nas análises físicas

Textura

A Tabela 3 representa o resumo da análise de variância dos parâmetros de textura, em que se observa um efeito significativo a um nível de 5% da interação tempo x temperatura para firmeza, adesividade e coesividade. Para o parâmetro gomosidade, o tempo foi o fator que influenciou significativamente na alteração, não ocorrendo efeito significativo para o tempo e a temperatura nos resultados de mastigabilidade.

Os modelos de regressão em nível de 5% de significância foram estabelecidos a partir dos resultados experimentais das variáveis estudadas. A adequabilidade

Tabela 3. Resumo da análise de variância da textura da geleia da casca de banana-prata durante o armazenamento

F.V.	F_{cal}					
	F_{tab}	FaIR	AD	COE	GOM	MAST
Tempo (T1)	3,06	6,70*	33,75*	8,50*	8,00	0,47
Temperatura (T2)	3,68	2	1,92	4,25*	0,67	0,02
T1 x T2	2,64	4,30*	5,19*	4,25*	2,33	0,14

* Valor do teste F significativo ao valor nominal de 5% de probabilidade
FIR: firmeza; AD: adesividade; COE: coesividade; GOM: gomosidade; MAST: mastigabilidade

dos modelos completos pode ser verificada pelos coeficientes de determinação (R^2), que explicam entre 70 e 98% da variância total das respostas (Tabela 4).

Para os parâmetros coesividade e gomosidade não se ajustou um modelo matemático, pois seus coeficientes de determinação foram menores que 70%, significando que o modelo ajustado não se adequou aos dados experimentais. O mesmo ocorreu com a firmeza, adesividade e cor b* na temperatura de 20 °C.

A consistência da geleia é consequência de dois fatores da estrutura, ou seja, a continuidade, ligada à concentração de pectina, e a rigidez, relacionada à concentração de açúcar e ácido³⁰. As propriedades da textura são importantes componentes na percepção e aceitabilidade da qualidade de alimento, sendo um reflexo da composição química do alimento e sua estrutura.

Tabela 4. Equações de regressão com variáveis codificadas e coeficientes de determinação dos modelos completos para as respostas das análises físicas da geleia da casca de banana-prata

Resposta	Tempo (dias)	Temperatura (°C)	Modelo estimador	R^2
Firmeza (g)		20	$y = -1E-06x^2 - 0,000x + 0,28$	0,308
		30	$y = -2E-05x^2 + 0,002x + 0,212$	0,868
		40	$y = -0,000x + 0,252$	0,843
Adesividade (g.s)		20	$y = 2E-05x^2 - 0,001x - 0,928$	0,452
		30	$y = 3E-05x^2 - 0,003x - 0,881$	0,796
		40	$y = 0,003x - 1,045$	0,720
Cor L*	165		$y = -0,095x + 35,78$	0,836
Cor a*	165		$y = -0,001x^2 + 0,208x + 10,70$	0,891
Cor b*		20	$y = -0,000x^2 + 0,123x + 11,22$	0,492
		30	$y = -0,079x + 12,67$	0,819
		40	$y = -0,069x + 9,676$	0,767

A textura da geleia está diretamente relacionada à formação do gel, que é uma variável dependente da concentração de ácido, pectina, sólidos solúveis, tempo e temperatura de armazenamento. Por meio da análise de textura pelo texturômetro, podem ser determinados diferentes parâmetros diretamente (firmeza, fraturabilidade e adesividade) e/ou indiretamente (coesividade, elasticidade, mastigabilidade, espalhabilidade, gomosidade)³¹.

Observa-se que a adesividade diminuiu em termos de valores absolutos ao longo dos 165 dias de armazenamento, possivelmente pelo fato de o pH ter reduzido no mesmo período, fazendo com que as redes de pectina se rompam, tornando o sistema menos adesivo, ou seja, menos firme¹³. Rahman e Al-Farsi³² observaram que, quando a umidade e a atividade de água diminuem, a adesividade aumenta, justificando o ocorrido no presente trabalho, pois nota-se decréscimo da atividade de água.

A firmeza teve seu valor reduzido ao longo do armazenamento nas diferentes temperaturas, sendo que, à medida que a temperatura aumentou, a firmeza reduziu, podendo isso ser explicado pela descontinuidade da estrutura da geleia, justificada pelo aumento da acidez durante o tempo de armazenamento¹³.

Cor

Por meio da análise de variância, os resultados encontrados foram significativos em relação ao tempo e à temperatura de armazenamento para os valores das cores L* e a*, ocorrendo interação tempo x temperatura para os valores de b* (Tabela 5).

A pectina é um fator que em muito contribui para alterações no valor da cor L*. A ação está ligada à sua característica de geleificar uma mistura com açúcar e ácido, quando em concentrações ideais, e, assim, formar um estado amorfo da geleia. Este, por sinal, tem propriedade de transmitir boa parte da luz incidida, conferindo aspecto claro ao produto. Policarpo et al.³³

observaram uma redução na cor L* dos doces em massa de umbu para as formulações com acréscimo de pectina.

As alterações na cor da geleia da casca de banana-prata durante a estocagem foram diretamente proporcionais ao aumento da temperatura de armazenamento, ou seja, ocorreram de maneira mais pronunciada na geleia mantida a 40 °C (Tabela 4), concordando com os resultados encontrados por Miguel et al.²⁴ para a gelejada de morango armazenada por 180 dias.

Nos valores encontrados para L*, a* e b*, observa-se uma tendência à redução em todos os parâmetros, sendo que aos 75 dias ocorreu um aumento da coloração vermelha (a*), tendendo à redução ao final da estocagem. Observou-se também uma redução da coloração amarela (b*) e da luminosidade (L*) ao longo dos 165 dias.

Em geleias de abacaxi a cor se relaciona com os pigmentos carotenoides da fruta. Os carotenoides são responsáveis por colorações que vão desde o amarelo até o vermelho, de fácil degradação. Sua estabilidade ao longo do tempo depende de uma série de fatores, como temperatura, disponibilidade de O₂, transmissão de luz do material de embalagem, a_w, entre outros³⁴. O mesmo ocorre para a coloração da casca da banana-prata quando a degradação da clorofila por enzimas dá origem à coloração amarela, originando a coloração encontrada na geleia da casca de banana.

No entanto, a luminosidade (L*) foi alterada significativamente em função do tempo, promovendo o escurecimento das geleias. Policarpo et al.³³ e Cardoso³⁵ detectaram o escurecimento durante o armazenamento de doce de umbu em massa e geleia de jumbo, respectivamente. Esse fato se deve provavelmente à oxidação de pigmentos presentes (clorofila, caroteno, compostos fenólicos), gerando cor escura^{36,37}.

CONCLUSÃO

As diferentes temperaturas interferiram significativamente na estabilidade em relação aos açúcares redutores, à atividade de água e à luminosidade. A interação tempo x temperatura interferiu nos parâmetros de pH, sólidos solúveis, adesividade, firmeza, coesividade e cor *b (amarela) da geleia da casca de banana-prata até 165 dias de armazenamento. O tempo foi o fator que mais influenciou na qualidade da geleia, ocorrendo uma diminuição da atividade de água, umidade, açúcares não redutores, luminosidade, valor absoluto da adesividade e firmeza e um aumento da acidez.

Tabela 5. Resumo da análise de variância de cor da geleia da casca de banana-prata durante o armazenamento

E.V.	F _{cal}			
	F _{tab}	L*	a*	b*
Tempo (T1)	3,06	39,28*	13,19*	12,95*
Temperatura (T2)	3,68	17,10*	7,56	14,89*
T1 x T2	2,64	2,38	1,77*	4,62*

* Valor do teste F significativo ao valor nominal de 5% de probabilidade

*L – cor *L (luminosidade); *a – cor *a vermelha; *b – cor *b (amarela)

REFERÊNCIAS

1. Torre-Gutiérrez L, Chel-Guerreo LA, Betancur-Ancona D. Functional properties of square banana (*Musa balbisiana*) starch. *Food Chem*. 2008;106:1138-44.
2. Silva Neto SP, Guimarães TG. Evolução da cultura da banana no Brasil e no mundo. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011 [acesso 2011 Mai 25]. Disponível em: [http://www.cpac.embrapa.br/noticias/artigosmidia/publicados/287/].
3. Andrade FWR, Amorim EPR, Eloy AP, Rufino MJ. Ocorrência de doenças em bananeiras no estado de Alagoas. *Summa Phytopathol*. 2009;35(4):305-9.
4. Matsuura FCAU, Jane IPC, Folegatti MIS. Marketing de banana: preferências do consumidor quanto aos atributos de qualidade dos frutos. *Rev Bras Fruticult*. 2004;26(1):48-52.
5. Souza I, Pereira MCT, Ribeiro RCF, Nietsche S, Victor MM, Lemos JP. Plantio irrigado de bananeiras resistentes à Sigatoka-Negra consorciado com culturas anuais. *Rev Bras Fruticult*. 2010;32(1):172-80.
6. Souza O, Federizzi M, Coelho B, Wagner TM, Wisbeck E. Biodegradação de resíduos lignocelulósicos gerados na bananicultura e sua valorização para a produção de biogás. *Rev Bras Eng Agric Ambient*. 2010;14(4):438-43.
7. Oliveira LF, Nascimento MRF, Borges SV, Ribeiro PCN, Ruback VR. Aproveitamento alternativo da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) para a produção de doce em calda. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2002;22(3):259-62.
8. Silva AFR, Zambiasi RC. Aceitabilidade de geleias convencional e light de abacaxi obtidas de resíduos da agroindústria. *Bol Centr Pesq Process Aliment*. 2008;26(1):1-8.
9. Figueiredo LP, Valente WA, Dias MV, Borges SV, Pereira PAP, Pereira AGT, et al. Efeito da adição de suco de maracujá e tempo de cozimento sobre a qualidade de doces do albedo de maracujá em calda. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2009;29(4):840-6.
10. Silva MBL, Ramos AM. Composição química, textura e aceitação sensorial de doces em massa elaborados com polpa de banana e banana integral. *Rev Ceres*. 2009;56(5):551-4.
11. Ferreira JF, Freitas GM, Bueno GS, Filho TG, Canciam CA. Biscoito de abóbora Kabutiá com casca e bolo de banana Caturra com casca: elaboração e análise sensorial. V Semana de Tecnologia em Alimentos. 2007;2(1).
12. Silva MBL, Chaves JBP, Lelis VG, Alvarenga LM, Zuim DR, Silva PHA. Qualidade físico-química e sensorial de aguardentes de polpa de banana e banana integral submetidas à hidrólise enzimática. *Alim Nutr*. 2009;20(2):217-21.
13. Besbes S, Drira L, Blecker C, Deroanne C, Attia H. Adding value to hard date (*Phoenix dactylifera* L.): compositional, functional and sensory characteristics of date jam. *Food Chem*. 2009;112:406-11.
14. Saravacos GD. Effect of temperature on viscosity of fruit juices and purées. *J Food Sci*. 1970;35:12325.
15. Carbonell E, Costell E, Durán L. Rheological behavior of sheared jams. Relation with fruit content. *J Texture Stud*. 1991;22:33-43.
16. Sousa PHM, Maia GA, Sousa Filho MSM, Figueiredo RW, Nassu RT, Borges MF. Avaliação de produtos obtidos pela desidratação osmótica de banana seguida de secagem. *Bol Cent Pesq Process Aliment*. 2003;21(1):109-20.
17. Mororó RC. Como montar e operar uma pequena fábrica de doces e geleias. Viçosa, (MG): CPT; 2001.
18. Instituto Adolfo Lutz. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. São Paulo: IMESP, 3ª ed., 1985;139-140.
19. Association of Official Analytical Chemistry. Official methods of analysis of the association of analytical chemistry. 12nd ed. Washington (DC); 1992.
20. Pereira DBC, Silva PHF, Costa-Junior LCG, Oliveira LL. Físico-química do leite e derivados: métodos analíticos. 2ª ed. Juiz de Fora: EPAMIG; 2001.
21. Giese J. Color measurement in foods as a quality parameter. *Food Technol*. 2003;54(2):62-3.
22. Ferreira DF. Análise multivariada. Lavras: UFLA; 1996.
23. Jackix MH. Doces, geleias e frutas em calda. Campinas: ICONE; 1988.
24. Miguel ACA, Albertini S, Spoto MHF. Cinética da degradação de geleia de morango. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2009;29(1):142-7.
25. Nachtigall AM, Souza EL, Malgarim MB, Zambiasi RC. Geleias light de amora-preta. *Bol Cent Pesq Process Aliment*. 2004;22(2):337-54.
26. Queiroz MB, Braúna IRL, Fadini AL, Kieckbusch TG. Solubilidade de equilíbrio de sacarose em misturas multicomponentes de açúcares. *Braz J Food Technol*. 2008;11(1):70-7.
27. Albuquerque JP. Fatores que influem no processamento de geleias e geleias de frutas. *Bol Soc Bras Ciênc Tecnol Aliment*. 1997;15(3):268-78.
28. Bobbio PA, Bobbio FO. Química do processamento de alimentos. São Paulo: Varela; 1992.
29. Araújo JMA. Química de Alimentos: teoria e prática. 2ª ed. Viçosa (MG): UFV; 1999.
30. Torrezan R. Preparo caseiro de geleias. Rio de Janeiro: Embrapa-CTAA; 1997.
31. Durán L, Fiszman SM, Barber CB. Propriedades mecânicas empíricas. In: Alvarado JD, Aguilera JM (Ed.). Métodos para medir propriedades físicas em indústrias de alimentos. Zaragoza: Acríbia; 2001.p.22-43.
32. Rahman MS, Al-Farsi SA. Instrumental texture profile analysis (TPA) of date flesh as a function of moisture content. *J Food Engineer*. 2005;66(4):505-11.
33. Policarpo VMN, Borges SV, Endo E, Castro FT, Anjos VD, Cavalcanti NB. Green umbu (*Spondias Tuberosa* Arr.Cam.) preserve: physical, chemical and microbiological changes during store. *J Food Process Preserv*. 2007;31(2):201-10.
34. Azeredo HMC, Brito ES, Garruti DS. Alterações químicas durante a estocagem. In: Azeredo HMC. Fundamentos de estabilidade de alimentos. Fortaleza: EMBRAPA Agroindústria Tropical; 2004.p.37-59.
35. Cardoso RL. Estabilidade da cor de geleia de jambo (*Eugenia malaccensis*, L.) sem casca armazenado aos 25°C e 3 °C na presença e ausência de luz. *Ciênc Agrotecnol*. 2008;32(5):1563-67.
36. Fennema OR. Química de los alimentos. Zaragoza: Acríbia;1992.
37. Lin CH, Chen BH. Stability of carotenoids in tomato juice during storage. *Food Chem*. 2005;90(4):837-46.

Influência do teor de NaCl no caviar à base de ovas de tainha (*Mugil platanus*)

Effect of NaCl contents in the mullet (*Mugil platanus*) spawn-based caviar

RIALA6/1341

Fabiano de Andrade FERREIRA, Nádia CARBONERA*, Milton Luiz Pinho Espírito SANTO

*Endereço para correspondência: Laboratório de Controle de Qualidade de Alimentos, Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Campus Cidade, Rua Engº Alfredo Huch, 475, Rio Grande, RS, Brasil, Caixa Postal 474, CEP: 96201-900, tel: 53 3233-8745, e-mail: nadiacarbonera@yahoo.com.br

Recebido: 25.07.2010 – Aceito para publicação: 16.02.2011

RESUMO

Com o objetivo de efetuar o desenvolvimento de um produto tipo caviar à base de ovas de tainha (*Mugil platanus*), foram preparadas várias formulações em função do teor de cloreto de sódio adicionado: 3,5 (A); 5,0 (B) e 6,5% (C). As amostras A, B e C foram avaliadas quanto às características físico-químicas. Os maiores valores obtidos foram observados na determinação de umidade na amostra B (47,83%), em relação a cinzas na amostra A (1,91%), lipídios na amostra A (11,13%), proteínas (23,37%) na amostra B, carboidratos na amostra B (17,15%) e os resultados de valores calóricos e de pH corresponderam, respectivamente, a 258,61 kcal/100 g (A) e 4,5 (A). Na avaliação microbiológica das três formulações utilizadas na elaboração do produto, foram obtidos os seguintes resultados: micro-organismos aeróbios viáveis < 10 UFC/g, coliformes termotolerantes < 3 NMP/g, *Staphylococcus* coagulase positiva < 10² UFC/g e ausência de *Salmonella* spp. nas amostras A, B e C estudadas.

Palavras-chave. ovas de pescado, valor agregado, produtos pasteurizados, controle de qualidade.

ABSTRACT

The present study aimed at developing a new product, the mullet (*Mugil platanus*) spawn-based caviar. Three formulations were prepared varying the concentration of sodium chloride added: 3.5, 5.0 and 6.5%, corresponding to A, B and C samples, respectively. The physico-chemical characterization results in samples A, B, and C were: humidity: 47.35, 47.83 and 47.65%; ashes: 1.91, 1.88 and 1.87%; lipids: 11.13, 10.77 and 10.80%; proteins: 23.33, 23.37 and 22.91%; carbohydrates: 16.26, 17.15 and 16.78%; caloric value: 258.61, 255.03 and 255.93 Kcal/100 g; pH: 4.5, 4.3 and 4.4, respectively. Considering the formulations applied, the data on microbiological evaluation of the mullet spawn were total viable aerobic count (< 10 CFU/g), thermo-tolerant coliforms (< 3 MPN/g), coagulase positive *Staphylococcus aureus* (< 10² CFU/g), and absence of *Salmonella* spp. (25 g). This new product might be an alternative product to be consumed as a new seafood.

Keywords. fish spawn, aggregated value, pasteurized products, quality control.

INTRODUÇÃO

O consumo de produtos pré-prontos vem crescendo de maneira significativa nos grandes centros urbanos devido às mudanças no estilo de vida, que exigem operações culinárias de rápido preparo. Dessa forma, as indústrias pesqueiras passaram a investir em novas tecnologias para elaboração de seus produtos^{1,2}.

Há indicativos que apontam para o desenvolvimento de alimentos processados na forma de embutidos e pastas a partir de polpa de pescado, dirigidos a um grupo de consumidores específicos³.

O conhecimento das características físico-químicas de diferentes espécies marinhas permite a elaboração de produtos alternativos. Nesse sentido, produtos de pescado do tipo caviar poderão se constituir em um alimento alternativo com elevado valor agregado⁴. O principal produtor de caviar é a Rússia⁵. As ovas são extraídas a partir de três espécies de esturjão, a beluga (*Huso huso*), osetra (*Acipenser gueldenstaedtii colchicus*) e o sevruga (*Acipenser stellatus*)^{6,7}.

De um modo geral, o pescado é processado de maneira que sua fração muscular seja direcionada para o consumo. No entanto, com relação às suas vísceras ou órgãos, descarta-se sua utilização para a alimentação humana, à exceção do fígado de algumas espécies, que é processado para a obtenção de óleos comestíveis⁸. O processamento de ovas apresenta peculiaridades próprias; na costa mediterrânea são geralmente processadas mediante salga e desidratação e, no norte da Europa e em países próximos ao Mar Cáspio, são unicamente submetidas à operação de salga. Essas técnicas geram produtos diferenciados com características sensoriais específicas. Dentre todos os tipos, o caviar beluga é o de maior valor comercial; apresenta elevada qualidade nutricional, contém 48% de substâncias orgânicas, 40% de umidade e 12% de lipídios⁹. Pode ser produzido a partir de ovas de pescado fresco e poderá ser processado nas formas congelada, defumada, prensada e acondicionada em latas ou vidros na forma de semiconservas^{6,9}.

De acordo com o Código Alimentar Argentino¹⁰, entende-se por caviar o produto elaborado com ovas de várias espécies de esturjão adicionado de NaCl. O caviar fresco apresenta os grãos aglomerados e caracterização físico-química apresentando 55% de umidade, 18% de lipídios e 23% de proteínas.

A tainha (*Mugil platanus*) é uma espécie de peixe pertencente à família *Mugilidae* que habita

águas demersais estuarinas e marinhas. Essa espécie é encontrada no sudoeste do Atlântico Sul, desde o Rio de Janeiro (Brasil) até o extremo sul da Argentina¹¹. Segundo Silva¹², essa espécie é considerada de médio a grande porte, podendo atingir até 1 m de comprimento.

Ranzani-Paiva e Tavares-Dias¹³ sugerem que, as variações de temperatura e salinidade influenciam as capturas anuais dessa espécie. E o contato com águas de elevada salinidade, nos meses que antecedem a migração reprodutiva, acelera o processo de maturação gonadal. Nos meses de menor salinização, o desenvolvimento gonadal e a migração das espécies seriam retardados, afetando o comportamento migratório e, conseqüentemente, a sua captura pela pesca artesanal¹⁴.

A microbiota do caviar é composta por micro-organismos que se multiplicam entre 35 e 37 °C, tais como bactérias, leveduras e bolores¹⁵. Os micro-organismos oriundos da contaminação podem ser transmitidos para as ovas durante o processamento e causarem um efeito negativo na qualidade e segurança alimentar do produto final, devido à falta das condições higiênico-sanitárias adequadas^{16,17,18}.

Embora muitos trabalhos apresentem resultados científicos de produtos tipo caviar obtidos a partir de ovas de esturjão, existem poucos relatos sobre as características e variações físico-químicas associadas com a utilização de ovas de tainha (*Mugil platanus*). O presente estudo teve por objetivo avaliar as características físico-químicas e a variação microbiológica que ocorreu na elaboração dessa semiconserva, visando à sua utilização no desenvolvimento de novos produtos com valor agregado.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

A matéria-prima utilizada foram ovas frescas extraídas de tainhas (*Mugil platanus*), recém-capturadas e adquiridas de indústrias locais. Foram utilizadas 3 amostras com 4 kg de ovas frescas de tainha, totalizando 12 kg. As ovas foram extraídas de peixes adultos e, posteriormente, acondicionadas em sacos de polietileno de baixa densidade. Posteriormente, foram conservadas sob congelamento a -18 °C até sua utilização para as respectivas determinações analíticas.

Métodos

As ovas foram descongeladas sob refrigeração a 8 °C e imediatamente peneiradas para separar os

grãos do tecido conectivo. Posteriormente, realizou-se o cozimento dos grãos em cozinhadores basculantes, aquecidos por camisa de vapor durante 8 min. a 72 °C juntamente com a adição de aditivos e ingredientes. O pH final do produto ficou entre 4,3 e 4,5.

Os experimentos se caracterizaram por formulações variáveis em função do teor de NaCl: 3,5% (amostra A); 5,0% (amostra B) e 6,5% (amostra C). As ovas processadas foram acondicionadas em potes de vidro na quantidade de 40 g e, posteriormente, pasteurizadas a 70 °C em banho-maria por 30 min. A seguir, realizou-se o resfriamento até o produto atingir 20 °C. Os vidros foram secos por meio de aspersões de ar comprimido e estocados à temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C).

Caracterização físico-química

A determinação da composição proximal foi realizada segundo técnicas da AOAC¹⁹; umidade e cinzas por gravimetria (Técnicas N°. 950.46 e 938.08); proteínas pelo método micro-Kjeldahl (Técnica N°. 940.25); e lipídios por extração com solvente orgânico (Técnica N°. 991.36). O pH das amostras homogeneizadas foi medido potenciométricamente¹⁹. Cada medição representou a média de três repetições. O valor calórico total, expresso em kcal/100 g, foi calculado pelos fatores de *Atwater* para a matéria-prima e o produto final conforme Chizzolini et al.¹⁵.

Avaliação microbiológica

Foram retirados asepticamente 25 g da amostra e realizadas diluições sucessivas em solução de água peptonada 0,1%. Para a detecção de *Salmonella* spp., foram avaliadas porções com 25 g de amostra adicionadas em 225 mL de caldo lactosado²⁰. A enumeração de

micro-organismos aeróbios viáveis foi realizada pelo método do plaqueamento em profundidade em Plate Count Agar – PCA. Após a inoculação e solidificação do meio, as placas foram invertidas e incubadas a 37 °C por 48 h²⁰. Para a determinação de coliformes termotolerantes, foi utilizada a técnica do Número Mais Provável (NMP), indicada para a detecção de baixas concentrações de coliformes e por apresentar maior sensibilidade do que os métodos comuns de plaqueamento²⁰. Como meio seletivo para a enumeração de *Stapylococcus* coagulase positiva, foi utilizado o Ágar Baird Parker. O meio combina o telurito de potássio (0,01%), glicina (1,2%) e cloreto de lítio (0,5%) como agentes seletivos e a redução do telurito e a hidrólise da gema de ovo como características diferenciais²⁰.

Na detecção de *Salmonella* spp., a análise consistiu no pré-enriquecimento de 25 g da amostra com 225 mL de caldo lactosado. O meio inoculado foi incubado a 37 °C por 24 h. A seguir, foi realizado o enriquecimento seletivo em caldo selenito cistina e em caldo tetrationato. Posteriormente, foram feitas identificações bioquímicas conforme metodologia da APHA²⁰.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização físico-química da matéria-prima

O conhecimento da variação sazonal relacionado com a composição química do pescado é de grande importância tecnológica, pois influencia o rendimento industrial, o sabor e a textura¹.

A composição físico-química das ovas de pescado difere sazonalmente de espécie para espécie. Diferenças são observadas também de acordo com o estado de maturação das gônadas, sendo que, quanto maior o desenvolvimento, menor o conteúdo de lipídios e maior

Tabela 1. Caracterização físico-química de ovas de tainha (*Mugil platanus*)

Componentes	Amostras			Média	Desvio-padrão
	1	2	3		
Umidade (g/100g)	56,83	56,22	56,48	56,51	0,31
Cinzas (g/100g)	1,95	1,70	1,91	1,85	0,13
Lipídios (g/100g)	13,20	12,85	13,07	13,04	0,17
Proteínas (g/100g)	24,68	25,77	25,32	25,26	0,55
Carboidratos (g/100g)	3,34	3,46	3,22	3,34	0,12
pH	6,1	5,9	6,0	6,0	0,1
Valor Calórico (kcal/100g)	230,85	232,60	232,60	231,75	0,87

o conteúdo de umidade²¹. A Tabela 1 apresenta os valores da composição físico-química das ovas de tainha (*Mugil platanus*) utilizadas no estudo.

Czesny et al.²² verificaram que as ovas de esturjão apresentaram conteúdo de lipídios que variaram entre 10,8 e 13,5%. De acordo com Whirth et al.⁹, a composição proximal de ovas de pescado relacionada com o teor de umidade apresentou 45,0% para o salmão e 58,0% para a carpa. Os valores relacionados com os teores de proteínas se situaram entre 25 e 33% e os de lipídios entre 4,05 e 11,5%, respectivamente para o salmão e para a carpa. Os resultados encontrados indicaram que a composição química das ovas de tainha é semelhante à de outras espécies.

Com relação ao pH, os valores obtidos se situaram entre 5,9 e 6,1. Os resultados apresentados indicaram uma adequada conservação do pescado e, especificamente, das ovas, matéria-prima utilizada na elaboração do caviar.

Os fenômenos de aparecimento e resolução da rigidez cadavérica são rápidos em peixes, porém o enrijecimento *post mortem* e a queda do pH são graduais, geralmente entre 5,6 e 7,0. É desejável que a conservação pelo frio ocorra o mais rapidamente possível em pH reduzido, possibilitando o aumento da vida útil²¹.

Neste trabalho, o valor calórico das ovas se situou entre 230,85 e 232,60 kcal/100 g. De acordo com Brunner et al.¹⁸, os valores calóricos para as ovas de várias espécies variaram de 130 a 280 kcal/100 g.

Avaliação microbiológica da matéria-prima

Conforme Altug e Bayrak⁵, durante o processo de extração das ovas, micro-organismos aeróbios viáveis presentes na superfície do pescado podem ser transferidos para as ovas, constituindo grande risco para a segurança alimentar do produto final. A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos na avaliação microbiológica das ovas de tainha (*Mugil platanus*), que

Tabela 2. Avaliação microbiológica das ovas de tainha (log₁₀ UFC/g)

Micro-organismos	Amostras		
	1	2	3
Micro-organismos aeróbios viáveis (UFC/g)	4,2	4,3	4,3
Coliformes termotolerantes (NMP/g)	< 3	< 3	< 3
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (UFC/g)	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ²
<i>Salmonella</i> spp.	Ausente	Ausente	Ausente

indicam adequadas condições higiênico-sanitárias na manipulação desses órgãos reprodutivos.

Com relação às espécies marinhas tropicais, a carga de micro-organismos aeróbios viáveis inferior a 10⁷ UFC/g indica um pescado com qualidade microbiológica aceitável para o consumo humano²³. Neste estudo, verificaram-se variações entre 4,2 e 4,3 log₁₀ UFC/g.

Na avaliação de coliformes termotolerantes, os valores encontrados em todas as amostras de ovas foram < 3 NMP/g. De acordo com Farias e Freitas²⁴, os valores reduzidos relacionados com este grupo de micro-organismos evidenciam práticas de manipulação apropriadas para a matéria-prima.

A enumeração de *Staphylococcus* coagulase positiva é utilizada como indicador de contaminação pós-processo ou das condições de sanificação das superfícies operacionais²⁵. Os resultados obtidos indicam que foram seguidas as Boas Práticas de Manipulação durante o processamento do caviar. Segundo Hobbs et al.²⁶, a salmonela possui temperatura ótima de crescimento entre 35 e 37 °C. Como as ovas foram extraídas, acondicionadas em sacos de polietileno e imediatamente armazenadas a -18 °C, o efeito desse processamento contribuiu para a inibição desse micro-organismo. Todas as amostras apresentaram resultados negativos com relação à detecção desse patógeno. Segundo Beirão et al.²¹, com base no regulamento técnico que estabelece critérios e padrões microbiológicos para alimentos, os resultados indicam qualidade aceitável para processamento e posterior consumo.

Composição proximal do caviar

Os resultados da composição proximal do produto tipo caviar estão apresentados na Tabela 3. A redução da umidade em relação à matéria-prima foi devida ao produto ter sofrido pré-cozimento antes da pasteurização.

De acordo com Neves et al.²⁷, as proteínas do tecido conectivo correspondem de 3 a 5% do total das proteínas e se concentram ao redor das fibras musculares e na região da epiderme. Pelo fato de, neste estudo, o tecido conectivo das ovas ter sido removido por peneiramento, pode-se ter contribuído para a redução do teor proteico. O aumento no percentual dos carboidratos é consequência da adição dos ingredientes e aditivos na formulação. Estudos realizados por Gerasimov e Antanova²⁸, e relacionados com a composição química do caviar de esturjão, mostraram conteúdos de umidade variando entre 51,5 e 55%,

Tabela 3. Caracterização físico-química do caviar de ovas de tainha

Componentes	Amostras			Média	Desvio-padrão
	1	2	3		
Umidade (%)	47,35	47,83	47,65	47,61	0,24
Cinzas (%)	1,91	1,88	1,87	1,88	0,02
Lipídios (%)	11,13	10,77	10,80	10,90	0,18
Proteínas (%)	23,33	22,37	22,91	22,87	0,48
Carboidratos (kcal/100g)	16,26	17,15	16,78	16,75	0,43
pH	4,5	4,3	4,4	4,4	0,1
Valor Calórico (kcal/100g)	258,61	255,03	255,93	256,53	1,86

proteínas entre 26 e 28% e lipídios entre 14 e 16%. Whirth et al.⁹ realizaram determinações da composição química em 22 espécies de esturjão e obtiveram como resultados os seguintes valores: proteínas, entre 22,2 e 31,3%; e lipídios, entre 10,9 e 19,4%.

O pH, por ser uma variável crítica neste tipo de tratamento (semiconserva), deverá ser sempre inferior a 4,5 se considerarmos a potencialidade do *Clostridium botulinum* e sua capacidade esporulante para o risco alimentar. Acima desse valor, a esporulação desse micro-organismo é fator de risco em processos infecciosos¹⁸. Os resultados no presente estudo demonstraram que o produto final apresentou uma variação de pH entre 4,3 e 4,5, ficando na faixa de inibição desse micro-organismo.

Conforme Franco²⁹, o caviar produzido a partir de diferentes espécies de pescado apresenta valor calórico entre 200 e 290 kcal/100 g. Para o caviar de esturjão, é de aproximadamente 262 kcal/100g, segundo publicação do Sea Grant Institute – SGI³⁰. O resultado encontrado neste estudo mostrou valores entre 255,03 e 258,61 kcal/100 g, semelhantes aos valores encontrados na literatura.

Tabela 4. Resultados microbiológicos do caviar de ovas de tainha (\log_{10} UFC/g)

Micro-organismos	Amostras		
	1	2	3
Micro-organismos aeróbios viáveis (UFC/g)	< 10	< 10	< 10
Coliformes termotolerantes (NMP/g)	< 3	< 3	< 3
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (UFC/g)	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ²
<i>Salmonella</i> spp.	Ausente	Ausente	Ausente

Avaliação microbiológica

A Tabela 4 apresenta os resultados das avaliações microbiológicas do caviar de ovas de tainha.

A baixa enumeração de micro-organismos aeróbios viáveis demonstra que houve adequada manipulação higiênico-sanitária durante o processamento. A limitação do desenvolvimento microbiano e a otimização de fatores que previnam esse efeito são de grande importância no que diz respeito à manutenção da segurança alimentar e estão relacionadas com a sua inocuidade. A concentração de NaCl acima de 4% e o pH entre 4 e 5 promovem uma inibição da microbiota deterioradora. Em seus estudos, Altug e Bayrak⁵, após realizarem avaliações microbiológicas em 22 amostras de caviar, oriundas da Rússia e do Irã, obtiveram os seguintes resultados: micro-organismos aeróbios viáveis, 10³ a 2,6 x 10⁶ UFC/g; coliformes termotolerantes, <10¹ a 2,4 x 10⁴ NMP/g; *Staphylococcus* coagulase positiva, 5 x 10² UFC/g; e ausência de *Salmonella* em todas as amostras.

Conforme os resultados no presente estudo, todos os valores ficaram abaixo do limite máximo estabelecido pela ICMSF²³, indicando um produto apropriado para o consumo.

CONCLUSÃO

É possível a utilização desse tipo de matéria-prima para o processamento de caviar a partir de ovas de tainha. Há uma visível possibilidade de aumento da oferta e diversificação desse produto na linha das semiconservas. Desde que sejam observados os requisitos higiênico-sanitários na extração das ovas, o seu processamento é apropriado para a obtenção desse tipo de produto.

REFERÊNCIAS

1. Gonçalves AA, Cezarini R. Agregando valor ao pescado de água doce: defumação de filés de jundiá (*Rhamdia quelen*). *Rev Bras Eng Pesca*. 2008; 3(2):5-11.
2. Czczuga B, Bartel R, Czczuga-Semeniuk E. Carotenoid content in eggs of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and brown trout (*Salmo trutta* L.) entering Polish rivers for spawning or reared in fresh water. *Acta Ichth Et Pisc*. 2002; 32(1): 3–21.
3. Tenuta AF, Jesus RS. Aspectos da utilização de carne mecanicamente separada de pescado como matéria-prima industrial. *Soc Bras Ciênc Tecnol Aliment*. 2003; 37(2):59-64.
4. Bledsoe GE, Bledsoe CD, Rasco B. Caviars and fish roe products. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2003; 43(3): 317–56.
5. Altug, AG, Bayrak Y. Microbiological analysis of caviar from Russia and Iran. *Food Microbiol*. 2003; 20:83-6.
6. Arbeloa EM, Uez MJ, Bertolotti SG, Churio MS. Antioxidant activity of gadusol and occurrence in fish roes from Argentine Sea. *Food Chem*. 2010; 119:586–91.
7. Gessner J, Wuertz S, Kirschbaum F, Wirth M. Biochemical composition of caviar as a tool to discriminate between aquaculture and wild origin. *J Appl Ichthyol*. 2008; 24:52–6.
8. Wuertz S, Gröper B, Gessner J, Krüger T, Luckas B, Krüger A. Identification of caviar from increasing global aquaculture production—Dietary capric acid as a labelling tool for CITES implementation in caviar trade. *Aquac Int*. 2009;298: 51-6.
9. Wirth M, Kirschbaum F, Gessner J, Krüger A, Patriche N, Billard, R. Chemical and biochemical composition of caviar from different sturgeon species and origins. *Nahrung/Food*. 2000; (44):233–7.
10. Argentina. Código Alimentário Argentino/Alimentos Cárneos y afines. [acesso em 02 de fevereiro de 2009.]. Disponível em: [http://www.anmat.gov.ar].
11. Carvalho CVA. Exigência protéica de juvenis de tainha *Mugil platanus*. [Dissertação de Mestrado]. Rio Grande, Rio Grande do Sul: Universidade Federal do Rio Grande; 2008.
12. Silva SRC. Material didático pedagógico sobre a tainha *Mugil platanus* – pesca e biologia. [Monografia de Especialização]. Rio Grande, Rio Grande do Sul: Universidade Federal do Rio Grande; 2003.
13. Ranzani-Paiva MJT, Tavares-Dias M. Eritrograma, relação viscerosomática, hepatosomática e esplenosomática em tainhas *Mugil platanus* Günther (Osteichthyes, Mugilidae) parasitadas. *Rev Bras Zool*. 2002; 19(3):807-18.
14. Recski J, Carvalho RV, Ruivo UE. A hora dos industrializados. *Aquic Pesca*. 2007; 27:30-7.
15. Chizzolini R, Zanardi E, Dorigoni V, Ghidini S. Calorific value and cholesterol content of normal and low-fat meat and meat products. *Int J Food Sci Tech*. 1999; 10:119-28.
16. Wang W, Batterman S, Chernyak S, Nriagu J. Concentrations and risks of organic and metal contaminants in Eurasian caviar. *Ecot Env Safety*. 2008; 71:138–140.
17. Caprino F, Moretti VM, Bellagamba F, Turchini GM, Busetto ML, Giani I, Palar MA, Pazzaglia M. Fatty acid composition and volatile compounds of caviar from farmed white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Anal Chim Acta*. 2008; 6(17): 139–47.
18. Brunner B, Marx H, Stolle A. Aspects of composition and hygiene relevant to caviar from the market. *Archiv fur Lebensmittel-hygiene*. 1995; 46(4):80–5.
19. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemistry. 16th ed. Washington (DC); 1997. p. 1141.
20. American Public Health Association (APHA). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3rd. ed. Washington (DC); 1992. p. 1219.
21. Beirão LR, Damian C, Sant’anna E, Franco BM, Espírito Santo MLP. Avaliação da atividade bacteriocinogênica do *Lactobacillus sakei* na fermentação da sardinha-verdadeira (*Sardinella brasilienses*) utilizando glicose como carboidrato fermentescível. *B CEPPA*. 2003; 21:83-98.
22. Czesny S, Dabrowski K, Christensen JE, Eenennaam JV, Doroshov S. Discrimination of wild and domestic origin of sturgeon ova based on lipids and fatty acid analysis. *J Food Sci*. 2000; 189:145-53.
23. International Commission on Microbiological Specification for Foods (ICMSF). Microorganisms in Foods. 2. Sampling for Microbiological Analysis: Principles and Specific Applications (2 ed.). 1986. London: Blackwell Scientific Publications.
24. Farias MCA, Freitas JA. Qualidade microbiológica de pescado beneficiado em indústrias paraenses. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2008; 67(2):113-7.
25. Brasil. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. Métodos analíticos para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. Métodos microbiológicos, físicos e químicos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, p. 23-52, 1981, Seção 1.
26. Hobbs BC, Roberts D, Nascimento MA. Toxinfecções e controle higiênico-sanitário de alimentos. São Paulo: Varela; 1993.
27. Neves RAM, Mira NVM, Marquez ML. Caracterização de hidrolisados enzimático de pescado. *Cienc Tecnol Aliment*. 2004; 24 (1):101-8.
28. Gerasimov GV, Antanova MT. The fish processing industry. New Delhi: Amerind Publishing; 1972.
29. Franco BDGM, Landgraf M. Microbiologia dos Alimentos. São Paulo (SP): Atheneu; 1996.
30. Sea Grant Institute. Calorie, fat and protein of fish and seafoods. University of Wisconsin; 1998.

Teor de cianeto total e livre nas etapas de processamento do tucupi

Total and free cyanide contents determination during the processing steps for preparing tucupi

RIALA6/1342

Renan Campos CHISTÉ^{1*}, Kelly de Oliveira COHEN²

*Endereço para correspondência: ¹Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Campinas, São Paulo, Brasil. CEP: 13083-862, tel: 55 19 35212159, fax: 55 19 3521-2153, e-mail: renanchiste@gmail.com

²Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento, Embrapa Sede, Parque Estação Biológica (PqEB)

Recebido: 01.06.2010 – Aceito para publicação: 31.03.2011

RESUMO

O tucupi, produto amplamente consumido pela população do norte do Brasil, é obtido por meio de fermentação e cocção da manipueira, que é um subproduto da fabricação da farinha de mandioca seca. No processamento são utilizadas as raízes de mandioca que contêm elevado teor de ácido cianídrico (HCN), as quais quando ingeridas causam sério dano à saúde. No presente trabalho foram quantificados os teores de cianeto total e livre durante as etapas de processamento da manipueira desde a obtenção até a produção do tucupi. Além disso, foram determinados pH, acidez total titulável e teor de sólidos solúveis durante todas as etapas de processamento. A manipueira recém-extraída apresentou valores de 227,8 mg HCN/L de cianeto total e 46,6 mg HCN/L de cianeto livre. Após as etapas de fermentação houve decréscimo no teor de HCN, e o produto final (tucupi) apresentou valores de 37,1 mg HCN/L de cianeto total e 8,9 mg HCN/L de cianeto livre. Quanto aos demais parâmetros, os valores encontrados foram: pH (3,6), acidez total titulável (12,3 meq NaOH/100 mL) e sólidos solúveis (8,1 °Brix). No presente estudo, o tucupi não apresentou valores elevados de cianeto total e livre após aplicação do processo de fermentação e cocção da manipueira.

Palavras-chave. *Manihot esculenta*, mandioca, fermentação, manipueira, ácido cianídrico.

ABSTRACT

Tucupi, a product highly consumed by population living in the north of Brazil, is obtained by fermenting and cooking manipueira, which is produced from dry cassava flour. For producing the tucupi, cassava roots with high contents of hydrogen cyanide (HCN) are used, and it is hazardous product when it is consumed. This study analyzed the total and free cyanide contents during the whole processing steps of manipueira until getting the final production of tucupi. In addition, pH, total acidity and soluble solids contents were determined during the all processing steps of tucupi production. The newly extracted manipueira showed 227.8 mg HCN/L of total cyanide and 46.6 mg HCN/L of free cyanide. After being treated by fermentation, manipueira showed a decrease in HCN contents, and the values of 37.1 mg HCN/L of total cyanide and 8.9 mg HCN/L of free cyanide were found in the final product tucupi. The values of pH (3.6), total acidity (12.3 meq NaOH/100mL) and soluble solids (8.1 °Brix) were found. In this study, the tucupi did not show high contents of total and free cyanide by employing fermentation and cooking processes of manipueira.

Keywords. *Manihot esculenta*, cassava, fermentation, manipueira, hydrogen cyanide.

INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) destaca-se como importante produto da agricultura familiar no norte e nordeste do Brasil, onde números expressivos de indivíduos do meio rural vivem da produção e processamento da farinha e outros produtos, constituindo atividades de baixo investimento e fácil comercialização. De acordo com o IBGE¹, estima-se que a quantidade de mandioca produzida no Brasil em 2009 foi de 24,4 milhões de toneladas, sendo o Pará o principal estado produtor com 4,5 milhões de toneladas, seguido do Paraná (3,6), Bahia (3,4), Rio Grande do Sul (1,3) e Maranhão (1,2).

Pertence ao grupo de plantas cianogênicas por apresentar glicosídeos cianogênicos em sua composição. De acordo com Cagnon et al.², tais glicosídeos, conhecidos como linamarina e lotaustralina (proporção de 93:7 no tubérculo), após ruptura da estrutura celular da raiz, entram em contato com as enzimas presentes (linamarase) degradando estes compostos, liberando ácido cianídrico (HCN), que é o princípio tóxico da mandioca e cuja ingestão, ou mesmo inalação, representa sério perigo à saúde, podendo haver casos extremos de envenenamento.

Uma das principais formas de aproveitamento das raízes de mandioca é na produção de farinha. Durante o processo de fabricação da farinha de mandioca, as raízes trituradas são prensadas para a remoção de seu líquido, e a massa prensada segue para a torração. Este resíduo líquido é denominado de manipueira. Da manipueira produz-se o tucupi, molho parcialmente fermentado e condimentado que é considerado um ingrediente muito apreciado e utilizado na culinária paraense. A composição do tucupi, segundo Chisté et al.³, varia entre 94,64 a 97,46% de umidade, 0,18 a 1,08% de resíduo mineral fixo, 0,33 a 0,66% de proteínas, sendo considerado alimento de pH baixo. A combinação entre esse pH baixo e o alto teor de linamarina pode levar à fixação do cianeto².

Segundo Cereda⁴, a manipueira representa potencial poluente devido à grande quantidade de material de origem orgânica esgotado, além da presença dos glicosídeos potencialmente hidrolisáveis a cianeto. Sendo assim, uma das formas de se evitar a poluição do meio ambiente é utilizar a manipueira na produção do tucupi.

Existem dados disponíveis sobre o teor de cianeto total e livre em 10 amostras de tucupi comercializadas na cidade de Belém, PA, Brasil³. No entanto, não foram reportados na literatura dados sobre os teores de cianeto ao longo do processo de produção do tucupi. Sabendo que o tucupi é preparado a partir da mandioca brava (teor de HCN superior a 100 mg HCN/kg de raiz sem casca), utilizada na fabricação da farinha seca, o objetivo deste trabalho foi avaliar a efetividade do processamento na produção do tucupi através da quantificação dos teores de cianeto total e livre.

MATERIAL E MÉTODOS

Matéria-prima

Para a produção do tucupi em laboratório foram utilizados 5 kg de raízes de mandioca da cultivar Boi Branco 54, com 16 meses, escolhidas de acordo com a disponibilidade das raízes e colhidas no mês de novembro de 2005. As raízes foram doadas pelo Banco de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, Brasil.

Processamento da mandioca para obtenção do tucupi

A produção do tucupi foi realizada em escala laboratorial, de maneira semelhante à utilizada nas casas de farinha do interior do Pará (Figura 1). A raiz de mandioca foi lavada em água corrente, descascada manualmente com auxílio de facas de aço inoxidável, triturada em processador de alimentos e prensada para remoção da manipueira. Em seguida, a manipueira

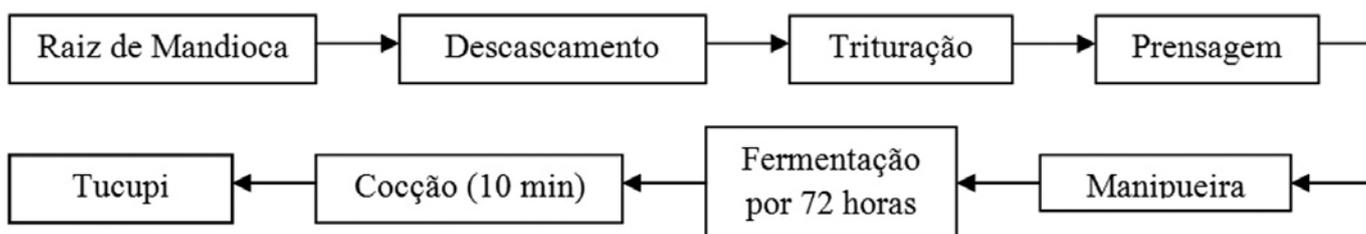


Figura 1. Fluxograma simplificado de processamento da manipueira para obtenção do tucupi

recolhida em recipientes de vidro permaneceu em repouso por 3 dias em temperatura ambiente (28 °C). Durante o repouso, houve decantação do amido, que foi posteriormente removido, ocorrendo naturalmente a sua fermentação. Após a etapa de fermentação da manipueira, foi realizada cocção por 10 minutos para obtenção do tucupi. O tucupi foi armazenado em geladeira (5 °C) até o momento de realização das análises.

Análises físico-químicas realizadas

As análises foram realizadas em cinco pontos do processamento após a obtenção da manipueira: manipueira recém-extraída (MRE); manipueira após 24 horas (M24); 48 horas (M48); 72 horas (M72) de fermentação; e no produto final após 10 minutos de cocção (T). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Determinação do pH

Determinado através de leitura direta em potenciômetro devidamente calibrado com as soluções tampões pH 7,0 e 4,0 a 20 °C, segundo método nº 981.12 da AOAC⁵.

Determinação de sólidos solúveis (°Brix)

Determinado pelo método refratométrico pela leitura direta dos graus Brix da amostra a 20 °C em refratômetro digital de bancada, de acordo com o método nº 932.12 da AOAC⁵.

Determinação da acidez total titulável

A acidez total titulável foi determinada através de titulação da amostra com NaOH 0,1 N, sendo o pH da solução monitorado por potenciômetro, segundo método nº 942.15B da AOAC⁵. O resultado foi expresso em miliequivalentes (meq) de NaOH/100 mL.

Determinação de cianeto total e livre

As amostras retiradas nas etapas de produção do tucupi foram analisadas em quadruplicata para quantificação do cianeto total e livre por espectrofotometria, utilizando a metodologia descrita por Cooke⁶ e, posteriormente adaptada por Essers et al.⁷, com algumas modificações. Nesta metodologia, baseada na reação de *König*, o cianeto (CN⁻) é oxidado a haleto de cianogênio cloroamina T ou N-clorosuccinimida. Este composto reage com ácido isonicotínico para produzir um dialdeído, que acopla com aminas ou compostos com o grupamento metileno ativo, como ácido dimetilbarbitúrico, para

formar um complexo colorido, e posterior leitura em espectrofotômetro a 605 nm.

Para extração dos compostos cianogênicos, foram pipetados 10 mL de amostra, adicionados 60 mL de solução alcoólica de ácido fosfórico 0,1 M (solução extratora) e centrifugados a 3000 rpm/10 min. Após centrifugação, o extrato sobrenadante, contendo os glicosídeos cianogênicos, foi transferido para balão volumétrico de 100 mL.

Para determinação de cianeto total, 0,1 mL do extrato ácido obtido foi adicionado em tubo de ensaio contendo 0,4 mL de tampão pH 7,0, sendo adicionada, então, a enzima linamarase e o tubo submetido a banho-maria por 15 min a 30 °C, promovendo a lise dos glicosídeos cianogênicos. Após esta etapa, foi adicionado 0,6 mL de solução NaOH 0,2 M e deixado por 5 minutos em repouso à temperatura ambiente (25±1 °C), decompondo a cianoidrina rapidamente para cianeto em solução alcalina. Em seguida, foram adicionados 2,8 mL de tampão pH 6,0 e 0,1 mL de cloroamina T, agitando-se o tubo para homogeneizar o conteúdo e sendo, depois, submetido a banho de gelo por 5 minutos. Finalmente, foi adicionado 0,6 mL do reagente de cor no tubo de ensaio, sendo agitado posteriormente e deixado em repouso por 10 minutos à temperatura ambiente. Depois de passado o tempo da reação, o complexo colorido contido no tubo de ensaio, de cor azul, foi lido em espectrofotômetro a 605 nm.

Para determinação de cianeto livre, 0,6 mL do extrato ácido obtido foi adicionado em tubo de ensaio contendo 3,4 mL de tampão pH 6,0. Foi adicionado 0,1 mL de cloroamina T, e os tubos foram agitados para homogeneizar o conteúdo e, em seguida, foram submetidos a banho de gelo por 5 minutos. Após transcorrido o tempo, 0,6 mL de reagente de cor foi adicionado ao tubo de ensaio, agitado e deixado em repouso por 10 minutos à temperatura ambiente para posterior leitura a 605 nm.

A curva de calibração foi construída em espectrofotômetro UV-visível Shimadzu (Tóquio, Japão) a partir de 11 pontos, com concentração variando de 0,013 a 2,708 µg HCN.0,1 mL⁻¹.

Análise estatística

Os resultados médios obtidos durante o estudo (média e desvio-padrão) foram analisados com o auxílio do programa Statistica[®] versão 6⁸ empregando as análises de variância (ANOVA) e Teste de Tukey (p<0,05).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As propriedades do tucupi dependem diretamente do processo de fabricação realizado, assim como da variedade da mandioca utilizada no processo de extração da manipueira, apresentando, dessa forma, pH baixo (3,6), elevada acidez total (12,3 meq NaOH/100 mL) e sólidos solúveis em média de 8,1 °Brix (Tabela 1).

De acordo com os valores de pH obtidos, durante o processo de fabricação do tucupi, não houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre a manipueira recém-extraída e após 24 horas de fermentação. Após 24 de fermentação até 72 horas de fermentação, o valor do pH diminuiu para 3,6 e no tucupi tal valor se manteve. Valores semelhantes de pH foram encontrados por Chisté et al.³ ao analisarem 10 amostras de tucupi comercializadas nas principais feiras e supermercados da cidade de Belém, PA. O pH é um fator importante que influencia na atividade de enzimas. De acordo com Cereda⁹, quando ocorre dilacerção dos tecidos vegetais das raízes de mandioca, em decorrência do seu processamento, o glicosídeo cianogênico linamarina presente é clivado em glicose e acetonacianoidrina, devido à ação catalisadora da enzima β -glicosidase (linamarase). Numa segunda e última etapa da cianogênese (processo de geração de HCN), a acetonacianoidrina é convertida em HCN e acetona, e esta etapa pode ser mediada pela enzima hidroxinitriloliase numa faixa de pH de 3,5-6,0, ou ocorrer espontaneamente quando os valores de pH são maiores que 4,0. Dessa forma, a amostra de tucupi analisada no presente estudo apresentou valor dentro dessa faixa ácida, podendo contribuir para a cianogênese da linamarina.

Tabela 1. Sólidos solúveis, pH e acidez da manipueira até obtenção do tucupi

Etapas do processamento	pH	Acidez total titulável (meq NaOH/100 mL)	Sólidos Solúveis (° Brix)
MRE	6,3 ± 0,10 ^a	1,9 ± 0,01 ^a	7,2 ± 0,06 ^a
M24	6,2 ± 0,06 ^a	2,2 ± 0,06 ^a	6,5 ± 0,10 ^b
M48	4,0 ± 0,01 ^b	6,5 ± 0,10 ^b	6,3 ± 0,06 ^c
M72	3,6 ± 0,06 ^c	10,7 ± 0,20 ^c	6,3 ± 0,06 ^c
T	3,6 ± 0,10 ^c	12,3 ^a ± 0,01 ^d	8,1 ± 0,06 ^d

MRE = manipueira recém-extraída; M24 = manipueira após 24 horas de fermentação; M48 = manipueira após 48 horas de fermentação; M72 = manipueira após 72 horas de fermentação; T = tucupi. Média com letras iguais em uma mesma coluna não se diferem estatisticamente ($p < 0,05$)

Com relação ao teor de acidez total titulável, os valores apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) até a obtenção do tucupi, provavelmente devido à fermentação ocorrida pela presença do amido decantado na manipueira. Valores inferiores ao encontrado no presente estudo foram reportados por Chisté et al.³ para amostras de tucupi comercializadas na cidade de Belém, PA, (3,9 a 10,6 meq NaOH/100 mL). O aumento no teor de acidez total está relacionado com a diminuição nos valores de pH durante o processamento do tucupi devido à liberação de ácidos provenientes da fermentação. Da mesma forma, no processamento da farinha d'água, a fermentação do amido presente demonstra ser o responsável pelo aumento da acidez¹⁰. Vilpoux¹¹ relata que a acidez da farinha permite obter informações sobre o processo de fermentação pelo qual passou o produto, ou seja, quanto maior a acidez, maior a intensidade da fermentação ou tempo do processo de pubagem (molho ou maceração).

Quanto ao teor de sólidos solúveis, houve diminuição desde a MRE até 72 horas de fermentação. O teor de sólidos solúveis indica, dentre outros constituintes, os açúcares dissolvidos no meio, que também estão disponíveis para processos fermentativos, sendo esta a possível causa para a diminuição no teor durante o processo de fermentação da manipueira. No tucupi, o valor aumentou para 8,1 °Brix em função da concentração do meio, devido à evaporação de líquido durante o processo de cocção do molho fermentado.

A Figura 2 mostra o resultado das concentrações de cianeto total e livre durante as etapas de processamento do tucupi. A variação dos teores de cianeto está relacionada

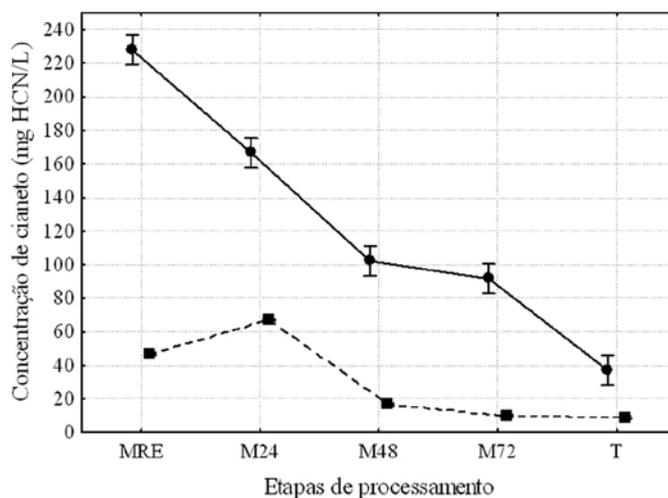


Figura 2. Teores de cianeto total (•) e cianeto livre (■) nas etapas de processamento da manipueira para obtenção do tucupi

com a matéria-prima e/ou com o processo de obtenção do tucupi, tendo em vista que mandiocas com alto teor de ácido cianídrico na raiz poderão apresentar valor elevado na elaboração do tucupi, caso a destoxificação não seja eficaz durante as etapas de processamento.

O teor de cianeto total, conforme esperado, apresentou comportamento decrescente em seus teores em função do processo natural de hidrólise realizado pela enzima linamarase em contato com o substrato linamarina, diminuindo, assim, a concentração de cianeto total (ligado ou potencial). Na MRE o teor de cianeto total foi de $227,8 \pm 10,9$ mg HCN/L, diminuindo para $166,6 \pm 9,3$ mg HCN/L na M24, $102,1 \pm 1,9$ mg HCN/L na M48, $91,6 \pm 5,2$ mg HCN/L na M72 e $37,1 \pm 1,7$ mg HCN/L no tucupi (T). Apenas no período de 48 e 72 horas de fermentação, os teores de cianeto total não apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$).

A concentração inicial do cianeto livre (forma diretamente tóxica ao ser humano) foi de $46,6 \pm 0,9$ mg HCN/L na MRE, e após 24 horas de fermentação esse valor subiu para $67,1 \pm 0,7$ mg HCN/L. Esse aumento pode ser explicado devido à hidrólise do cianeto total para a forma livre do cianeto, evidenciado pela diminuição nos valores de cianeto total. É possível afirmar que durante as primeiras 24 horas de fermentação da manipueira, o teor de cianeto livre aumentou até que fosse liberado o máximo dessa forma de cianeto. Nas etapas seguintes foram observadas reduções nos teores de cianeto livre em decorrência do processo fermentativo. Após 48 horas de fermentação (M48) o teor de cianeto livre na manipueira diminuiu para $16,5 \pm 0,4$ mg HCN/L, passando por $9,9 \pm 0,1$ mg HCN/L em 72 horas de fermentação (M72). Ao término da fermentação da manipueira, com a realização da cocção por 10 minutos para o preparo do tucupi, houve continuidade na redução do teor de cianeto livre apresentando valor de $8,9 \pm 0,1$ mg HCN/L, devido à volatilização causada pela exposição às elevadas temperaturas.

O processo fermentativo anterior ao processo de cocção (fervura) permite a ação mais prolongada da linamarase, enzima que hidrolisa a linamarina (responsável pela liberação de HCN), que é aos poucos inibida, pela acidificação e queda do pH em decorrência da fermentação. Durante a cocção ocorre desativação imediata da linamarase¹². Segundo Hosel e Barz¹³, cerca de 70% da linamarina presente na raiz da mandioca são removidos por hidrólise enzimática durante o processamento. Em complementação, quase todo o

cianeto que é gerado é removido por volatilização ou solubilização¹⁴.

Segundo Cereda⁹, casos significativos de envenenamento por cianeto são restritos às regiões onde a dieta alimentar é composta quase exclusivamente de mandioca e, além disso, estão ligados à desnutrição. Os casos comprovados de intoxicação são pouco frequentes. Em geral, caracterizam crianças com casos graves de desnutrição.

Após estudos da determinação do potencial de intoxicação em ratos, de linamarina extraída de mandioca, feita por Cereda e Lopes¹⁵, os autores chegaram à conclusão de que a DL_{50} (dose letal para 50% de ocorrência) oral de linamarina extraída foi $324,86 \pm 1,5$ mg/kg/peso, correspondendo a $35,35$ mg de HCN/kg peso. A DL_{50} aceita pela OMS é de 10 mg/kg de peso, menor que a estabelecida até agora. A única forma tóxica é a de cianeto livre (CN⁻), ou de seu ácido (HCN)⁹. No presente estudo o teor de cianeto livre encontrado no tucupi foi de $8,9$ mg HCN/L, portanto, com base nesses dados, um indivíduo adulto de 70 kg deveria ingerir na alimentação aproximadamente 78 litros de tucupi para que a DL_{50} seja alcançada, considerando o limite aceito atualmente pela OMS. Abaixo da dose letal existe um mecanismo de destoxificação, na qual o cianeto é transformado em tiocianato, em presença de enzima rodanase, e cisteína, um aminoácido doador de equivalentes redutores, na forma de hidrogênio presente no grupamento lateral tiólico¹⁶. O tiocianato formado não é mais tóxico e é eliminado pela urina^{2,9}.

CONCLUSÃO

O tucupi, obtido pela fermentação e cozimento da manipueira de forma padronizada, pode ser caracterizado como um alimento de baixo pH, elevada acidez e seguro para o consumo humano, em função de o referido processamento reduzir os teores de cianeto originais da manipueira a níveis atóxicos ao homem.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro e à Embrapa Amazônia Oriental pela doação da matéria-prima e pela realização das análises no Laboratório de Agroindústria.

REFERÊNCIAS

1. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Culturas temporárias e permanentes. Produção Agrícola Municipal. Brasil; 2009; 36:1-90.
2. Cagnon JR, Cereda MP, Pantarotto S. Glicosídeos cianogênicos da cassava: biossíntese, distribuição, destoxificação e métodos de dosagem. *In: Cereda MP, coordenador. Tuberosas amiláceas latino-americanas*. São Paulo: Fundação Cargill; 2002. p.83-99.
3. Chisté RC, Cohen KO, Oliveira SS. Estudo das propriedades físico-químicas do tucupi. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2007; 27(3):787-92.
4. Cereda MP. Caracterização dos subprodutos da industrialização da mandioca. *In: Cereda MP, coordenador. Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca*. São Paulo: Fundação Cargill; 2002. p.13-37.
5. AOAC. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists: edited Ig W. Horwitz 16th ed. Washington (DC): 1997; 2, p. 850.
6. Cooke RD. An enzymatic assay for the total cyanide content of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *J Sci Food Agric*. 1978; 29:345-52.
7. Essers AJA, Bosveld M, Van der Grift RM, Voragen AGJ. Studies on the quantification of specific cyanogens in cassava products and introduction of a new chromogen. *J Sci Food Agric*. 1993; 63:287-96.
8. STATSOFT. Statistica (data analysis software system), version 6; 2001.
9. Cereda MP. Processamento da mandioca como mecanismo de detoxificação. *In: Cereda MP, coordenador. Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas Latino Americanas*. São Paulo: Fundação Cargill; 2002.p.47-80.
10. Chisté RC, Cohen KO, Mathias EA, Ramoa Junior AGA. Estudo das propriedades físico-químicas e microbiológicas no processamento da farinha de mandioca do grupo d'água. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2007; 27(2):265-9.
11. Vilpoux OF. Produção de farinha d'água no Estado do Maranhão. *In: Cereda MP, Vilpoux OF. Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas*. São Paulo: Fundação Cargill; 2003.p.621-42.
12. Cereda MP, Vilpoux O. Produtos regionais a base de mandioca ou derivados. *In: Cereda MP, coordenador. Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas Latino Americanas*. São Paulo: Fundação Cargill; 2003.p.693-711.
13. Hosel W, Barz W. β -glucosidases from *Cicer arietum* L. *Eur J Biochem*. 1975; 57(2):607-16.
14. Ikediobi C, Onyia G, Eluwah C. A rapid inexpensive enzymatic assay for total cyanide in cassava products. *Agric Biol Chem*. 1980; 44(12):2803-9.
15. Cereda MP, Lopes AM. Determinação do potencial de intoxicação em ratos, de linamarina extraída de mandioca. V Simpósio Latino-Americano de Ciência de Alimentos; novembro de 2003; Campinas, São Paulo.
16. Chalker JM, Bernardes GJL, Lin YA, Davis BG. Chemical modification of proteins at cysteine: oppportunities in chemistry and biology. *Chem Asian J*. 2009; 4:630-40.

Aplicação de ácido fítico em produto cárneo tipo hambúrguer

Phytic acid addition into hamburger-type meat product

RIALA6/1343

Fabrizio Barros BRUM¹, Fernanda Teixeira MACAGNAN¹, Magda Aita MONEGO¹, Tiago André KAMINSKI^{1*}, Leila Picolli da SILVA²

*Endereço para correspondência: ¹Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil, CEP: 97105-900, e-mail: tiagoandrekaminski@hotmail.com

²Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

Recebido: 12.11.2010 – Aceito para publicação: 31.03.2011

RESUMO

Neste trabalho foram avaliados os efeitos da adição de ácido fítico sobre a cor e os indicadores de vida de prateleira em produto cárneo do tipo hambúrguer. Os produtos preparados por três tratamentos com ácido fítico (0,08; 0,10; e 0,20%) e um padrão com adição de eritorbato de sódio (0,10%) foram armazenados a -20 °C por 90 dias com análises periódicas a cada 15 dias. O tratamento-padrão mostrou ser mais eficiente na manutenção de cor nos períodos iniciais, enquanto que o tratamento com 0,20% de ácido fítico apresentou menor variação na coloração e maior intensidade de cor no período final de armazenamento. Os valores de pH não variaram significativamente e mantiveram-se adequados ao produto. Os valores de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico apresentaram comportamento inicial anômalo, com estabilização após 30 dias na presença das diferentes concentrações de ácido fítico, e manutenção de valores significativamente inferiores ao produto-padrão. O presente estudo mostra o potencial efeito do ácido fítico em produto cárneo tipo hambúrguer.

Palavras-chave. eritorbato de sódio, ácido fítico, antioxidante, hambúrguer, vida de prateleira.

ABSTRACT

This study evaluated the effects of addition of phytic acid on the color and the shelf life indicators in hamburger-type meat product. Products prepared from three phytic acid treatments (0.08, 0.10 and 0.20%) and one standard with addition of sodium erythorbate (0.10%) were stored at -20 °C for 90 days, and the samples were periodically analyzed every 15 days. The standard treatment was mostly effective in maintaining color during the initial stages, while the treatment with 0.20% of phytic acid showed lowest variation and highest intensity of color at the final period of storage. The pH values did not show significant difference and remained adequate for the product. The values of reactive substances to thiobarbituric acid showed an initial anomalous behavior, but they became stable after 30 days in the presence of different concentrations of phytic acid, and maintained significantly low values when compared with the standard product. These findings suggest a potential use of phytic acid addition into hamburger-type meat product.

Keywords. sodium erythorbate, phytic acid, antioxidant, hamburger, shelf life.

INTRODUÇÃO

O ácido fítico é um composto naturalmente presente em todos os organismos eucarióticos, com maior ocorrência em vegetais, em que representa a principal forma de armazenamento de fósforo e desempenha diversas funções fisiológicas¹. A maior concentração de ácido fítico ocorre em grãos de cereais e leguminosas, bem como nos seus derivados, o que tem sido apontado historicamente como fator limitante ao uso dessas fontes vegetais na nutrição humana e animal, pois, além de ser uma forma de fósforo indisponível, o ácido fítico também forma quelatos com metais di e trivalentes (cálcio, magnésio, manganês, ferro e zinco) e compostos orgânicos reativos (proteínas, por exemplo), reduzindo a biodisponibilidade destes no trato gastrointestinal^{2,3,4}.

Entretanto, a clássica visão do ácido fítico como uma substância de características antinutricionais tem sido revista nos últimos anos, uma vez que propriedades benéficas são atribuídas a esse composto em modelos investigativos de câncer^{5,6,7}, terapias preventivas ao mal de Parkinson⁸, arteriosclerose⁹ e cálculos renais⁹.

As diversas propriedades preventivas e terapêuticas atribuídas ao ácido fítico são justificadas pelo seu potencial antioxidante. Dessa forma, o uso desse composto, também, como aditivo alimentar desperta interesse no intuito de prevenir as reações oxidativas nos alimentos. A ocorrência de processos oxidativos está entre as maiores causas de perdas econômicas e é causa primária da perda de qualidade de carnes e produtos cárneos, conduzindo à perda do valor nutricional, alterações no sabor, odor, cor, textura e formação de produtos tóxicos à saúde do consumidor. Esses aspectos são de grande importância, sobretudo ao se considerar produtos cárneos congelados, como o hambúrguer, que possuem sua vida útil determinada pela intensidade dessas alterações. Assim, o controle da oxidação lipídica nos produtos cárneos torna-se essencial e pode ser feito com a adição de antioxidantes sintéticos ou naturais^{10,11}.

As oxidações de lipídios e pigmentos estão relacionadas, uma vez que agentes pró-oxidantes liberados através da peroxidação lipídica são capazes de se ligar à oximioglobina, conduzindo à formação de metamioglobina¹³. Por seu mecanismo de ação, o ácido fítico é capaz de se ligar tanto a elementos metálicos, cofatores das reações oxidativas, quanto ao próprio ferro do grupamento hemínico nos pigmentos da carne, caracterizando, assim, características antioxidantes e de fixação de cor^{14,15,16,17}. Por este motivo, o ácido fítico é utilizado em países como

Estados Unidos, Canadá e Japão, usualmente adicionado em produtos cárneos, pastas de peixe, frutos do mar, frutas, vegetais, queijos, massas, missô, molhos de soja, sucos, produtos de panificação e bebidas alcoólicas, no intuito de incrementar nutricionalmente, prevenir a perda de cor e prolongar a vida de prateleira desses produtos^{10,18,19}.

Neste contexto, o presente trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar os efeitos sobre a cor e indicadores da vida de prateleira em produto cárneo tipo hambúrguer com substituição do antioxidante eritorbato de sódio pelo ácido fítico.

MATERIAL E MÉTODOS

Matérias-primas e elaboração dos produtos

As matérias-primas utilizadas na obtenção da massa-base das formulações consistiram em 80% de carne bovina magra, 10% de toucinho e 10% de proteína texturizada de soja hidratada na proporção de 1:3. Nas matérias-primas foram adicionados ingredientes como gelo, sal, pimenta branca e preta moídas, alho em pó, cebola em pó, glutamato monossódico e antioxidante teste (eritorbato de sódio 98%, marca Doremus, ou ácido fítico 95%, extraído de farelo de arroz e fornecido pela empresa Ingal Alimentos de Santa Maria-RS).

Os produtos foram elaborados conforme metodologia proposta por Terra²⁰ e observando-se as determinações de identidade e qualidade descritas na legislação brasileira²¹, sendo a carne e o toucinho moídos em disco de 8 mm e levados à máquina misturadeira com adição de proteína texturizada de soja, gelo e demais ingredientes. Após mistura, a massa foi dividida em 4 porções para adição dos antioxidantes, originando os seguintes tratamentos:

- hambúrguer de massa-base com adição de 0,10% de eritorbato de sódio (padrão);
- hambúrguer de massa-base com adição de 0,08% de ácido fítico;
- hambúrguer de massa-base com adição de 0,10% de ácido fítico;
- hambúrguer de massa-base com adição de 0,20% de ácido fítico.

A legislação brasileira regulamenta o uso do eritorbato de sódio na quantidade suficiente para que exerça o efeito desejável (*quantum satis*), enquanto que o ácido fítico não possui limite estabelecido para produtos cárneos²².

Após a completa homogeneização das massas, os hambúrgueres foram moldados com auxílio de forma plástica com 10 cm de diâmetro e 2 cm de profundidade, sendo obtidos produtos com peso médio de 110 g, posteriormente embalados em filme de polietileno e levados ao congelamento em temperatura de -20 °C. A operação foi repetida a fim de obter 3 lotes para cada tratamento, os quais constituíram as respectivas repetições. Os produtos foram mantidos armazenados a -20 °C por 90 dias, com coleta de amostras a cada 15 dias para avaliações de cor, pH e TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico).

Análises de cor

Em colorímetro Konica Minolta CR-300 e de acordo com o método 14-22 da AACCC²³ foi avaliado o atributo de cor a^* , cuja coordenada de cromaticidade indica a tendência de cor da região do vermelho ($+a^*$) ao verde ($-a^*$). O colorímetro foi calibrado em placa-padrão branca (nº 15233011) e as medições tomadas em diferentes locais nas superfícies das amostras.

Indicadores da vida de prateleira

Foram realizadas leituras de pH conforme técnica descrita por Terra e Brum²⁴ e análises do grau da oxidação lipídica observando a metodologia proposta por Bragagnolo et al.²⁵ com determinação de TBARS e os resultados expressos sob a forma de mg de malonaldeído por kg de amostra (mg MA/kg).

Ensaio com homogeneizados

A partir de um modelo proposto por Lee et al.¹⁵, com algumas modificações, foi avaliado o efeito do ácido fítico sobre a estabilidade de cor em homogeneizados de carne bovina. A carne foi preparada em microprocessador até a obtenção de uma massa fina da qual foram separadas amostras de aproximadamente 90 g e homogeneizadas com 10 mL das soluções teste. Os homogeneizados, elaborados em três repetições, incluíram um controle com água destilada e três soluções de ácido fítico nas concentrações de 0,023 mM, 0,230 mM e 1,150 mM. As amostras foram acondicionadas em placas de petri, cobertas com filme de polietileno e mantidas sob refrigeração de 4 °C por 9 dias, com avaliações periódicas de cor a cada 3 dias.

Delineamento experimental e análise estatística

Através do programa SAS (*Statistical Analysis System*, versão 6.11) e delineamento experimental inteiramente casualizado, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Duncan ao nível de 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O eritorbato de sódio é um isômero sintético do ácido ascórbico, produzido comercialmente para uso como aditivo em alimentos na função antioxidante^{26,27}. Conforme resultados expostos na Tabela 1, os hambúrgueres não apresentaram comportamento

Tabela 1. Efeito dos tratamentos e tempo de armazenamento a -20 °C sobre o atributo de cor a^* em hambúrgueres

Dia	ES 0,10%*	AF 0,08%*	AF 0,10%*	AF 0,20%*
0	9,39 ± 0,14 ^{cNS}	8,69 ± 0,87 ^{bcNS}	9,77 ± 0,63 ^{bcNS}	9,80 ± 1,18 ^{abNS}
15	11,52 ± 0,14 ^{aA}	9,34 ± 0,45 ^{abB}	9,62 ± 0,48 ^{bcB}	8,99 ± 0,56 ^{bB}
30	10,80 ± 0,14 ^{aA}	10,41 ± 0,23 ^{aA}	10,81 ± 0,75 ^{abB}	10,06 ± 0,20 ^{abB}
45	11,97 ± 0,39 ^{aA}	10,57 ± 0,61 ^{abC}	11,18 ± 0,30 ^{aAB}	9,86 ± 0,37 ^{abC}
60	10,81 ± 0,48 ^{bNS}	10,55 ± 1,13 ^{aNS}	11,69 ± 0,88 ^{aNS}	10,91 ± 0,63 ^{aNS}
75	9,63 ± 0,29 ^{cNS}	9,69 ± 0,08 ^{abNS}	9,14 ± 0,29 ^{dNS}	9,38 ± 0,40 ^{bNS}
90	8,27 ± 0,58 ^{dAB}	7,74 ± 0,30 ^{cb}	8,29 ± 0,32 ^{dAB}	9,02 ± 0,14 ^{bA}

* ES 0,10% (hambúrguer-padrão, com adição de 0,10% de eritorbato de sódio); AF 0,08% (hambúrguer com adição de 0,08% de ácido fítico); AF 0,10% (hambúrguer com adição de 0,10% de ácido fítico) e AF 0,20% (hambúrguer com adição de 0,20% de ácido fítico)

** Resultados expressos como média ± desvio-padrão seguidos por letras que indicam diferença estatística significativa (letras distintas) ou não significativa (ns) por Duncan ($p < 0,05$). Letras minúsculas correspondem às diferenças estatísticas nas colunas e as maiúsculas às diferenças estatísticas nas linhas

linear na redução da intensidade de cor vermelha, mas essa tendência foi observada no decorrer dos 90 dias de armazenamento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ com poucas variações significativas entre os tratamentos. Nos dias 15, 30 e 45 o padrão apresentou intensidade de cor significativamente superior aos demais, enquanto que nos dias 60 e 75 não houve diferença significativa entre os tratamentos. A amostra com 0,20% de ácido fítico mostrou-se mais estável ao longo do tempo, contabilizando apenas três variações significativas e maior intensidade de cor no final do período de armazenamento, embora sem diferir significativamente do padrão. Esses resultados sugerem maior eficiência do eritorbato de sódio até a metade do período analisado, seguindo-se de equivalência entre os tratamentos e aparente maior eficiência do tratamento com maior concentração de ácido fítico no final do período de armazenamento. A partir dos dados, pode-se inferir que, em um período de armazenamento mais extenso, os produtos com maior proporção de ácido fítico apresentariam maior predominância da cor vermelha.

Um importante indicador da vida de prateleira é o valor de pH, em que valores entre 5,80 e 6,20 são garantia de sanidade para o consumo de carnes e derivados²⁴. A Figura 1 mostra que não houve variação significativa nos valores de pH entre os tratamentos e durante o período de armazenamento. A variação máxima observada entre todas as leituras de pH foi de 0,04; com valor mínimo de 5,88 em três leituras do tratamento-padrão com eritorbato de sódio e valor máximo de 5,92 no final do período de armazenamento para o tratamento com 0,20% de ácido fítico.

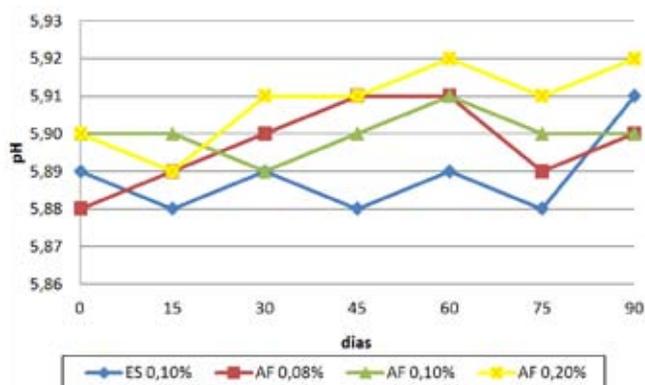


Figura 1. pH das formulações de hambúrgueres em função do tempo de armazenamento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (ES = eritorbato de sódio; AF = ácido fítico)

Conforme as curvas da Figura 2, todos os tratamentos apresentaram aumento significativo dos níveis de TBARS no período inicial, mas com posterior estabilização após 30 dias de armazenamento. Tais resultados podem ser interpretados como anômalos em se tratando de alimentos congelados, uma vez que as reações oxidativas ocorrem muito lentamente durante armazenamento em temperaturas inferiores a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ²⁸. Em trabalho com metodologia semelhante, Daniel²⁹ não constatou variação significativa nos valores de TBARS em hambúrgueres mantidos congelados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 3 meses, e Souza³⁰ também não observou variação de TBARS em cortes de frango armazenados a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 7 meses. Independentemente do comportamento inicial das amostras, os resultados demonstraram que os produtos com adição de ácido fítico apresentaram valores de TBARS significativamente inferiores ao padrão durante todo o período, evidenciando maior proteção oxidativa. A proporção de ácido fítico adicionada nos produtos não exerceu influência significativa nos valores de TBARS e, dessa forma, não foi constatado o efeito dose-dependente relatado por Lee et al.¹⁵ e Stodolak et al.¹⁷ em 90 dias de armazenamento.

Os resultados descritos na Tabela 2 representam a influência significativa do ácido fítico na manutenção da cor em homogeneizados de carne bovina, mesmo com tendência geral de perda de cor no decorrer do período de armazenamento a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Apesar desse declínio, as médias dos homogeneizados em soluções de ácido fítico, com exceção da solução 0,230 mM no sexto dia, foram sempre significativamente maiores que as do controle. Ao mesmo tempo, as diferenças estatísticas observadas entre

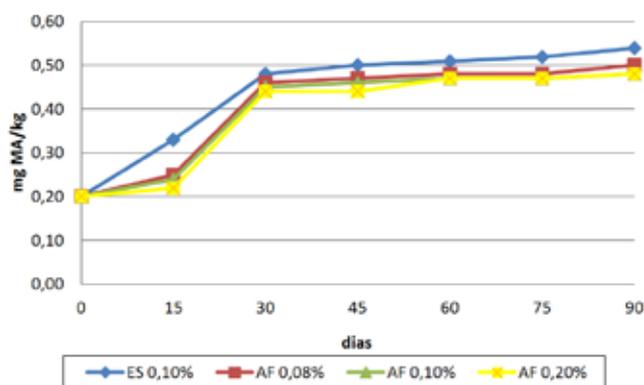


Figura 2. TBARS das formulações de hambúrgueres em função do tempo de armazenamento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (ES = eritorbato de sódio; AF = ácido fítico)

Tabela 2. Efeito das diferentes concentrações de ácido fítico e tempo de armazenamento a 4 °C sobre o atributo de cor a* em homogeneizados de carne bovina

Homogeneizados*	Tempo de armazenamento (dias) **			
	0	3	6	9
Água destilada	26,36 ± 0,58 ^{nsA}	19,28 ± 0,20 ^{bb}	11,86 ± 0,38 ^{cc}	10,83 ± 0,14 ^{bC}
AF 0,023 mM	27,20 ± 0,30 ^{nsA}	22,16 ± 0,49 ^{ab}	16,02 ± 0,40 ^{ac}	14,04 ± 1,40 ^{ad}
AF 0,230 mM	26,81 ± 0,32 ^{nsA}	21,56 ± 0,41 ^{ab}	13,35 ± 1,60 ^{bcD}	15,14 ± 0,41 ^{ac}
AF 1,150 mM	26,52 ± 0,14 ^{nsA}	21,49 ± 0,11 ^{ab}	14,47 ± 0,12 ^{abC}	14,73 ± 0,29 ^{ac}

* Água destilada (homogeneizado controle); AF 0,023 (homogeneizado com solução de ácido fítico 0,023 mM); AF 0,230 (homogeneizado com solução de ácido fítico 0,230 mM); e AF 1,150 (homogeneizado com solução de ácido fítico 1,150 mM)

** Resultados expressos como média ± desvio-padrão seguidos por letras que indicam diferença estatística significativa (letras distintas) ou não significativa (ns) por Duncan (p<0,05). Letras minúsculas correspondem às diferenças estatísticas nas colunas e as maiúsculas às diferenças estatísticas nas linhas

as soluções de ácido fítico testadas, quando ocorreram, não se mantiveram, demonstrando que a solução de ácido fítico 0,023 mM apresenta a mesma eficiência que soluções 10 e 50 vezes mais concentradas na manutenção da cor em homogeneizados mantidos a 5 °C por 9 dias. Lee et al.¹⁵ também relataram a eficiência do ácido fítico sobre a estabilidade oxidativa em homogeneizados de carne bovina.

Os resultados obtidos na manutenção de cor, pH e TBARS em hambúrgueres e homogeneizados com ácido fítico, quando associados ao mecanismo de ação deste composto, podem ser interpretados como indicativos de potencial antioxidante. Íons de metais de transição, tais como Fe²⁺ e Cu²⁺, são importantes catalisadores do processo de peroxidação lipídica em produtos cárneos, sendo que a participação do ferro heme é menos significativa que a do ferro não heme. Assim, as propriedades antioxidantes do ácido fítico são decorrentes de sua habilidade em ocupar os sítios de coordenação livres do ferro, prevenindo o desencadeamento de reações que levam à transformação da oximioglobina à metamioglobina e formando quelatos totalmente inertes, como o complexo Fe³⁺ - fitato^{13,14,16,31,32}.

CONCLUSÃO

A cor equivalente ao antioxidante-padrão nos hambúrgueres e superior ao controle em homogeneizados de carne, pH em valores regularmente estabelecidos e maior proteção oxidativa, permite concluir que os resultados apresentados sugerem a potencial aplicação do ácido fítico em produto cárneo tipo hambúrguer.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Rio Grandense do Arroz (IRGA) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Verbsky JW, Wilson MV, Kisseleva MV, Marjerus PW, Wentz SR. The Synthesis of Inositol Hexakisphosphate. *J Biol Chem*. 2002;277(35):31857-62.
2. Cúneo F, Amaya-Farfan J, Carraro F. Distribuição dos fitatos em farelo de arroz estabilizado com fitase exógena. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2000;20(1):94-8.
3. Febles CI, Arias A, Hardisson A, Rodríguez-Álvarez C, Sierra A. Phytic acid level in infant flours. *Food Chem*. 2001;74(4):437-41.
4. Wyatt CJ, Triana-Tejas A. Soluble and insoluble Fe, Zn, Ca and phytates in foods commonly consumed in Northern México. *J Agr Food Chem*. 1994;42(10):2204-9.
5. Somasundar P, Riggs DR, Jackson BJ, Cunningham C, Vona-Davis L, McFadden DW. Inositol hexaphosphate (IP6): a novel treatment for pancreatic cancer. *J Surg Res*. 2005;126(2):199-203.
6. Rizvi I, Riggs DR, Jackson BJ, Ng A, Cunningham C, McFadden DW. Inositol hexaphosphate (IP6) inhibits cellular proliferation in melanoma. *J Surg Res*. 2006;133(1):3-6.
7. Verghese M, Rao DR, Chawan CB, Walker LT, Shackelford L. Anticarcinogenic effect of phytic acid (IP6): apoptosis as a possible mechanism of actions. *Food Sci Technol-Leb*. 2006;39(10):1093-8.
8. Xu Q, Kanthasamy AG, Reddy MB. Neuroprotective effect of the natural iron chelator, phytic acid in a cell culture model of Parkinson's disease. *Toxicol*. 2008;245(1/2):101-8.
9. Grases F, Perelló J, Prietto RM, Simonet BM, Torres JJ. Dietary myo-inositol hexaphosphate prevents dystrophic calcifications in soft tissues: a pilot study in wistar rats. *Life Sci*. 2004;75(1):11-9.

10. Soares AL. Ação de ácido fítico e vitamina E na oxidação lipídica e aroma de requentado em filés de peito de frango [dissertação de mestrado]. Londrina (PR): Universidade Estadual de Londrina; 1999.
11. Chelch I, Gatellier P, Santé-Lhoutellier V. Characterization of fluorescent Schiff bases formed during oxidation of pig myofibrils. *Meat Sci*. 2007;76(2):210-5.
12. Georgantelis D, Blekas G, Katikou P, Ambrosiadis I, Fletouris DJ. Effect of rosemary extract, chitosan and α -tocopherol on lipid oxidation and colour stability during frozen storage of beef burgers. *Meat Sci*. 2007;75(2):256-64.
13. Fernández-López J, Sevilla L, Sayas-Barberá E, Navarro C, Marín F, Pérez-Alvarez JA. Evaluation of the antioxidant potential of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) extracts in cooked pork meat. *J Food Sci*. 2003;68(2):660-4.
14. Graf E, Empson KL, Eaton JW. Phytic acid. A natural antioxidant. *J Biol Chem*. 1987;262(24):11647-50.
15. Lee BJ, Hendricks DG, Cornforth DP. Antioxidant effects of carnosine and phytic acid in model beef system. *J Food Sci*. 1998;63(3):394-8.
16. Ramalho VC, Jorge N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Quím Nova*. 2006;29(4):755-60.
17. Stodolak B, Starzynska A, Czyszczonek M, Zyla K. The effect of phytic acid on oxidative stability of raw and cooked meat. *Food Chem*. 2007;101(3):1041-5.
18. Reddy NR, Pierson MD, Sathe SK, Salunkhe DK. Phytates in Cereals and Legumes. Boca Raton: CRC Press; 1989.
19. St Angelo AJ. Lipidic oxidation in foods. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 1996;36(3):175-224.
20. Terra NN. Apontamentos de tecnologia de carnes. São Leopoldo: Unisinos; 1998.
21. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 20, de 31 de julho de 2000. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Almôndega, de Apresuntado, de Fiambre, de Hambúrguer, de Kibe, de Presunto Cozido e de Presunto. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 3 ago. 2000. Seção 1, nº149. p.7-12.
22. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 1002/1004, de 11 de dezembro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico sobre Atribuição de Função de Aditivos, Aditivos e seus Limites Máximos de Uso para a Categoria 8 – Carnes e Produtos Cárneos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 14 dez. 1998. Seção 1, nº239-E. p.28-34.
23. AACC. American Association of Cereal Chemists; Approved Methods. 10th ed. Saint Paul, 2000.
24. Terra NN, Brum MAR. Carne e seus derivados. Técnicas de controle de qualidade. São Paulo: Nobel; 1988.
25. Bragagnolo N, Danielsen B, Skibsted LH. Effect of rosemary on lipid oxidation. *Eur Food Res Technol*. 2005;221(5):610-5.
26. Ghiretti GP, Zanardi E, Novelli E, Camparini G, Dazzi G, Madarena G, Chizzolini R. Comparative evaluation of some antioxidants in salame milano and mortadella production. *Meat Sci*. 1997;47(1/2):167-76.
27. Man JM. Principles of food chemistry. 3rd ed. Gaithersburg: Aspen; 1999.
28. Fellows PJ. Food processing technology. Principles and practice. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press; 2000.
29. Daniel AP. Emprego de fibras e amido de aveia (*Avena sativa* L.) modificado em produtos cárneos [dissertação de mestrado]. Santa Maria (RS): Universidade Federal de Santa Maria; 2006.
30. Souza MAA. Casca da batata inglesa (*Solanum tuberosum*) na proteção antioxidante da carne de frango [dissertação de mestrado]. Santa Maria (RS): Universidade Federal de Santa Maria; 2006.
31. Lee JB, Hendricks DG. Phytic acid protective effect against beef round muscle lipid peroxidation. *J Food Sci*. 1995;60(2):241-4.
32. Quirrenbach HR, Kanumfre F, Rosso ND, Carvalho Filho MA. Comportamento do ácido fítico na presença de Fe (II) e Fe (III). *Ciênc Tecnol Aliment*. 2009;29(1):24-32.

Ensaio de atividade antimicrobiana *in vitro* e mutagênica *in vivo* com extrato de *Vernonia polyanthes* Less (Assa-peixe)

Analysis on the *in vitro* antimicrobial activity and *in vivo* mutagenicity by using extract from *Vernonia polyanthes* Less (Assa-peixe)

RIALA6/1344

Giovanna Vallim JORGETTO¹, Marcelo Fabiano Gomes BORIOLO², Lucimara Maria SILVA², Denismar Alves NOGUEIRA³, Thiago Donizete da Silva JOSÉ³, Grazielle Esteves RIBEIRO³, Nelma de Mello Silva OLIVEIRA³, João Evangelista FIORINI³

*Endereço para Correspondência: Laboratório de Biologia e Fisiologia de Microrganismos, Universidade José do Rosário Vellano, UNIFENAS, Rodovia MG 179, Km 0, Alfenas, MG, Brasil, CEP: 37130-000, tel: 35 3299-3201, e-mail: microrganismo@unifenas.br

¹Universidade José do Rosário Vellano, UNIFENAS, Poços de Caldas, MG, Brasil.

²Laboratório de Genética, Universidade José do Rosário Vellano, UNIFENAS, Alfenas, MG, Brasil.

³Laboratório de Biologia e Fisiologia de Microrganismos, Universidade José do Rosário Vellano, UNIFENAS, Alfenas, MG, Brasil.

Recebido: 23.02.2010 – Aceito para publicação: 31.03.2011

RESUMO

Neste estudo foram analisados os efeitos do extrato hidroalcoólico de *Vernonia polyanthes* Less (Assa-peixe) sobre crescimento e diferenciação celular do protozoário *Herpetomonas samuelpessoai*, a susceptibilidade antimicrobiana *in vitro*, a dose letal média (DL₅₀) e a mutagenicidade *in vivo* (teste do micronúcleo). A inibição do crescimento de *H. samuelpessoai* foi evidenciada, quando exposto às concentrações crescentes do extrato, embora sem aparecimento de forma diferenciada de opistomastigota, em percentual relevante. As linhagens-padrão de *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Salmonella* Typhimurium mostraram halos de inibição quando expostas ao extrato de *V. polyanthes* Less. Contudo, os efeitos bacteriostáticos foram observados em *Bacillus cereus* (180,1 mg/mL), *Escherichia coli* (72,04 mg/mL) e *Proteus mirabilis* (144,08 mg/mL). A avaliação mutagênica do extrato de *V. polyanthes* Less revelou ausência e moderado efeito clastogênico e/ou aneugênico, respectivamente, nas dosagens de 1000 e > 1500 mg/Kg, independentemente do tempo de tratamento (24/48 h) e do sexo do animal. Tais resultados foram sugestivos de ocorrência de toxicidade sistêmica, em virtude de aumento de eritrócitos normocromáticos na medula óssea dos camundongos, que também ocorreram independentemente da dose, gênero e tempo de tratamento. Contudo, a ausência de DL₅₀ foi observada em todas as concentrações testadas (250-2000 mg/Kg).

Palavras-chave. susceptibilidade antimicrobiana, mutagenicidade, *Vernonia polyanthes* Less, diferenciação celular, fitoterápicos.

ABSTRACT

The effects of the hydroalcoholic extract from *Vernonia polyanthes* Less (Assa-peixe) were analyzed on the cellular growth and differentiation of the protozoan *Herpetomonas samuelpessoai*, the *in vitro* antimicrobial susceptibility, the LD₅₀, and the *in vivo* mutagenicity (micronucleus test). The growth inhibition of *H. samuelpessoai* was found when it was exposed to increasing concentrations of the extract, but without the percentually relevant emergence of the opisthomastigote forms. The pattern-strains *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* and *Salmonella* Typhimurium showed inhibitory halo to *V. polyanthes* extract. However, the bacteriostatic effect was observed on *Bacillus cereus* (180.1 mg/mL), *Escherichia coli* (72.04 mg/mL) and *Proteus mirabilis* (144.08 mg/mL). The mutagenic evaluation of hydroalcoholic extract from *V. polyanthes* revealed a lack or moderate clastogenic effects and/or aneugenic at the concentrations of 1000 and > 1500 mg/Kg, respectively, independently of the treatment time (24/48h) and the animal gender. These results were suggestive of an occurrence of systemic toxicity due to the increase of normochromatic erythrocytes in mice bone marrow, independently at the treatment time, extract dose and animal gender. However, absence of DL₅₀ was observed in the all of tested concentrations (250-2000 mg/Kg).

Keywords. antimicrobial susceptibility, mutagenicity, *Vernonia polyanthes* Less, cell differentiation, phytotherapics.

INTRODUÇÃO

Vernonia polyanthes Less (*Asteraceae*), conhecida popularmente como “assa-peixe”, é uma planta típica da Mata Atlântica e é empregada na medicina popular para o tratamento de pneumonia, bronquite, cálculo renal¹, malária e febre². Levantamento etnofarmacológico apontou também o uso dessa espécie no tratamento de afecções gástricas³.

Estudo demonstrou que o extrato bruto de *V. polyanthes* apresenta os seguintes compostos: fenóis, taninos, chalconas, auronas, flavonoides, saponinas, ácidos fixos fortes, esteroides livres e quinonas sintetizados pelas plantas durante o chamado metabolismo secundário, apresentando diversas propriedades biológicas⁴.

Ensaios de diferenciação celular em tripanosomatídeos constituem parte do processo que leva a célula a se transformar, de modo reversível ou irreversível, envolvendo comandos em nível gênico. Essa transformação ou diferenciação celular tem sido amplamente avaliada com modelos eucarióticos unicelulares, utilizando-se extratos vegetais ou drogas sintéticas, objetivando contribuir com a elucidação desse complexo processo^{5,6}. Outros ensaios, com relação à ação dos extratos vegetais, são também utilizados para testes de atividade antimicrobiana. O uso indiscriminado de antibióticos tem gerado um grande número de micro-organismos resistentes; sendo assim, logo surgirá a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos. A fitoterapia tem sido extensamente estudada no desenvolvimento de medicamentos alternativos utilizados pela população através do conhecimento popular⁷.

O Brasil registra a maior biodiversidade vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas; no entanto, apesar do aumento de estudos fitoquímicos, os dados disponíveis revelaram que apenas 15 a 17% das plantas foram analisadas quanto ao seu potencial medicinal⁸.

Sendo a *V. polyanthes* utilizada em larga escala na medicina caseira, torna-se de fácil acesso à população por ser amplamente distribuída em quase todo o território brasileiro.

Dessa forma, o presente estudo teve por objetivos analisar os efeitos do extrato hidroalcoólico de *V. polyanthes* em um sistema eucariótico, utilizando o tripanossomatídeo *H. samuelpeessoai* como modelo, para avaliar alterações que possam ocorrer na diferenciação e crescimento desse flagelado; analisar o extrato sobre diversos tipos de bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e fungos quanto ao efeito antimicrobiano; determinar sua Dose Letal Média 50 (DL₅₀), além de testar

os efeitos clastogênicos e aneugênicos *in vivo*, utilizando o Teste do Micronúcleo em eritrócitos policromáticos da medula óssea de camundongos *Swiss albinus*⁹.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta da amostra:

Folhas de *V. polyanthes* foram coletadas no Campus da Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS (Alfenas/MG) e identificadas pelo Prof. Dr. Marcelo Pólo (Laboratório de Botânica, Universidade Federal de Alfenas/MG), sendo a exsicata depositada no herbário da Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS, Minas Gerais, Brasil, sob a sigla Vp n° 203.

Obtenção do extrato bruto:

Após secagem, à temperatura ambiente, as folhas de *V. polyanthes* foram pesadas (1,0 Kg) e maceradas com etanol-água (70/30 v/v) à temperatura ambiente por 15 dias. O extrato hidroalcoólico foi filtrado e evaporado até *secura*, rendendo 0,7204 g de extrato cru¹⁰.

Obtenção do inóculo:

Para a realização de todos os experimentos o inóculo foi obtido a partir de culturas em fase logarítmica e comparável com o tubo 0,5 da Escala de Mac Farland, aproximadamente 1,5x10⁸ células/mL para bactérias e 1x10⁶ células/mL para leveduras¹⁰.

Micro-organismos utilizados:

Foram utilizadas as seguintes amostras microbianas: *Herpetomonas samuelpeessoai* (ATCC 30252), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Cryptococcus neoformans* (ICC 107 – sorotipo B), *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Micrococcus luteus* (ATCC 9341), *Proteus mirabilis* (ATCC 25933), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25619), *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 2601), *Salmonella Typhimurium* (ATCC 14028), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615).

Experimentos de crescimento/diferenciação celular:

A diferenciação celular foi realizada em meio de cultivo quimicamente definido descrito por Roitman e colaboradores¹¹. Cerca de 10⁶ células foram incubadas juntamente com doses crescentes do extrato

hidroalcoólico de *V. polyanthes*, a 28 °C por 48 horas. Os percentuais de formas paramastigota, promastigota e opistomastigota foram determinados através de microscopia de luz, em lâminas coradas pelo método Panótico ou Giemsa. Pelo menos 200 células foram examinadas em cada preparação. O crescimento foi estimado pela contagem das células em câmara de Neubauer.

Atividade antimicrobiana:

A atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de *V. polyanthes* foi avaliada seguindo a técnica de difusão em Ágar Mueller – Hinton¹², em duplicata e repetidos pelo menos duas vezes. Foram utilizadas as concentrações de 36,02; 72,04; 108,06; 144,08; 180,1 e 216,12 mg/mL de extrato. As leituras dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento microbiano foram medidas em milímetros (mm), com auxílio de um paquímetro.

Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração microbicida mínima (CMM):

Para os ensaios da CIM e CMM foram realizadas diluições seriadas em tubos e plaqueadas em meio Brain Heart Infusion (BHI), para bactérias e meio Sabouraud Dextrose (SAB) para fungos¹³.

Dose letal média 50 (DL₅₀):

Foram utilizados seis grupos de camundongos *Swiss albinus* (n = 10 animais/grupo), pesando entre 27 e 36 gramas, provenientes do Biotério da Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS, Campus de Alfenas, MG, que receberam, por via oral, dose única de diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de *V. polyanthes* (250, 500, 750, 1000, 1500 e 2000 mg/Kg), segundo técnica já descrita na literatura¹⁴.

Teste do micronúcleo (MN):

A técnica utilizada para a obtenção das células de medula óssea para o estudo da frequência de micronúcleos foi a descrita por Schimd¹⁵ e modificada por Zambrano, Targa e Rabello-Gay¹⁶. O extrato de *V. polyanthes* foi testado separadamente empregando-se 3 doses, levando-se em consideração os dados obtidos na metodologia empregada para se estabelecer a DL₅₀ (i.e., 80%^{DL50}, 50%^{DL50} e 25%^{DL50}, ou ainda, ≤ 2.000 mg/Kg na inexistência de letalidade), e ensaiados em 3 doses (1000, 1500 e 2000 mg/Kg de peso corporal), selecionadas de acordo com as doses mínima e máxima que poderiam ser utilizadas em humanos. Cada ensaio foi realizado empregando-se 5 grupos de animais,

cada grupo constituído por 3 machos e 3 fêmeas: (1) controle negativo (NaCl 0,9%) administrado por gavagem; (2) controle positivo (50 mg/Kg de Etil-Nitroso-Ureia (ENU), Sigma N8509) administrado via intraperitoneal; (3) tratamento 01 (1000 mg/Kg) administrado por gavagem; (4) tratamento 02 (1500 mg/Kg) administrado por gavagem; (5) tratamento 03 (2000 mg/Kg) administrado por gavagem. Foram analisados ± 2000 eritrócitos policromáticos (PCE) por animal (camundongo *Swiss albinus*), para cada tempo de coleta (24 e 48 h) de tratamento, quanto à presença de micronúcleos (PCMN). A relação entre o número total de PCE e eritrócitos normocromáticos (NCE), obtidos da medula óssea, também foi avaliada, conforme modelo proposto por Margolin e Risko¹⁷. Embora o teste do micronúcleo forneça evidências de efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos para determinada substância teste, o aumento da frequência de NCE, um valor significativamente decrescente na relação PCE/NCE em comparação com o controle negativo, é sugestivo de toxicidade sistêmica, bem como para medula óssea¹⁸. Este ensaio foi realizado seguindo as normas do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Animais (CEP/UNIFENAS, Campus de Alfenas, MG, Protocolo nº. 15/2007).

Análise estatística dos ensaios de ação antimicrobiana, diferenciação/crescimento celular e mutagenicidade:

Para os ensaios de ação antimicrobiana e diferenciação, foi utilizada estatística descritiva. Aos resultados obtidos nos ensaios de mutagenicidade foram empregados tratamentos estatísticos de Análise de Variância em esquema fatorial, considerando sexo, tempo e tratamento (2x2x5), com três repetições e um delineamento inteiramente casualizado. As médias foram comparadas utilizando o Teste de Tukey-Kramer – 2%¹⁹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O protozoário *H. samuelpessoai* foi utilizado como modelo para o estudo dos efeitos do extrato hidroalcoólico de *V. polyanthes* (assa-peixe) sobre o crescimento e diferenciação celular.

Conforme demonstrado na Tabela 1, o extrato de assa-peixe nas concentrações que variaram de 36,02 mg/mL a 720,4 mg/mL não causou o aparecimento percentualmente significativo de forma opistomastigota, considerada a forma diferenciada, embora tenha sido detectada a inibição no crescimento do flagelado, se comparada ao aumento das concentrações do extrato.

Essa ocorrência poderia ser um indicativo de que substâncias presentes no extrato estejam sinalizando, com receptores da membrana celular, o mecanismo de inibição do crescimento, mas não o da diferenciação. Indiretamente, essa ocorrência pode indicar a inexistência de produtos

contidos no extrato potencialmente mitogênicos e, ou, mutagênicos, pelo menos nesse sistema experimental.

Em estudos realizados por Castellanos et al.²⁰, *H. samuelpessoai*, quando cultivada em meio contendo concentrações de 4 a 20 mg/mL de dimetilsulfóxido,

Tabela 1. Números de células no crescimento e diferenciação celular de *H. samuelpessoai* na presença e ausência do extrato hidroalcoólico de *V. polyanthes* Less (assa-peixe)

Extrato (µl)	Concentração do extrato (mg/mL)	Número de células/mL	Promastigota	Paramastigota	Opistomastigota
Sem adição	0	32 x 10 ⁷	99	1	0
50	36,02	28 x 10 ⁷	98	2	0
100	72,04	25 x 10 ⁷	97	3	0
200	144,08	21 x 10 ⁷	96	3	1
500	360,2	07 x 10 ⁷	96	3	1
750	540,3	05 x 10 ⁷	96	3	1
1000	720,4	05 x 10 ⁷	95	4	1

Tabela 2. Diâmetro dos halos de inibição das cepas fúngicas e bacterianas submetidas ao extrato hidroalcoólico de *V. polyanthes* Less (assa-peixe) em diferentes concentrações

Micro-organismos	Halos de inibição (mm) ¹				
	Concentração do extrato (mg/mL)				
	36,02	72,04	108,06	144,08	180,1
<i>Bacillus cereus</i> (ATCC 11778)	19	22	26	27	28
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	..**	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	-	-	-	-	-
<i>Cryptococcus neoformans</i> (ICC 107- sorotipo B)	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> (ATCC 13048)	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 8739)	-	12	14	14,5	15
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 13883)	-	-	-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i> (ATCC 9341)	-	-	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i> (ATCC 25933)	-	-	-	16	17
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 25619)	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ATCC 2601)	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> Typhimurium (ATCC 14028)	-	-	-	-	18
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	-	-	-	17,5	17,5
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus pyogenes</i> (ATCC 19615)	-	-	-	-	17

¹Nota: halos de inibição em milímetros medidos com paquímetro

** Resistentes

Tabela 3. Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato hidroalcoólico de *V. polyanthes* Less, submetido às cepas microbianas

Micro-organismos	UFC/ mL ¹	CIM ²
<i>Bacillus cereus</i> (ATCC 11778)	8,0 x 10 ⁶	180,1
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	1,5 x 10 ⁸	- *
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	2,6 x 10 ⁶	-
<i>Cryptococcus neoformans</i> (ICC 107- sorotipo B)	1,5 x 10 ⁶	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> (ATCC 13048)	1,44 x 10 ⁸	-
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 8739)	1,44 x 10 ⁹	72,04
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 13883)	1,5 x 10 ⁸	-
<i>Micrococcus luteus</i> (ATCC 9341)	1,5 x 10 ⁸	-
<i>Proteus mirabilis</i> (ATCC 25933)	1,44 x 10 ⁹	144,08
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 25619)	1,5 x 10 ⁸	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ATCC 2601)	1,27 x 10 ⁷	-
<i>Salmonella Typhimurium</i> (ATCC 14028)	1,5 x 10 ⁸	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	1,5 x 10 ⁸	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	315 x 10 ⁸	-
<i>Streptococcus pyogenes</i> (ATCC 19615)	1,5 x 10 ⁸	-

¹ Concentração Inibitória Mínima

² Unidade formadora de colônia por mL

* Resistente

multiplicava-se aproximadamente na mesma proporção que as células controle e, com o aumento progressivo da concentração, observou-se uma inibição do crescimento do flagelado. Dados semelhantes foram obtidos em estudos realizados por Venturelli²¹ e Perazzo et al.²², com o extrato de *Ginkgo biloba* e que corroboram este estudo.

Fiorini et al.²³, realizando ensaios com *Herpetomonas megaseliae*, observaram o aumento de células diferenciadas opistomastigotas em um período de incubação de 96 horas, quando tratadas com lipopolissacarídeo, extraído de *Escherichia coli*. Entretanto, esses autores verificaram que, nas mesmas condições, tal tratamento não interferiu com o crescimento celular. Já foi demonstrado que o GMP-cíclico é o mensageiro intracelular que induz a divisão celular e limita a diferenciação e o AMP-cíclico inibe a divisão e promove a diferenciação²⁴.

Na ação antimicrobiana do extrato (Tabela 2), apresentaram halo de inibição as seguintes cepas bacterianas: *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Proteus mirabilis* (ATCC 25933), *Salmonella Typhimurium* (ATCC 14028), *Staphylococcus aureus*

(ATCC 6538), *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19675). As cepas de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Cryptococcus neoformans* (ICC 107- sorotipo B), *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Micrococcus luteus* (ATCC 9341), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25619), *Sccharomyces cerevisiae* (ATCC 2601) e *Staphylococcus epdermides* (ATCC 12228) não apresentaram halos de inibição nos testes de difusão em ágar. Estes resultados indicam, indiscutivelmente, que tais micro-organismos sejam resistentes, segundo a metodologia utilizada.

Quanto à Concentração Inibitória Mínima (CIM) demonstrada na Tabela 3, o estudo revelou que o extrato apresentou efeito bacteriostático sobre *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Escherichia coli* (ATCC 8739) e *Proteus mirabilis* (ATCC 25933), nas concentrações de 180,1; 144,08 e 72,04 mg/mL, respectivamente. Contudo, não houve efeito bacteriostático para *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Cryptococcus neoformans* (ICC 107- sorotipo B), *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Micrococcus*

luteus (ATCC 9341), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25619), *Sccharomyces cerevisiae* (ATCC 2601), *Salmonella Typhimurium* (ATCC 14028), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19675).

Nenhuma bactéria Gram-positiva, Gram-negativa ou levedura utilizada neste estudo apresentou Concentração Microbicida Mínima (CMM), ou seja, efeito bactericida com as doses ensaiadas do extrato.

Embora vários estudos, a exemplo de Loureiro²⁵, Santos et al.²⁶, Amorozo²⁷ e Guarim Neto e Moraes⁸, terem demonstrado o uso popular da planta assa-peixe pela população do Estado do Mato Grosso e pelos sítios da Reserva de Rio das Pedras, em Mangaratiba/RJ²⁸, para o tratamento de doenças do aparelho digestório, respiratório, geniturinário, circulatório, sistema osteomuscular, para envenenamentos, doenças do sangue e órgãos hematopoiéticos, pele, glândulas endócrinas e tecido conjuntivo, não foram encontrados estudos que rebatem a sua ação antimicrobiana, o que reforçaria o seu uso, visto conter flavonoides e óleos essenciais²⁹.

Quando foi iniciada a industrialização da penicilina, no início da década de 1940, cerca de 80-90% das amostras isoladas de *Staphylococcus aureus* eram sensíveis a esse antibiótico. Nos dias atuais, verifica-se exatamente o oposto do ocorrido naquela época, além da resistência múltipla observada em muitos micro-organismos a vários antibióticos disponíveis no mercado. Por esse motivo, dentre outros, os órgãos governamentais que regem as atividades relacionadas com a saúde têm colocado como uma de suas metas prioritárias o desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas utilizando plantas da rica flora brasileira. Em estudo realizado por Duarte et al.³⁰, extratos naturais como *Achyrocline satureioides* (d.C.) Lam, *Achillea millefolium*, *Mikania laevigata*, *Solidago millefolium* e *Piper marginatum* apresentaram atividade antimicrobiana sobre cepas bacterianas como *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*. Em outro estudo realizado por Silveira³¹, micro-organismos como *S. aureus* (ATCC 6538), *P. aeruginosa* (ATCC 25619), *S. mutans* (ATCC 25175) e *S. salivaris* (CDC 262) apresentaram halo de inibição e CIM, quando expostos ao extrato glicolítico de *Tabebuia hepaphylla* (Vell.) Toledo.

Gonçalves et al.³² compararam a atividade antimicrobiana de diversos extratos vegetais em dez micro-organismos, dos quais o de *Casearia sylvestre* apresentou ação contra dois microrganismos – *Proteus mirabilis* e *Shigella sonnei* –, e constataram, também, a

resistência de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Sato³³ descreveu a atividade do extrato de *Casearia sylvestre* em cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, em que foi observada no antibiograma a atividade do extrato em *S. aureus*, mas não em *E. coli*.

Em estudos realizados com plantas utilizadas na medicina popular, como *Achillea millefolium*, *Mikania laevigata*, *Solidago chilensis*, *Piper marginatum*, *Aloysia fratissima*, *P. marginatum*, *M. laevigata*, *Mentha pullegium*, *Mikania glomerata*, *Stachytarpetta cayensis*, *Lafoensia pacari* St. Hill. e *Bacharia dracunculifoliae*, foi atribuída atividade antimicrobiana, em sua maioria a produtos do metabolismo secundário das plantas, como terpenoides e compostos fenólicos, como flavonoides e saponinas, assim como a ácidos diterpênicos, ácidos caurenóico e cupressênico (esses últimos principais constituintes dos extratos de *M. laevigata*), que também na forma pura exibem atividade²⁸.

Os achados acima descritos relacionam quantidades de princípios ativos presentes nos extratos, com a ação destes, o que poderia explicar os resultados obtidos no presente estudo, no qual a sensibilidade das cepas bacterianas de *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Proteus mirabilis* (ATCC 25933) e *Escherichia coli* (ATCC 8739) apresentou uma ação bacteriostática e não bactericida do extrato.

Segundo Newall³⁴, os flavonoides apresentam várias ações farmacológicas, tais como atividade antibacteriana, anti-inflamatória, antioxidante e hipolipidêmica. Assim, a atividade antimicrobiana apresentada por *V. polyanthes* pode estar relacionada com a presença de flavonoides em sua composição³⁵.

Em relação ao que tange à determinação da Dose Letal Média (DL₅₀) do extrato em estudo, neste trabalho, não se verificaram mortes após a administração do extrato hidroalcoólico de *V. polyanthes*, mesmo nas concentrações mais elevadas (2000 mg/Kg), por via oral, desde as primeiras 72 horas até o 7º dia, sugerindo ausência de DL₅₀ nas concentrações analisadas.

As concentrações do extrato para cada tratamento, o número e o gênero de animais por grupo e o tempo de tratamento usados no presente ensaio foram determinados de acordo com OECD (*Guideline for the Testing of Chemicals*)¹⁸.

A análise do número/índice percentual de PCEMNs entre o grupo de animais controle positivos (Etil-Nitroso-Ureia - ENU 50 mg/Kg) e negativo (NaCl 0,9%), bem como controle positivo e tratamentos (1000-

Tabela 4. Número de eritrócitos policromáticos (PCE) analisados, número e frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMN_s) e relação entre PCE e eritrócitos normocromáticos (NCE), observada em células de medula óssea de camundongos Swiss albinus (fêmeas e machos), tratados com o extrato hidroalcoólico de *Vernonia polyanthes* Less, e os respectivos controles, nos tempos de 24 e 48h

Tempos de Tratamento	Número de PCEs	PCEMN _s	PCEMN _s	PCE/NCE
	Analisados	(n)	(%)	
24h				
NaCl 0,9%	12288	14	0,11c	106,24 ^a
Etil-nitroso-ureia (50 mg/kg)	12298	117	0,95a	9,34 ^b
<i>Vernonia polyanthes</i> Less (1000 mg/Kg)	12146	34	0,28c	6,47 ^b
<i>Vernonia polyanthes</i> Less (1500 mg/Kg)	12227	34	0,28c	8,24 ^b
<i>Vernonia polyanthes</i> Less (2000 mg/Kg)	12141	60	0,49b	5,71 ^b
48h				
NaCl 0,9%	12536	23	0,18c	152,02 ^a
Etil-nitroso-ureia (50mg/kg)	12143	102	0,84a	10,41 ^b
<i>Vernonia polyanthes</i> Less (1000 mg/Kg)	12189	24	0,20c	9,26 ^b
<i>Vernonia polyanthes</i> Less (1500 mg/Kg)	12210	22	0,18c	11,77 ^b
<i>Vernonia polyanthes</i> Less (2000 mg/Kg)	12280	46	0,37b	11,00 ^b

Análise estatística de variância, em delineamento inteiramente casual e esquema fatorial 5x2x2 (tratamentose-xotempo), e ao teste de Tukey-Kramer (P < 0,05)

^{a,b,c} Letras iguais, estatisticamente não significativas
Letras diferentes, estatisticamente significativas

2000mg/Kg), revelou diferenças estatísticas significativas, sugerindo ausência de potencial clastogênico e/ou aneugênico do extrato hidroalcoólico de *V. polyanthes*, independentemente do tempo de tratamento ou sexo do animal. Entretanto, essas diferenças foram observadas entre os grupos de animais controle negativos e tratamento na maior concentração (2000 mg/kg), o que sugere uma leve predisposição aos efeitos genotóxicos desse extrato a partir de uma dosagem acima de 1500 mg/Kg.

A relação entre PCE e NCE mostrou-se significativamente reduzida nos grupos de animais controle positivos e de todos os tratamentos, independentemente do tempo ou gênero, devido ao aumento de NCE na medula óssea, indicando toxicidade tanto sistêmica como na medula óssea.

CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos conclui-se que houve inibição do crescimento de *H. samuelpessoai*, ante as concentrações crescentes do extrato de *V. Polyanthes*,

sem aparecimento da forma diferenciada opistomastigota, estatisticamente significativo. Demonstraram halo de inibição, na presença do extrato de *V. Polyanthes*, as cepas de *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Salmonella* Typhimurium. Todavia, demonstraram efeitos bacteriostáticos somente para *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis*. A avaliação mutagênica/mitogênica do extrato de *V. polyanthes* revelou ausência (1.000 mg/Kg e 1.500 mg/Kg) e moderado (2.000 mg/Kg) efeito clastogênico e/ou aneugênico nas dosagens de 1000 e > 1500 mg/Kg, respectivamente, independentemente do tempo de tratamento (24/48h) e sexo do animal. Adicionalmente, tais resultados foram sugestivos de toxicidade sistêmica, visto o aumento de eritrócitos normocromáticos na medula óssea de camundongos, também independentemente da dose, gênero e tempo. Contudo, a ausência de DL₅₀ foi observada em todas as concentrações testadas (250- 2000 mg/Kg). Portanto, o extrato de *V. polyanthes* Less apresenta potencial terapêutico, pois possui atividade antimicrobiana e

não apresenta atividade mutagênica (i.e., clastogênica e/ou aneugênica) significativa a partir da dosagem \leq 1500 mg/Kg. Finalmente, estudos complementares de mutagenicidade (teste de Ames, teste Cometa) e toxicidade tecido-específico poderiam elucidar outros possíveis mecanismos e efeitos genotóxicos e tóxicos e, ainda, estabelecer concentrações com baixa toxicidade ou sem efeitos tóxicos que assegurem a saúde humana e a atividade fitofarmacológica de *V. polyanthes*.

REFERÊNCIAS

1. Barbastefano V, Cola MM, Camargo EES, Vilegas W, Hiruma-Lima CA, Brito ARMS. Anais da XVIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FESBE; 2003, v. 12067.
2. Rossato SC. Utilização de plantas por populações do litoral norte do estado de São Paulo [dissertação de mestrado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 1996.
3. Benfatti AC, Barbastefano V, Rodrigues J, Rinaldo D, Santos LC, Brito ARMS et al. Estudo químico do extrato clorofórmico das folhas de *Vernonia polyanthes* Less. (*Asteraceae*). 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, fevereiro de 2007, São Paulo.
4. Silva NCC. Estudo comparativo da ação antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais e sinergismo com drogas antimicrobianas [dissertação de mestrado]. Botucatu (SP): Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências; 2010.
5. Lopes AH, Dutra PM, Rodrigues CO, Soares MJ, Angluster J, Coredeiro RS. Effect of platelet-activating factor on the process of cellular differentiation of *Herpetomonas muscarum muscarum*. *J Euk Microbiol*. 1997; 44(4):321-5.
6. Naves MMV, Moreno FS. Diferenciação Celular: Importância na Hepatocarcinogênese e Papel Modulador do β – Carotene. *Rev Bras Canc*. 2000; 46(4): 389-9.
7. Cohen ML. Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. *Science* 1992; 257: 1050-5.
8. Guarim neto G, Morais RG. Recursos medicinais de espécies do Cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. *Acta Bot Bras*. 2003; 17(4): 561-4.
9. Jorgetto G. Ação antimicrobiana do extrato de *Vernonia polyanthes* Less (assa – peixe) e seus efeitos genotípicos e fenotípicos em modelos *in vitro* e *in vivo*. In: 54º Congresso Brasileiro de Genética. Salvador: Sociedade Brasileira de Genética, 2008:133.
10. Harbone JB. *Phytochemical Methods*. London: Chapman e Hall; 1983.
11. Roitman C, Roitman I, de Azevedo HP. Growth of an insect trypanosomatid at 37°C in defined medium. *J Protozool*. 1972; 19(2): 346-9.
12. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Amer J Clín Path*. 1966; 45: 493-6.
13. National Committee for Clinical Laboratory Standards [NCCLS]. 2000. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, (5th ed.) NCCLS document M7-A5. Wayne (PA): National Committee for Clinical Laboratory Standards.
14. Malone MH, Robicha UD. A Hippocratic screen for pure or crude drug materials. *Lhoydia*. 1962; 25: 320-2.
15. Schmid W. The micronucleus test for cytogenetic analysis. In: Hollaender, A. (Ed.). *Chemical mutagens: principles and methods for their detection*. New York: Plenum Press; 1976: 31-53.
16. Zambrano MA, Targa HJ, Rabello-Gay MN. Physiological saline solutions as a useful tool in micronucleus and metaphase slide preparations. *Stain Technol*. 1982; 57 (1): 48-9.
17. Margolin BH, Risko KJ. The statistical analysis of *in vivo* genotoxicity data. Case studies of the rat hepatocyte UDS and mouse bone marrow micronucleus assay. In: ASHBX, J. et al. Evaluation of short-term tests for carcinogens. Report of the international programme on chemical safety's collaborative study on *in vivo* assay. Oxford: Oxford University Press, 1998: 29-44.
18. Oecd Guideline for the Testing of Chemicals: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test (474, Adopted: 21 st July 1997).
19. Mendes BA. Métodos Estatísticos. [acesso em: 2007 jan. 09]. Disponível em: [<http://www.uac.pt/~amendes/mestrado/regrMultvResd.pdf>].
20. Castellanos GB, Angluster J, Souza W. Induction of differentiation in *Herpetomonas samuelpeisoai* by dimetilsulfoxide. *Acta Tropica*. 1981; 38: 29-37.
21. Venturelli SM. Ação da *Ginkgo biloba* em tripanossomatídeos do gênero *Herpetomonas* [dissertação de mestrado] Alfnas: Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS; 2000. p. 78.
22. Perazzo FF et al. *Ginkgo Biloba* leaves extract on growth and morphology of trypanosomatids. *Bol Lat Caribe Plant Med Arom*. 2011; 10 (2): 147-54.
23. Fiorini JE, Alviano CS, Esteves MJG, Angluster J, De Souza W, Roitman I. Effect of lipopolysacáride (LPS) an the metabolism and cell surface of the trypanosomatid *Herpetomonas megaseliae*. *Comp Biochem Physiol*. 1985; 80(3): 537-42.
24. Fiorini JE, Roitman I, Angluster J, Alviano CS, Silva-Filho FC, Souza W. *Herpetomonas megaseliae*: effect of lipopolysacáride on cell surface anionogenic groups. *Parasitol Res*. 1991; 77(2): 102-08.
25. Loureiro RNO. Plantas medicinais no cotidiano da comunidade de Baxiú, Barra do Bugres, Mato Grosso [dissertação de mestrado]. Cuiabá (MT): Universidade Federal do Mato Grosso; 1999. p. 104.
26. Santos ALS et al. Secreted phosphatase activity induced by dimethyl sulfoxide in *Herpetomonas samuelpeisoai*. *Arch Biochem Biophys*. 2002; 405(2): 191-8.
27. Amorozo MCM. Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antônio do Leverger, MT, Brasil. *Acta Bot Bras*. 2002; 16 (2): 561-84.
28. Medeiros MFT et al. Plantas medicinais e seus usos pelos sítiantes da Reserva Rio das Pedras, Mangaratiba, RJ, Brasil. *Acta Bot Bras*. 2004; 18 (2): 391-9.
29. Corrêa RM et al. Rendimento de óleo essencial e caracterização organoléptica de folhas de assa-peixe submetidas a diferentes métodos de secagem. *Ciênc Agrotec*. 2004; 28 (2): 339-44.

30. Duarte MCT, Figueira GM, Pereira B, Magalhães PM, Delarmelina C 2004. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. *Rev Bras Farmacog*. 14(1): 6-8.
31. Silveira DG, Pereira MA, Cardoso LGV, Silva JMSE, Carvalho JCT, Fiorini JE. Atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima de *Tobebuia heptaphylla* (Vell.) Tolledo (IPÊ ROXO). *In: Seminário de Iniciação Científica da Unifenas. Alfenas: Seminário de Iniciação Científica. 2004: 45.*
32. Gonçalves AI, Alves Filho A, Menezes H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. *Arq Inst Biol*. 2005; 72 (3): 353-8.
33. Sato, MEO. Estudo da estabilidade de uma formulação na forma gel, veiculando o extrato fluido de *Casearia sylvestris* Sw., Flacourtiaceae (“guaçatonga”) [tese de doutorado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 1998. Pág. 164 .
34. Newall CA, Anderson LA, Phillipson DJ. *Herbal Medicines: A Guide for Health-care Professionals*. The Pharmaceutical Press: Londres; 1996.
35. Souza FA, Sena J, Maranhão LT, Oliveira CMR, Guimarães ATB. Caracterização fitoquímica preliminar de infusões populares obtidas das partes aéreas das espécies *Apium leptophyllum* (Pers.) F. Muell. ex Benth. (Apiaceae), *Elvira biflora* L. (DC.) e *Vernonia polyanthes* Less. (Asteraceae). *Rev Bras Farm*. 2008; 89(1): 24-7.

Atividade antioxidante e correlação com fenólicos totais em genótipos de Urucum (*Bixa orellana* L.)

Antioxidant activity and correlation with total phenolicin genotypes of Annatto (*Bixa orellana* L.)

RIALA6/1345

Alana Rocha LEMOS¹, Newton Oliveira RÊGO JÚNIOR², Abel Rebouças SÃO JOSÉ³, Mara Lúcia Albuquerque PEREIRA⁴, Marcondes Viana da SILVA^{4*}

*Endereço para correspondência: ⁴Departamento de Estudos Básicos e Instrumentais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Praça Primavera, 40, Bairro Primavera, Itapetinga, BA, Brasil, CEP 45.700-000, tel: 77 3261-8461, e-mail: mviana@hotmail.com

¹Departamento de Ensino Básico, Técnico e Tecnológico, Instituto Federal Baiano.

²Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

³Departamento de Fitotecnia e Zootecnia, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

⁴Departamento de Estudos Básicos e Instrumentais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

Recebido: 03.06.2010 – Aceito para publicação 09.01.2011

RESUMO

O estudo objetivou quantificar os fenóis totais em cinco genótipos de *Bixa orellana* (*Piave vermelha*, *Piave vermelha gigante*, *CPATU 0060*, *Bico-de-pato I* e *Peruana Paulista*). Os extratos foram obtidos em etanol PA e solução hidroetanólica (80:20,v.v⁻¹), sendo os resultados obtidos comparados a dois antioxidantes sintéticos, butil-hidroxitolueno (BHT) e ácido gálico (GAE). Os teores de fenólicos totais dos genótipos analisados apresentaram valores médios de 776,02 a 1.498,48 mg GAE.100 g⁻¹ de amostra (peso seco) e 297,08 a 450,97 mg GAE.100 g⁻¹, para os extratos hidroetanólicos e etanólicos, respectivamente. A medida da atividade antioxidante para os extratos hidroetanólicos variou entre 48,31% e 70,10%. Valores inferiores foram obtidos para atividade antioxidante dos extratos etanólicos (18,91% a 35,26%). Os resultados evidenciaram que o genótipo CPATU 0060 apresentou teores de fenólicos totais e atividade antioxidante superiores aos demais genótipos analisados. Foi observada baixa correlação entre as variáveis de fenóis totais e atividade antioxidante para os extratos hidroetanólicos (R= -0,5328) e etanólicos (R= 0,4115). Considerando a ampla aplicação do urucum na indústria de alimentos e farmacêutica, os resultados sugerem que seus grãos podem ser considerados uma fonte potencial de antioxidante natural.

Palavras-chave. alimento funcional, composição de alimentos, sistema modelo β -caroteno/ácido linoleico, espectrofotometria, análise de alimentos.

ABSTRACT

The study aimed to quantify total phenols in five genotypes of *Bixa orellana* (*Piave vermelha*, *Piave vermelha gigante*, *CPATU 0060*, *Bico de pato I* e *Peruana paulista*). The extracts were obtained from ethanol PA and hydroethanol solution (80:20, vv⁻¹), the results compared to two synthetic antioxidants, butylated hydroxytoluene (BHT) and gallic acid (GAE). The total phenolic contents of the genotypes studied showed mean values from 776.02 to 1498.48 mg GAE.100g⁻¹ sample (dry weight) and 297.08 to 450.97 mg GAE g⁻¹.100, for the extracts hydroethanolic and ethanol, respectively. The measurement of antioxidant activity of the hidroethanolic extracts ranged from 48.31% and 70.10%. Lower values were obtained for the antioxidant activity of ethanol extracts (18.91% to 35.26%). Studies indicate that the genotype CPATU 0060 showed total phenolic contents and antioxidant activity than the other genotypes studied. Low correlation was observed between the variables of total phenols and antioxidant activity of the hydroethanolic extracts (R = -0.5328) and ethanolic (R = 0.4115). Considering the wide application of annatto in food industry and pharmaceuticals, the results suggest that the grains can be considered a potential source of natural antioxidant.

Keywords. functional food, food composition, system model β -carotene/linoleic acid, natural antioxidants, food analysis.

INTRODUÇÃO

A utilização de antioxidantes sintéticos na indústria de alimentos constitui um mecanismo de defesa na inibição da lipoperoxidação. Entretanto, esses aditivos são apontados como causadores ou promotores de diversas patologias^{1,2}. Assim sendo, é crescente o número de publicações relativas à substituição por antioxidantes de fontes naturais³⁻⁶.

A lipoperoxidação é um processo complexo que ocorre em cadeia, no qual estão envolvidos fatores oxidantes, como tratamento térmico, luz UV, radiações ionizantes, metais, lipoxigenases e outros, que favorecem a produção de intermediários radiculares reativos e resultam em produtos secundários com potencial efeito toxicológico^{7,8}.

Os antioxidantes atuam minimizando o processo oxidativo durante as etapas da oxidação por diferentes mecanismos. Os antioxidantes de natureza enzimática integram o sistema de defesa antioxidante celular, removendo formas reativas de oxigênio, nitrogênio, enxofre e outras, enquanto os antioxidantes não enzimáticos podem atuar na complexação de íons metálicos e na redução de radicais livres e peróxidos, nestes últimos estão incluídos os compostos fenólicos, considerados potenciais antioxidantes⁹.

A maioria dos vegetais superiores sintetiza uma expressiva quantidade de metabólitos secundários relacionados a diversas funções, como quimopreventivos em resposta ao ataque de herbívoros e microrganismos, na biossíntese de compostos sinalizadores da polinização, para manter o equilíbrio ecológico e estabelecer, assim, a homeostase da planta, sendo sua síntese regulada por fatores bióticos e abióticos¹⁰. Estes fitoquímicos de ocorrência natural apresentam-se como misturas complexas que diferem entre vegetais, partes da planta (sementes, folhas e raízes), bem como durante os estádios de desenvolvimento da mesma. Em geral, são agrupadas estruturalmente em três grupos químicos: terpenos, compostos nitrogenados e fenólicos, neste último estão incluídos os flavonoides, considerados potenciais antioxidantes naturais¹¹.

A *Bixa orellana* L. (urucum) é uma importante fonte de matéria-prima empregada na indústria de alimentos brasileira, especialmente na produção de embutidos, massas, queijos, sorvetes e confeitarias, e corresponde a aproximadamente 90% do mercado de corantes. Em nível mundial, representa cerca de 70% do mercado de corantes naturais empregados na indústria

de alimentos. Apesar da sua utilização como corante há muitos séculos pelos índios, seu uso comercial é recente e vem aumentando cada vez mais em função das exigências do mercado por produtos mais “saudáveis”, uma vez que a legislação limita o uso de determinados aditivos artificiais na indústria alimentícia e farmacêutica¹².

O estado da Bahia possui uma área plantada de urucum estimada em 2 mil hectares, com maior concentração no sul e extremo sul, sudoeste e litoral norte. Por essa razão, o banco de germoplasma ativo da Bahia está instalado na Universidade do Sudoeste da Bahia/UESB, com mais de 120 acessos de urucum, sendo considerado um dos maiores do mundo com cerca de mil espécies de plantas^{13,12}. Dentre estas, destacam-se *Piave vermelha*, *Piave vermelha gigante* e *CPATU 0060*, pela boa produtividade, associada a elevados teores de bixina nas sementes, que variam de 3,5% a 6%. O genótipo de *Bico-de-pato* é o mais cultivado no extremo sul da Bahia, possui elevada produtividade e embora apresente limitado teor de bixina, entre 2,1 a 3,3%, destaca-se como um dos mais vigorosos genótipos no Brasil.

Pelo exposto e considerando as amplas aplicações das sementes do urucueiro na indústria de alimentos, objetivou-se com o presente estudo avaliar os teores de fenólicos bioativos a partir dos extratos de cinco genótipos de urucueiros, determinar o melhor solvente extrator, bem como verificar a correlação entre os teores de fenólicos totais e a atividade antioxidante.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido nos Laboratórios de Química Analítica e Bioquímica, Fisiologia Animal e Nutrição Animal, todos da UESB, Campus de Itapetinga/Bahia. Foram utilizados grãos de urucum (*Bixa orellana* L.) dos genótipos *Piave vermelha*, *Piave vermelha gigante*, *CPATU 0060*, *Bico-de-pato I* e *Peruana paulista*, cedidos gentilmente pelo banco ativo de germoplasma da UESB, Campus de Vitória da Conquista, Bahia, em setembro de 2007, os quais foram selecionados por serem os mais cultivados no Brasil.

Preparo da Matéria-Prima

Os grãos de urucum foram ajustados a teores de umidade de 10%, em estufa com circulação forçada de ar à temperatura de (50 ± 2) °C. Em seguida, foram triturados para redução do seu tamanho, em um moinho de bancada, e os grãos triturados foram classificados em peneiras Tyler para tamanho da partícula igual a 180 µm.

As frações obtidas foram acondicionadas a vácuo em sacos de polipropileno e mantidas em local seco, à temperatura ambiente e protegidas da luz.

Obtenção dos Extratos

Para a extração dos compostos fenólicos foram utilizados dois solventes: etanol PA e uma solução hidroetanólica (80:20, v.v-1). Os extratos em etanol PA e hidroetanólicos foram obtidos por processo de extração sólido-líquido: 5 g de amostra desidratada foram mantidos em contato, por 30 minutos e sob agitação constante, com 50 mL dos respectivos solventes, à temperatura ambiente, (28 ± 2) °C. Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 3600 x g por 10 minutos. O resíduo obtido foi submetido a mais uma extração idêntica à descrita anteriormente. Os extratos obtidos foram particionados com hexano, em funil de separação e, posteriormente, clarificados com 5 mL de solução aquosa de hidróxido de bário 0,3 M e 5 mL da solução de sulfato de zinco a 5% e homogeneizada, sendo a mistura deixada em repouso por 20 minutos. Após esta etapa, a mistura foi centrifugada para remoção dos interferentes da análise, conforme procedimento recomendado por Furlong et al¹⁴. Os extratos foram concentrados em evaporador rotativo à temperatura de (50 ± 2) °C, transferidos para tubos de ensaio com tampa e acondicionados a -18 °C. Os extratos concentrados foram liofilizados.

Determinação Espectrofotométrica dos Fenólicos Totais (FT)

Para determinação dos compostos fenólicos totais, foi adotado procedimento proposto por Wettasinghe e Shahidi¹⁵ utilizando o reagente de *Folin-Ciocalteu* (Sigma-Aldrich). O ensaio envolve reações de oxidorredução em meio alcalino, no qual ânions fenolatos são oxidados e o complexo fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) fosfomolibdídico ($H_3PMo_{12}O_{40}$), de cor amarela, proveniente do reagente que é reduzido a uma mistura de óxidos de tungstênio e molibdênio, de cor azul. A intensidade de cor que se desenvolve é proporcional ao teor de compostos fenólicos presentes no extrato. O total de compostos fenólicos nos extratos obtidos foi expresso em mg de equivalente de ácido gálico.100 g⁻¹ da amostra desidratada.

Determinação da Atividade Antioxidante *in vitro* dos Compostos Fenólicos Totais

A atividade antioxidante dos extratos de urucueiros foi avaliada utilizando-se o sistema modelo do β -caroteno/

ácido linoleico, que consiste na cooxidação do β -caroteno/ácido linoleico em uma emulsão aquosa, monitorada com o decaimento da absorvância na região do visível, proposto por Marco¹⁶, Miller¹⁷ e Lee et al.¹⁸ e modificado por Emmons e Peterson¹⁹. A metodologia consiste na homogeneização de 2 mg de β -caroteno em 20 mL de clorofórmio em um balão de fundo redondo contendo 40 mg de ácido linoleico e 400 mg do emulsificante Tween 20 (Emulsão A). Após a dissolução da mistura, foi removido o solvente em evaporador rotativo a (50 ± 2) °C. Posteriormente, foi-se adicionando 100 mL de água destilada saturada com oxigênio sob agitação vigorosa. Alíquotas de 3 mL da emulsão A foram transferidas para uma sequência de nove tubos de ensaio contendo 40 μ L dos extratos brutos liofilizados na concentração de 1 mg.mL⁻¹. Ao primeiro tubo foi realizada a leitura imediata a 470 nm em espectrofotômetro (tempo zero), enquanto os demais tubos foram incubados em banho-maria a (45 ± 2) °C, sendo as leituras realizadas em intervalos de 15 min, durante um período de duas horas. A amostra em branco foi constituída de 3 mL da emulsão ácido linoleico-Tween 40 (Emulsão B) e 40 μ L água destilada oxigenada. A amostra controle, sem antioxidante, foi preparada adicionando 3 mL da emulsão A em uma sequência de nove tubos de ensaio e 40 μ L do solvente testado.

A atividade antioxidante da amostra foi comparada a dois antioxidantes sintéticos, BHT (2,6-di-tert-butil-4-metil fenol) e ácido gálico, ambos na concentração de 1 g.100 mL⁻¹ em etanol PA, que foi determinada nas mesmas condições acima descritas. O percentual da inibição da oxidação em relação ao controle foi obtido pela relação das absorvâncias no tempo final e inicial dos extratos. A atividade antioxidante (AA) foi calculada como percentual de inibição, relativa ao controle, sendo utilizada a seguinte expressão:

$$\% \text{ de Inibição} = 100 \frac{DT_c - DT_a}{DT_c}$$

Onde:

$$DT_c \text{ (Absorbância do controle no início e ao final da análise)} = \ln \frac{A_{t=0}}{A_{t=120}}$$

$$DT_a \text{ (Absorbância da amostra no início e ao final da análise)} = \ln \frac{A_{t=0}}{A_{t=120}}$$

Tabela 1. Teores de fenólicos totais nos extratos etanólicos (EE) e hidroetanólicos (EHE) de urucum

Genótipos	Teor de fenólicos totais	
	EHE (mg GAE.100 g ⁻¹)	EE (mg GAE.100 g ⁻¹)
CPATU 0060	1.498,48 ± 14,50 a	450,97 ± 42,20 a
<i>Piave vermelha gigante</i> (PVG)	1.280,72 ± 14,57 a	310,85 ± 45,87 a
<i>Peruana paulista</i> (PP)	1.024,98 ± 33,29 a	382,21 ± 69,72 a
<i>Bico-de-pato I</i> (BP)	821,15 ± 54,10 a	389,99 ± 22,02 a
<i>Piave vermelha</i> (PV)	776,02 ± 12,49 a	297,80 ± 35,78 a

Os resultados estão expressos como média ± desvio-padrão (n = 3); médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente (p > 0,05)

Análises Estatísticas

Todas as determinações foram realizadas em triplicata e todos os resultados foram apresentados como média ± desvio-padrão (DP). Foram realizadas análises de variância (ANOVA) com duas repetições e o teste de Tukey, ao nível de significância de 5%, usando o Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG) versão 8.0. O coeficiente de correlação foi estabelecido entre os teores de fenólicos totais e atividade antioxidante dos extratos utilizando o software Excel.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 estão apresentados os teores médios de fenólicos totais (FT) obtidos em função do tipo de extrato para cada um dos genótipos de urucueiros, sendo verificada maior eficiência na extração destas fitomoléculas em etanol a 80%, fato que pode ser atribuído à maior afinidade química dos fenólicos por este solvente quando comparado à extração em etanol PA e evidencia que a presença da água no solvente extrator aumenta a eficiência extratora nas matrizes analisadas.

Cardarelli e Mercadante²⁰ quantificaram os FT pelo método de *Folin Ciocalteu* em sementes de urucum empregando diversos solventes e obtiveram 184 mg GAE.100 g⁻¹ para os extratos metanólicos, 156,50 mg GAE.100 g⁻¹ para o hidroetanólico (50:50 v.v⁻¹) e 109,80 mg GAE.100 g⁻¹ para o etanólico. A diferença observada em relação ao presente estudo pode ser atribuída ao tamanho da partícula, o método e o tempo de extração utilizado, além dos genótipos envolvidos. Beal²¹ avaliou os teores de FT em extratos etéreo, acetônico, alcoólico e aquoso de rizomas de gengibre,

utilizando o método de *Folin Ciocalteu* e observou teores médios entre 846,37 a 1409,05 mg GAE.100 g⁻¹, semelhantes aos obtidos neste trabalho.

Shahidi e Nacz²² consideram complexo selecionar a forma mais eficiente de extração dos compostos fenólicos, devido à influência de inúmeros fatores, como a matriz a ser analisada, o solvente extrator, o tamanho das partículas e natureza química. Estes fitoquímicos podem apresentar diferentes graus de polaridades nos alimentos, bem como sua presença em elevados teores, além da possibilidade de sua interação com carboidratos, proteínas e outros componentes dos alimentos, o tempo e a temperatura de extração e outros. Segundo Andreo e Jorge²³, procedimentos adicionais podem ser realizados para remover substâncias não fenólicas, razão pela qual neste estudo foram particionados com hexano e clarificados com solução de Ba(OH)₂ 0,3M e sulfato de zinco a 5% para remoção de interferentes conforme proposto por Furlong¹⁴. A extração com solventes orgânicos de alta polaridade (metanol, etanol e acetona) e água é frequentemente utilizada para a extração dos compostos fenólicos^{24,25}, sendo que o etanol e a água são os solventes mais empregados para a extração de polifenóis totais por questões de baixa toxicidade.

No Brasil, o uso de antioxidantes adicionados em alimentos é controlado pelo Ministério da Saúde e não deve ser superior a 200 mg.kg⁻¹ para BHA e TBHQ e 100 mg.kg⁻¹ para BHT. Estudos utilizando antioxidantes sintéticos em alimentos têm sido frequentemente monitorados considerando os possíveis danos que estes podem provocar ao organismo²⁶. Observa-se que os extratos retardaram de forma expressiva a descoloração do β-caroteno, demonstrados pelos percentuais de inibição (Tabela 2).

Tabela 2. Teores de fenólicos totais nos extratos etanólicos (EE) e hidroetanólicos (EHE) de urucum

Genótipos	Inibição da oxidação do β -caroteno	
	EHE (%)	EE (%)
<i>Peruana paulista</i> (PP)	48,31 \pm 6,73 a	35,26 \pm 3,56 a
<i>Piave vermelha</i> (PV)	65,01 \pm 1,98 a	34,54 \pm 5,26 a
<i>Bico de pato I</i> (BP)	69,94 \pm 7,22 a	33,37 \pm 1,92 a
<i>Piave vermelha gigante</i> (PVG)	55,32 \pm 5,26 a	21,61 \pm 1,26 a
CPATU 0060	70,10 \pm 0,65 a	18,91 \pm 3,34 a

Os resultados estão expressos como média \pm desvio-padrão (n = 3); médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente (p > 0,05)

O extrato hidroetanólico oriundo da variedade CPATU 0060 apresentou percentual de inibição da oxidação do β -caroteno correspondente a 70,10%, sendo esse valor inferior aos obtidos com os antioxidantes sintéticos, ácido gálico e BHT que apresentaram valores de 71% e 99,69% respectivamente (Figuras 1 e 2).

Resultados semelhantes aos obtidos neste estudo foram relatados por Cardarelli e Mercadante²⁰, que avaliaram a atividade antioxidante (AA) pelo radical DPPH de extratos de urucueiro obtidos a partir de solventes com diferentes polaridades e observaram porcentagens da AA de 38% e superiores a 100 %, para os extratos hidroetanólicos, e a 50% para os etanólicos, respectivamente.

Estão disponíveis na literatura vários estudos que demonstram relação entre os teores de fenólicos totais e a atividade antioxidante²⁸⁻³². Observa-se que vários fatores estão envolvidos no efeito antioxidante apresentado pelos fenólicos, tais como a estrutura química e composição dos fitoquímicos fenólicos bioativos, a posição e o número de hidroxilas presentes nas moléculas dos polifenóis, dentre outros. Acredita-se que a ortohidroxilação influencia positivamente no efeito da atividade antioxidante dos fenólicos³³.

Neste estudo, foi observada baixa correlação entre as variáveis, Fenóis Totais e Atividade Antioxidante para os extratos hidroetanólicos (R = -0,5328) e etanólicos (R = 0,4115).

Os coeficientes de correlação (R) e de determinação (R²) para o extrato hidroetanólico de urucum foram inferiores aos observados por Melo et al.³⁴, que investigaram extratos metanólicos de hortaliças utilizando o sistema modelo de oxidação do β -caroteno/ácido linoleico para a medida de AA e o teor

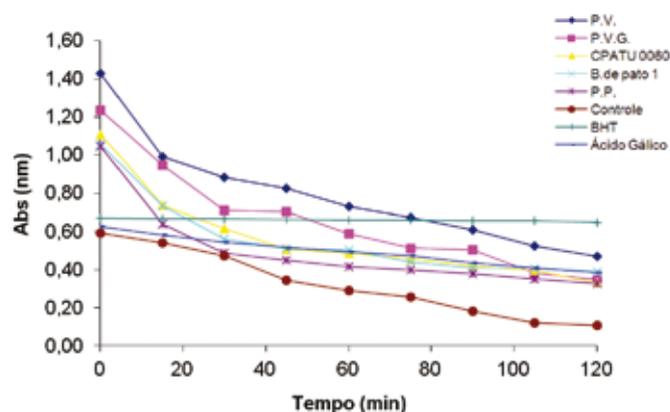


Figura 1. Efeito antioxidante dos extratos etanólicos de genótipos de urucueiros sistema modelo β -caroteno/ácido linoleico. Piave vermelha (PV), Piave vermelha gigante (PVG), CPATU 0060, Bico-de-pato I, Peruana Paulista (PP)

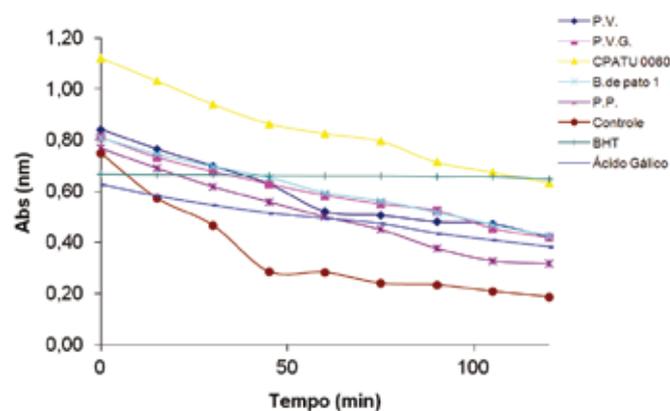


Figura 2. Efeito antioxidante dos extratos hidroetanólicos de genótipos de urucueiros sistema modelo β -caroteno/ácido linoleico. Piave vermelha (PV), Piave vermelha gigante (PVG), CPATU 0060, Bico-de-pato I, Peruana Paulista (PP)

de FT determinado pelo método de *Folin Ciocauteau*. De acordo com Melo et al.³⁴, vários fatores podem influenciar a determinação de fenólicos em matrizes vegetais e, conseqüentemente, a medida da AA, com destaque para aqueles relativos ao cultivo da planta, condições edafoclimáticas, características genéticas da planta, estresses biótico e abiótico e outros.

CONCLUSÃO

Constatou-se uma considerável variação nos teores de compostos fenólicos totais nas sementes dos genótipos estudados, tanto nos extratos hidroetanólicos quanto nos etanólicos. Embora as soluções hidroetanólicas tenham aumentado tanto a extração dos compostos fenólicos presentes nas sementes de urucueiros como a atividade antioxidante, foi observada baixa correlação entre as variáveis de fenóis totais e atividade antioxidante para os dois tipos de extratos estudados. Os extratos hidroetanólicos do genótipo CPATU 0060 apresentaram atividade antioxidante superior a 70%, embora inferior aos antioxidantes sintéticos testados.

Os resultados sugerem que os grãos do urucum podem ser considerados como uma fonte potencial de antioxidante natural e, embora estudos sistemáticos *in vivo* devam ser conduzidos para explorar a biodisponibilidade das fitomoléculas avaliadas, o seu uso deveria ser estimulado, tanto o doméstico como nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica.

REFERÊNCIAS

1. Siegel D, Malkinson AM, Ross D. Butylated hydroxytoluene (BHT)-mediated increases in NAD(P)H-quinone oxidoreductase (QR) in mouse lung: Evidence for the alveolar type II cell as a site of QR activity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1988; 96(1): 68-74.
2. Hwang Deng F, Tsai Ming R, Jeng YT, Sen S. Toxicity and excretion of butylated hydroxytoluene (BHT) through feed in Japanese eel. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 1992; 58(1): 69-74.
3. Mensor LL, Menezes FS, Leitão GG, Reis AS, dos Santos TC, Coube CS et al. Screening of Brazilian Plant Extracts for Antioxidant Activity by the Use of DPPH Free Radical Method. *Phytother Res*. 2001;15(2):127-30.
4. Koleva II, van Beek TA, Linssen JP, de Groot A, Evstatieva LN. Screening of Plant Extracts for Antioxidant Activity: a comparative study of three testing methods. *Phytochem Anal*. 2002;13(1):8-17.
5. Prior RL, Cao G, Martin A, Sofic E, Mcewan J, O'Brien C et al. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity and variety of *Vaccinium* species. *J Agric Food Chem*. 1998;46(7):2686-93.
6. Mariutti LRB, Bragagnolo N. Antioxidantes Naturais da Família Lamiaceae. Aplicação em Produtos Alimentícios. *Braz J Food Technol*. 2007;10(2):96-103.
7. Addis PB. Occurrence of lipid oxidation products in foods. *Food Chem Toxicol*. 1986;24(10/11):1021-30.
8. Tawfik MS, Huyghebaert A. Interaction of packaging materials and vegetable oils: oil stability. *Food Chem*. 1997; 64(4):451-9.
9. Halliwell B. Antioxidant characterization: methodology and mechanism. *Bioch Pharmacol*. 1995; 49(10):1341-8.
10. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med*. 1996; 20(7):933-56.
11. Wink M. Phytochemical diversity of secondary metabolites. *Encycl Plant Crop Sci*. 2004; [s/n]: 915-9.
12. São José AR. Sustentabilidade do Agronegócio de Corantes Naturais de Urucum (*Bixa Orellana* L.) no Brasil. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE URUCUM, 2006, João Pessoa. Anais. João Pessoa: EMEPA.
13. Souza J. Secretaria de Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária do Estado da Bahia. Urucum teve áreas de plantio reduzidas. [Acesso em 12 de julho de 2009.]. Disponível em: [http://www.seagri.ba.gov.br/noticias.asp?qact=view¬id=7960].
14. Furlong EB, Colla E, Bortolato DS, Baisch ALM, Souza-Soares LA. Avaliação do potencial de compostos fenólicos em tecidos vegetais. *Vetor*. 2003;13:105-14.
15. Wettasinghe M, Shahidi F. Evening Primrose Meal: A Source of Natural Antioxidants and Scavenger of Hydrogen Peroxide and Oxygen-Derived Free Radicals. *J Agric Food Chem*. 1999; 47(5):1801-12.
16. Marco GJ. A rapid method for evaluation of antioxidants. *J Am Oil Chem Soc*. 1968;45(9):594-8.
17. Miller HE. A simplified method for the evaluation of antioxidants. *J Am Oil Chem Soc*. 1971;48(2):91.
18. Lee Y, Howard LR, Villalon B. Flavonoids and antioxidant activity of fresh pepper (*Capsicum annuum*) cultivars. *J Food Sci*. 1995;60(3):473-6.
19. Emmons CL, Peterson DM. Antioxidant activity and phenolic contents of oat groats and hulls. *Cereal Chem*. 1999;76(6):902-6.
20. Cardarelli CR, Benassi MT, Mercadante AZ. Characterization of different annatto extracts based on antioxidant and colour properties. *Food Sci Technol*. 2008;41:1689-93.
21. Beal BH. Atividade Antioxidante e Identificação dos Ácidos Fenólicos do Gengibre (*Zingiber officinale*) [dissertação de Mestrado]. Florianópolis, SC: Universidade Federal de Santa Catarina, 2006. p. 87.
22. Shahidi F, Naczk M. Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications. Lancaster: Technomic Publishing Co, Inc. 1995. p. 281-319.
23. Andreo D, Jorge N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. *Bol Centr Pesq Processam Alim*. 2006; 24(2): 319-36.
24. Araújo JMA, Silva MV, Chaves JBP. Supercritical fluid extraction of daidzein and genistein isoflavones from soybean hypocotyl after hydrolysis with endogenous β -glucosidases. *Food Chem*. 2007;105(1): 266-72.

25. Jardini FA, Mancini Filho J. Avaliação da atividade antioxidante em diferentes extratos da polpa e sementes da romã (*Punica granatum*, L.). *Rev Bras Ciênc Farm*. 2007; 43(1).
26. Brasil. Ministério da Saúde. Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Resolução nº 04/88. In: Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação. *Compêndio da Legislação de Alimentos*. São Paulo, SP, 2001. v. 1, p. 326.
27. Babich H. Butylated hydroxytoluene (BHT): a review. *Environm Res*. 1992;29(2/3):1-29.
28. Kaur C, Kapoor HC. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *Int J Food Sci Technol*. 2002;37(2):153-61.
29. Sun J, Chu YF, Wu X, Liu RH. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *J Agric Food Chem*. 2002;50(25):7449-54.
30. Chinnici F, Bendini A, Gaiani A, Riponi C. Radical scavenging activities of peels and pulps from cv. golden delicious apples as related to their phenolic composition. *J Agric Food Chem*. 2004;52(15):4684-9.
31. Santos GM, Maia GA, Sousa PHM, Costa JMC, Figueiredo RW, Prado GM. Correlação entre atividade antioxidante e compostos bioativos de polpas comerciais de açaí (*Euterpe oleracea* Mart). *Arch Latinoam Nutr*. 2008;58(2):187-92.
32. Ismail A, Marjan ZM, Foong CW. Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. *Food Chem*. 2004;87(4):581-6.
33. Shahidi F, Janitha PK, Wanasundara PD. Phenolic antioxidants. *Food Sci Nutr*. 1992;32(1): 67-103.
34. Melo EA, Maciel MIS, Lima VLAG, Leal FLL, Caetano ACS, Nascimento RJ. Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. *Ciênc Tecnol Alim*. 2006;26(3):639-44.

Acetilação e funcionalidade das proteínas das amêndoas da munguba (*Pachira aquatica* Aubl)

Acetylation and activities of proteins from munguba (*Pachira aquatica* Aubl) almonds

RIALA6/1346

Claudia Carneiro de AZEVEDO*, Pushkar Singh BORA, Bernadete de Lourdes de Araújo SILVA

*Endereço para correspondência: Departamento de Tecnologia Química e de Alimentos, Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, R. Farm. Antônio Leopoldo Batista, 821, Água Fria, João Pessoa, PB, Brasil, CEP: 58051-100, tel: 83 3225-1742, e-mail: claudia_azevedo7@yahoo.com.br
Recebido: 10.02.2010 – Aceito para publicação: 31.03.2011

RESUMO

Neste estudo foram caracterizadas as propriedades funcionais das proteínas da amêndoa de munguba, modificadas quimicamente por acetilação. As amostras do isolado proteico foram alteradas por acetilação, utilizando-se anidrido acético como reagente modificante nas concentrações de 5, 10 e 15%. A extensão da modificação obtida com adição de anidrido acético foi, respectivamente, de 31,09, 72,75 e 81,77%. O efeito de modificação sobre as propriedades funcionais do isolado proteico da munguba e dos derivados acetilados mostrou redução da solubilidade com o aumento do pH até que fossem alcançados seus pontos isoelétricos, respectivamente, em pH 5,0 e 4,0, seguidos por aumentos da solubilização a partir desses pontos. A capacidade de absorção de água e do óleo do isolado proteico nativo foi melhorada após acetilação. Houve aumento da capacidade emulsificante do isolado nativo na região alcalina. As características de atividade e estabilidade de emulsão do isolado proteico foram melhoradas no ponto isoelétrico (pI) e no pH 7,0, após a modificação. A viscosidade do isolado proteico nativo sofreu pouca alteração após a modificação; contudo, a viscosidade tornou-se elevada com o aumento da concentração da solução proteica e diminuída com o aquecimento a 90 °C.

Palavras-chave. munguba, isolado proteico, acetilação, propriedades funcionais.

ABSTRACT

The functional properties of proteins from munguba almonds were characterized after being acetylated. Samples of the purified protein were modified by acetylation using acetic anhydride as a modifier reagent in concentrations of 5, 10 and 15%. The range of the modification obtained with acetic anhydride treatment was 31.09, 72.75 and 81.77%, respectively. The effect of the modification on the functional properties of the purified protein from munguba and the acetylated derivatives showed a reduction in solubility proportionally to the pH increase until reaching the isoelectric points at pH 5,0 and 4,0, respectively, and followed by solubilization enhancement from these points. Water and oil absorptions capacity of the purified native protein was improved after acetylation. After introducing the acetyl group into the native protein, the emulsifying capacity increased in the alkaline region; and the emulsion activity and stability were improved in its isoelectric point (pI) and at pH 7. Acetylation of the native protein caused low alteration on the viscosity; however, an increase of viscosity was observed by rising the concentration of protein solution, and it decreased when heated at 90 °C.

Keywords. munguba, protein isolate, acetylation, functional properties.

INTRODUÇÃO

A população mundial vem crescendo de maneira acentuada, exigindo um melhor aproveitamento dos recursos alimentícios disponíveis. A busca por novas fontes proteicas tem sido realizada em virtude da escassez desse composto em algumas regiões do mundo e a perspectiva de que possa se tornar ainda maior, em função do aumento populacional¹.

Diversos estudos têm sido orientados com diferentes proteínas vegetais, em especial aquelas provenientes de sementes oleaginosas, com o propósito de melhorar suas qualidades como ingredientes nutricionais e funcionais. O conhecimento das propriedades funcionais, dentre as quais temos solubilidade, capacidade de absorção de água e óleo, viscosidade, propriedades emulsificantes e espumabilidade, é importante para definir como essas proteínas podem ser usadas como ingredientes na formulação de alimentos e bebidas na indústria, bem como na substituição da proteína animal mais cara por proteína vegetal de menor custo²⁻⁴.

A modificação química das proteínas, pela acetilação com o uso do anidrido acético, pode ser realizada por várias razões, incluindo a melhoria das propriedades funcionais das proteínas, estando diretamente relacionada com as suas características físico-químicas. A reação das proteínas com anidrido acético resulta em eliminação das cargas positivas dos resíduos de lisina e um aumento correspondente na eletronegatividade⁵. A modificação das proteínas, utilizando reagentes acilantes foi pesquisada e documentada por autores que ressaltaram algum tipo de melhoria na funcionalidade dos alimentos, como, por exemplo, no feijão^{6,7}, castanha-do-pará⁸, grão-de-bico⁹, algaroba¹⁰ e amendoim¹¹.

A munguba (*Pachira aquatica* Aubl) é uma planta que tem distribuição predominante na América Central e na América do Sul. A espécie é bastante cultivada em toda a América tropical, principalmente com fins ornamentais. Apresenta sementes (amêndoas) com altas quantias de proteínas e óleos, eventualmente, consumidas cruas ou como feijões assados¹².

Mesmo sendo uma espécie muito conhecida, não foi encontrado nenhum registro científico sobre a avaliação das propriedades funcionais das proteínas da munguba e a modificação química da mesma por acetilação. Desse modo, o presente estudo tem por finalidade caracterizar as propriedades funcionais das proteínas da amêndoa de munguba, possibilitando sua incorporação como um ingrediente funcional em alimentos.

MATERIAL E MÉTODOS

Matéria-prima

A matéria-prima utilizada no desenvolvimento deste trabalho foram as amêndoas da munguba (*Pachira aquatica* Aubl), extraídas de frutos maduros, coletados no município de João Pessoa, Estado da Paraíba, Brasil. As amêndoas de munguba foram obtidas por meio de quebra manual dos frutos que, em seguida, foram lavados em água corrente e secados em estufa de ar circulante a 40 °C por 24 horas. Posteriormente, as amêndoas foram trituradas em liquidificador doméstico, tamisadas em malha de 48 mesh e desengorduradas com o hexano P.A, por 12 horas em extrator Soxhlet.

Obtenção do isolado proteico

A preparação do isolado proteico foi baseada na metodologia descrita por Koyoro e Powers¹³. Foram preparadas suspensões de farinha desengordurada em água destilada na proporção (1:20), equilibradas em pH 10,0 com hidróxido de sódio 1,0 M, com agitação, em agitador magnético, durante 2 horas. As suspensões obtidas foram centrifugadas a 4 °C por 30 minutos. O sobrenadante foi decantado e filtrado. Mais duas etapas de extrações foram realizadas nos resíduos consecutivos, utilizando-se o mesmo procedimento. Os três sobrenadantes resultantes foram reunidos, o seu volume medido e uma alíquota foi retirada para determinação de proteínas pelo método de Biureto¹⁴. O pH do sobrenadante total foi ajustado a 4,5, com ácido clorídrico 1,0 M, para precipitar as proteínas. O precipitado resultante foi ressuspenso mais uma vez, usando os mesmos procedimentos do início. O sobrenadante resultante da reextração teve seu pH ajustado para 4,5 para a precipitação isoeletrica. As proteínas precipitadas isoeletricamente foram lavadas com água destilada, centrifugadas, liofilizadas e, então, armazenadas sob refrigeração.

Acetilação do isolado proteico

O método descrito por Groninger¹⁵ foi usado para a acetilação do isolado proteico. Amostras foram solubilizadas em água destilada e ajustadas ao pH 8,5 com hidróxido de sódio 1,0 M em baixa temperatura (2-4 °C). O teor proteico de cada amostra, após a solubilização, foi considerado para definir a quantidade de anidrido acético a ser adicionado em diferentes níveis: 5, 10 e 15% (v/p) de proteína. Alíquotas de volumes iguais do reagente foram adicionadas lentamente sob constante agitação no período de uma hora. O pH foi mantido entre 8,0 e 8,5 pela adição de hidróxido de sódio

1,0 M para que apenas o ϵ -amino grupo da lisina seja modificado. A reação foi considerada completa quando o pH se manteve estabilizado (pH 8,0). Após a acilação, as proteínas foram precipitadas isoeleticamente (pH 4,5) com ácido clorídrico 1,0 M e centrifugadas em centrífuga refrigerada a 1.600 x G por 30 minutos. Os precipitados obtidos foram lavados com água destilada para remoção do excesso de reagente remanescente da modificação, recuperados por centrifugação refrigerada (1.600 x G por 30 minutos) e liofilizados.

Extensão de Modificação

O grau de modificação das proteínas da munguba acetiladas foi determinado colorimetricamente de acordo com o método de Beckwith, Paulis e Wall¹⁶, pela avaliação da lisina disponível como derivados coloridos da reação com ninidrina, produzidos num sistema dimetil sulfóxido (DMSO). A absorvância foi medida a 580 nm. A diferença da absorvância entre os derivados DMSO de isolados proteicos modificados em diferentes níveis e o isolado não modificado foi usada como índice do grau de modificação química para acetilação.

PROPRIEDADES FUNCIONAIS

Solubilidade

A solubilidade da proteína foi determinada de acordo com Dench, Rivas e Caygill¹⁷. Amostras equivalentes a 100 mg foram dispersas em 20,0 mL de água destilada. O pH foi ajustado em valores de 2,0 - 10,0 com ácido clorídrico 1,0 M e hidróxido de sódio 1,0 M, sob agitação contínua, em agitador magnético por 30 minutos. As suspensões obtidas foram transferidas quantitativamente para tubos de ensaio graduados e centrifugados a 4.000 x G, por 30 minutos. O conteúdo de proteínas dissolvidas no sobrenadante foi determinado pelo método de Biureto¹⁴.

Capacidade de Absorção de Água e Óleo

A capacidade de absorção de água e óleo foi determinada utilizando o método descrito por Beuchat¹⁸. Amostras equivalentes a 0,25 g em proteínas foram pesadas em tubos de centrífuga graduados. Um volume de 2,5 mL de água destilada ou óleo de soja (marca SOYA, BUNGE ALIMENTOS S.A.) foi acrescentado com subsequente agitação por 1 minuto, em agitador de tubos, até formação de suspensão. Após 30 minutos, com agitações ocasionais, os tubos foram centrifugados a 2.750 x G por 10 min. Os volumes sobrenadantes resultantes

em cada tubo foram medidos. O resultado foi expresso como mL de água ou óleo retido por grama de proteína.

PROPRIEDADES EMULSIFICANTES

Capacidade Emulsificante

A capacidade emulsificante foi determinada usando os métodos descritos por Kato et al.¹⁹ Dispersões das amostras foram preparadas utilizando quantidades equivalentes a 1,0 mg proteínas/mL de água destilada. Sob agitação contínua, em agitador magnético, na temperatura ambiente, o pH foi ajustado para valores de 3,0, 5,0, 7,0 e 9,0 com ácido clorídrico 1,0 M e hidróxido de sódio 1,0 M. Após o equilíbrio ser atingido em cada um desses níveis de pH, prorrogou-se o tempo de agitação por 30 min. Volumes de 50 mL das dispersões foram transferidos para o copo de vidro emulsificador, equipado com eletrodos conectados a um multímetro para registro de corrente elétrica. Em seguida, as dispersões foram agitadas a 10.000 rpm com óleo de soja adicionado em fluxo contínuo (22 mL/minuto) de um balão de separação graduado. A quantidade de óleo necessária para que ocorra a inversão da emulsão, acusada no registrador por queda brusca na corrente elétrica, foi utilizada para a determinação da quantidade de óleo necessária para promover a emulsificação. O resultado foi expresso em mL óleo/100 mg proteínas.

Atividade e Estabilidade da Emulsão

A atividade e a estabilidade de emulsão foram determinadas de acordo com o método descrito por Yasumatsu, Sawada e Moritaka²⁰. Dispersões das amostras de 20 mL foram preparadas utilizando quantidades de 25 mg proteínas /mL água destilada, equilibradas em pH 3,0, 5,0, 7,0 e 9,0, com ácido clorídrico 1,0 M e hidróxido de sódio 1,0 M, sob agitação contínua, em agitador magnético, em temperatura ambiente. Após o equilíbrio ser atingido em cada um desses níveis de pH, procedeu-se a prorrogação do tempo de agitação por 30 minutos. As dispersões foram transferidas para o copo de vidro do emulsificador e 20,0 mL de óleo de soja foram adicionados em seguida. A emulsão, formada a 10.000 rpm durante 1 minuto de agitação, foi transferida rapidamente para tubos de centrífuga e estes centrifugados a 2.750 x G durante 5 minutos. O resultado da atividade de emulsão foi expresso como percentual de emulsão formada no volume total através da equação:

$$A. E (\%) = \frac{\text{Altura da camada emulsificada}}{\text{Altura do conteúdo total}} \times 100$$

A estabilidade de emulsão foi avaliada utilizando a equação acima, após aquecimento da emulsão a 80 °C por 30 minutos, resfriamento em gelo por 15 minutos e centrifugação a 2.750 x G por 5 minutos nos mesmos tubos que continham a emulsão formada na avaliação da atividade de emulsão.

Viscosidade

Dispersões de proteínas foram preparadas nas concentrações de 1, 2 e 3% (p/v). O pH das soluções proteicas foi ajustado para 12 para solubilização das proteínas com agitação, em agitador magnético. Após o equilíbrio ser atingido nesse nível de pH, procedeu-se a prorrogação do tempo de agitação por 30 minutos. A medida da viscosidade foi feita usando um viscosímetro de Ostwald em temperatura ambiente (29 °C) e após aquecimento (90 °C) por 15 minutos. A viscosidade foi expressa como viscosidade relativa.

Análise Estatística

Os resultados foram submetidos à análise estatística com observação das médias e desvios-padrão de 3 repetições cada. Os dados relativos às propriedades funcionais dos isolados proteicos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), com as diferenças significativas determinadas pelo teste de Tukey. O nível de probabilidade de erro (p) considerado foi menor que 5%, com o auxílio do programa *SPSS 14.0 for Windows Evaluation Version 2*, de acordo com o método descrito por Maroco²¹.

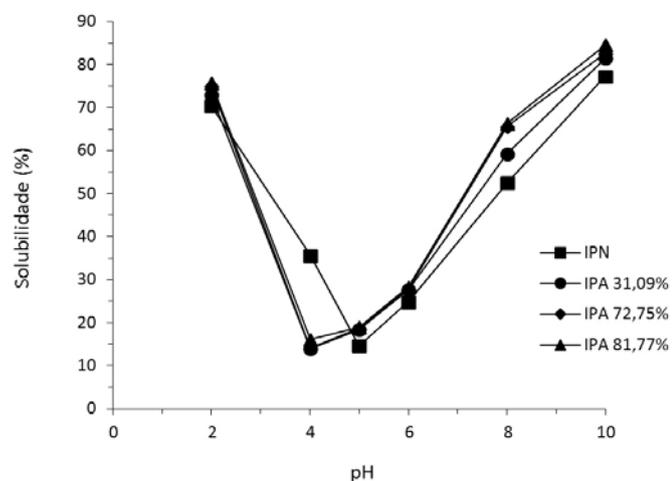


Figura 1. Perfil de solubilidade do isolado proteico nativo (IPN) e acetilato (IPA) de amêndoas de munguba em função dos valores de pH entre 2 e 10

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Extensão da Modificação

Os resultados demonstraram que a extensão da lisina modificada (31,09; 72,75 e 81,77%) aumentou na medida em que se ampliaram as concentrações do anidrido acético, respectivamente em 5, 10 e 15%. A extensão da modificação é essencial para se conseguir as desejadas propriedades funcionais no isolado proteico,^{22,23} o qual depende adicionalmente da acessibilidade aos grupos aminos da proteína para que ocorra a reação química²⁴. Resultados semelhantes foram obtidos por Wanasundara e Shahidi²⁵, com a semente de linho, que encontraram uma extensão de modificação com anidrido acético de 47,4; 70,0 e 84,5%, e por Ramos e Bora⁸, com a castanha-do-pará (58,6; 66,2 e 75,3%).

Solubilidade

Verifica-se na Figura 1 para os derivados acetilados uma solubilidade mínima em pH 4,0, que corresponde a seu ponto isoelétrico (pI). Considerando, ainda, uma redução da solubilidade com o aumento do pH até alcançar seu ponto isoelétrico. A partir deste ponto, observou-se um aumento progressivo da solubilidade para os isolados acetilados, ultrapassando no pH 5,0 a solubilidade do isolado proteico nativo da munguba. As maiores solubilidades foram registradas nos extremos de pH (2,0 e 10,0).

A maior solubilidade encontrada em extremos de pH (ácido e alcalino) para os derivados acetilados se deve à predominância de cargas positivas ou negativas, resultando em forte interação entre a proteína e as moléculas de água, assim como também uma maior repulsão eletrostática, proporcionando um aumento da solubilidade. Os derivados acetilados melhoraram a solubilização do isolado nativo da munguba na faixa de pH de 5,0-10,0. Isso se deve a uma combinação da repulsão da carga intra e intermolecular que promoveu desdobramento da proteína e produziu menos interações proteína-proteína e mais interações proteína-água. Resultados semelhantes à munguba foram encontrados por Lawal, Adebawale e Adebawale²⁶; Ramos e Bora⁸; El-Adawy⁷; Gruener e Ismond²⁷.

Capacidade de Absorção de Água e de Óleo

Os resultados das capacidades de absorção de água (CAA) e óleo (CAO) do isolado proteico nativo da munguba e dos modificados por acetilação encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. Capacidades de absorção de água (CAA) e óleo (CAO) do isolado proteico nativo da munguba (IPN) e dos modificados por acetilação (IPA)

Modificação	Grau de Modificação (%)	CAA (mL H ₂ O/g proteína)	CAO (mL óleo/g proteína)
IPN	0	1,49 b ± 0,02	2,37 c ± 0,03
	31,09	1,63 ab ± 0,04	2,72 b ± 0,03
IPA	72,75	1,71 a ± 0,06	2,81 ab ± 0,07
	81,77	1,72 a ± 0,06	2,93 a ± 0,05

Resultados das análises com média de três repetições (± desvio-padrão). Médias seguidas pela mesma letra (na coluna) não diferem pelo teste de Tukey a 5%

Observou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) de 14,77 e 15,44%, respectivamente, no valor da absorção de água para o isolado modificado por acetilação nas seguintes extensões de modificações 72,75 e 81,77% em comparação ao isolado nativo da munguba. A acilação pode causar dissociação e desdobramento das moléculas proteicas, passando a expor grupos mais hidrofílicos que hidrofóbicos, aumentando, assim, os lados hidrófilos para a ligação com a água⁷. De acordo com Beuchat¹⁸, o desdobramento de moléculas de proteína intensificaria a entrada de água, enquanto a dissociação de proteína em subunidades aumentaria potencialmente os locais de ligação com a água. O aumento na capacidade de absorção de água após a acetilação foi reportado para o feijão⁷, aveia²⁸, soja²⁹ e folha de tabaco³⁰.

Os resultados alcançados para a capacidade de absorção de óleo nos isolados proteicos acetilados mostraram um aumento significativo, respectivamente, de 14,77, 18,57 e 23,63% em relação ao isolado nativo em todos os níveis de modificações. O mecanismo de absorção do óleo de uma proteína foi principalmente sugerido como a retenção física de óleo pelas proteínas, sendo a mesma influenciada pela sua hidrofobicidade³¹. O aumento na capacidade de absorção de óleo para o isolado acetilado pode ser atribuído ao fato de que a acetilação leva à introdução de grupos de lipofílicos nas moléculas de proteína³². Melhorias na capacidade de absorção de óleo após acetilação foram também informadas para as proteínas do feijão⁶, amendoim¹¹, e algodão³³.

PROPRIEDADES EMULSIFICANTES

Capacidade Emulsificante

A capacidade emulsificante do isolado proteico nativo da munguba e dos modificados por acetilação está apresentada na Figura 2.

A capacidade de emulsão geralmente segue o perfil de solubilidade, variando em função do pH, como foi observado neste estudo. Aumentos significativos foram encontrados nas capacidades emulsificantes para os isolados acetilados em pH 7 e 9 em relação ao isolado nativo. No pH 5,0 houve apenas um aumento significativo de 31,08% na maior extensão de modificação (81,77%), enquanto em pH 3,0, os derivados acetilados não apresentaram melhoria em comparação ao isolado nativo. O maior percentual de óleo emulsificado no pH 7,0 (145,15 mL óleo/100 mg) correspondeu a um aumento de 53,58%. O maior percentual de óleo emulsificado encontrado para o isolado acetilado em pH 9,0 (176,11 mL óleo/100 mg) correspondeu a um aumento de 72,37%, em comparação à proteína nativa.

O aumento da capacidade emulsificante observado na acetilação dos isolados proteicos da munguba pode

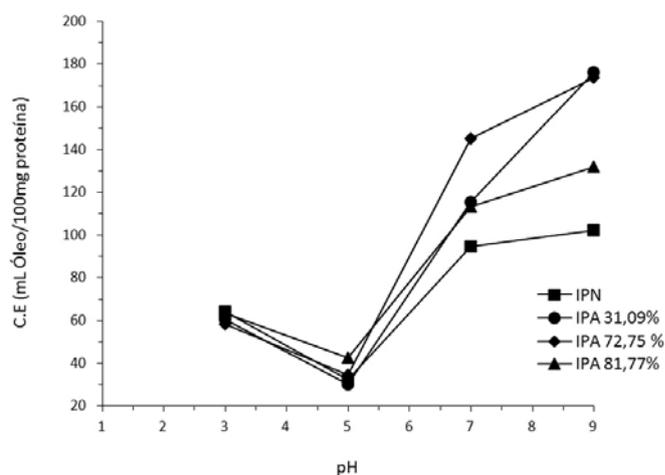


Figura 2. Capacidade de emulsificação do isolado proteico nativo (IPN) e acetilato (IPA) de amêndoas de munguba em função dos valores de pH entre 3,0; 5,0; 7,0 e 9

Tabela 2. Atividade emulsificante do isolado proteico nativo da munguba e dos modificados por acetilação

Isolado Proteico	Atividade Emulsificante (%)			
	pH 3,0	pH 5,0	pH 7,0	pH 9,0
Nativo	46,88 ± 1,33 a	6,23 ± 0,31 b	53,57 ± 1,00 b	62,70 ± 1,37 a
Acetilado 31,09%	46,61 ± 1,82 a	6,37 ± 0,32 ab	57,55 ± 1,20 a	63,12 ± 0,86 a
Acetilado 72,75%	44,12 ± 0,78 ab	7,45 ± 0,39 ab	57,62 ± 0,83 a	63,07 ± 0,59 a
Acetilado 81,77%	43,78 ± 0,86 b	7,55 ± 0,35 a	58,04 ± 0,90 a	62,88 ± 0,89 a

Resultados das análises com média de três repetições (± desvio-padrão). Médias seguidas pela mesma letra (na coluna) não diferem pelo teste de Tukey a 5%

Tabela 3. Estabilidade da emulsão do isolado proteico nativo da munguba e dos modificados por acetilação

Isolado Proteico	Estabilidade da Emulsão (%)			
	pH 3,0	pH 5,0	pH 7,0	pH 9,0
Nativo	42,03 ± 1,19 a	5,64 ± 0,30 c	51,65 ± 1,18 bc	60,30 ± 1,25ab
Acetilado 31,09%	41,50 ± 0,75 a	6,08 ± 0,29 bc	51,97 ± 0,87 bc	62,38 ± 1,08 a
Acetilado 72,75%	42,28 ± 1,08 a	6,87 ± 0,32 ab	54,46 ± 1,15 ab	58,79 ± 1,25 b
Acetilado 81,77%	42,66 ± 1,08 a	7,20 ± 0,27 a	55,67 ± 1,15 a	62,11 ± 0,80 a

Resultados das análises com média de três repetições (± desvio-padrão). Médias seguidas pela mesma letra (na coluna) não diferem pelo teste de Tukey a 5%

ocorrer em razão do desdobramento das moléculas de proteína, promovido pela acilação das moléculas proteicas, aumentando, assim, a exposição de resíduos lipofílicos e hidrofílicos para a interfase óleo-água, promovendo a redução da tensão de superfície e evitando a coalescência das gotículas de óleo. O menor aumento nas capacidades emulsificantes na região do ponto isoelétrico se deve ao fato de que é nessa região que se tem a menor solubilidade das proteínas e a maior interação proteína-proteína, resultando em baixa hidrofobicidade de superfície. Silva, Bora e Neto¹⁰ reportaram para as sementes de algaroba acetiladas um acentuado aumento na capacidade de emulsificação no pH 3,0, um decréscimo no pH 5,0 e aumento progressivo nos pHs 7,0 e 8,0. Já Ramos e Bora⁸ relataram uma diminuição em pH 3,0 e aumentos em pHs 5,0, 7,0 e 9,0 com o aumento do grau de modificação.

Atividade e Estabilidade da Emulsão

A atividade e estabilidade da emulsão do isolado proteico nativo da munguba e dos modificados por

acetilação estão apresentados, respectivamente, nas Tabelas 2 e 3.

A atividade e a estabilidade emulsificante foram mínimas no pH 5,0. Os maiores valores obtidos para atividade e estabilidade emulsificante foram nos lados ácidos e básicos desse pH. Pôde-se verificar que houve um aumento significativo de 21,19% na atividade emulsificante do isolado acetilado no pH 5,0, no seu maior grau de modificação (81,77%). Nesse mesmo pH, houve um incremento na estabilidade emulsificante de 21,80 e 27,66%, respectivamente, com o isolado acetilado a 72,75 e 81,77%. No pH 7,0, a atividade emulsificante foi melhorada pela acetilação em todas as extensões de modificação, sendo o maior percentual de aumento verificado (8,34%) no seu maior grau de modificação e a estabilidade melhorada neste mesmo pH em 7,78%, também no seu maior grau de modificação. Observou-se, ainda, que a atividade e a estabilidade emulsificante do isolado nativo não foram melhoradas após a acetilação nos pHs 3,0 e 9,0. A atividade e a estabilidade da emulsão

encontrada seguiram um comportamento semelhante com a capacidade emulsificante, sofrendo influência da solubilidade, hidrofobicidade de superfície e flexibilidade molecular. Encontramos resultados semelhantes para as proteínas do linho²⁵, canola²⁷, ervilha⁵ e feijão⁶.

Viscosidade

Os resultados referentes à viscosidade relativa do isolado proteico nativo indicam que houve um aumento da viscosidade com o aumento da concentração da solução proteica em 1, 2 e 3%. O maior valor encontrado para a viscosidade foi 2,51 na temperatura ambiente e em sua maior concentração (3%). Pôde-se observar ainda que após o aquecimento a 90 °C, o isolado nativo sofreu pouca alteração em sua viscosidade.

Verificou-se que semelhantemente ao isolado proteico nativo houve um aumento da viscosidade relativa dos isolados proteicos acetilados com o crescimento da concentração proteica. Observou-se um aumento significativo de 11,68 e de 5,58% na viscosidade relativa da proteína acetilada na temperatura ambiente e na menor extensão do isolado acetilado (31,09%), na concentração de proteína de 1 e 3%, respectivamente. Uma diminuição da viscosidade relativa das amostras foi observada após o aquecimento a 90 °C.

De acordo com Cheftel, Cuq e Lorient³⁴, a viscosidade da maior parte dos fluidos proteicos aumenta exponencialmente com a concentração proteica, estando em concordância aos relatos deste estudo. Relatos similares foram apresentados por Sze-Tao e Sathe³⁵, Dua, Mahajan e Mahajan³⁶.

CONCLUSÃO

As propriedades funcionais das proteínas de amêndoas da munguba modificadas por acetilação foram caracterizadas neste estudo. Os perfis de solubilidade mostraram-se dependentes da variação de pH. A modificação química melhorou a solubilidade do isolado nativo tanto no seu ponto isoelétrico (pI) como na região alcalina, sendo apropriado para o uso em produtos de padaria, massas em geral e alimentos semissólidos. As capacidades de absorção de água e do óleo do isolado proteico nativo da munguba foram melhoradas após a modificação, sendo indicadas em alimentos como sopas e carnes. Os resultados obtidos na acetilação das propriedades emulsificantes favorecem a sua utilização em alimentos com alto desempenho de emulsificação do

óleo, como salsichas e maionese. A viscosidade relativa aumentou com o aumento da concentração da solução proteica. As mudanças na funcionalidade da proteína da amêndoa de munguba acetilada sugerem, pois, o seu aproveitamento como uma nova fonte de ingrediente proteico na indústria de alimentos.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Universidade Federal da Paraíba (UFPB) pela utilização dos Laboratórios do Departamento de Tecnologia Química e de Alimentos (DTQA) do Centro de Tecnologia e a todos que contribuíram na realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Ribeiro EP, Seravalli EA. G. Química de Alimentos. 2ª ed. São Paulo (SP): Edgard Blucher; 2007.
2. Tang CH. Functional properties and in vitro digestibility of buckwheat protein products: Influence of processing. *J Food Eng*. 2007; 82(4): 568-76.
3. Aluko R, Yada RY. Structure–function relationships of cowpea (*Vigna unguiculata*) globulin isolate: influence of pH and NaCl on physicochemical and functional properties. *Food Chem*. 1995; 53(3): 259-65.
4. Onweluzé JC, Obanu ZA, Onuoha KC. Functional properties of some lesser-known tropical legumes. *J Food Sci Technol*. 1994; 13:302-06.
5. Johnson EA, Brekke J. Functional properties of acylated pea protein isolates. *J Food Sci*. 1983; 48: 722-5.
6. Lawal OS, Adebawale KO. The acylated protein derivatives of *Canavalia ensiformis* (jack bean): A study of functional characteristics. *LWT*. 2006; 39(8): 918-29.
7. El-Adawy TA. Functional properties and nutritional quality of acetylated and succinylated mung bean protein isolate. *Food Chem*. 2000; 70(1): 83-91.
8. Ramos CMP, Bora PS. Functional characterization of acetylated brazil nut (*Bertholletia excelsa* HBK) kernel globulin. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2004; 24(1): 134-8.
9. Liu LH, Hung TV. Functional properties of acetylated chickpea proteins. *J Food Sci*. 1998; 63: 331-7.
10. Silva JB, Bora OS, Neto V. Caracterização de propriedades funcionais do isolado protéico de semente de algaroba (*Prosopis juliflora*) modificado por acetilação. *Ciênc Tecnol Aliment*. 1997; 17(3): 263-9.
11. Monteiro PV, Prakash V. Alteration of functional properties of peanut (*Arachis hypogaea* L) protein fractions by chemical and enzymatic modifications. *J Food Sci*. 1996; 33(1): 16-9.
12. Oliveira JTA, Vasconcelos IM, Bezerra LCNM, Silveira SB, Monteiro ACO, Moreira RA. Composition and nutritional properties of seeds from *Pachira aquatica* Aubl, *Sterculia striata* StHil et Naud and *Terminalia catappa* Linn. *Food Chem*. 2000; 70(2): 185-91.

13. Koyoro H, Powers JR. Functional properties of peas globulin fractions. *Cereal Chem*. 1987; 64(2): 97-101.
14. Gornall AG, Bordawill CS, David M M. The determination of protein by the biuret reaction. *J Biol Chem*. 1949; 177:751-80.
15. Groninger HS. Preparation and Properties of Succinylated Fish Myofibrillar Protein. *J Agr Food Chem*. 1973; 21(6): 978-81.
16. Beckwith AC, Paulis JW, Wall JS. Direct estimation of lysine in corn meals by the ninhydrin color reaction. *J Agr Food Chem*. 1975; 23(2): 194-6.
17. Dench JE, Rivas RN, Caygill JC. Selected functional properties of sesame (*Sesamum indicum* L.) flour and two protein isolates. *J Sci Food Agr*. London. 1981; 32(6): 557-64.
18. Beuchat LR. Functional and electrophoretic characteristics of succinylated peanut flour protein. *J Agr Food Chem*. 1977; 25(2): 258-61.
19. Kato A, Takahashi A, Matsudomi N, Kobayashi K. Determination of emulsifying properties of some proteins by conductivity measurements. *J Food Sci*. 1985; 50(1): 50-62.
20. Yasumatsu K, Sawada K, Moritaka S. Whippings and emulsifying properties of soy bean products. *Agr Biol Chem*. 1972; 35(5):719-27.
21. Maroco J. Análise estatística – com utilização do SPSS. Lisboa: Ed. Sílabo; 2003.
22. Paulson AT, Tung MA. Emulsification properties of succinylated canola protein isolates. *J Food Sci*. 1998; 53(3): 818-20.
23. Krause JP, Schwenke KD. Relationship between adsorption and emulsifying properties of acetylated protein isolates from faba beans (*Vicia faba* L.). *Nahrung*. 1996; 40: 12-7.
24. Krause JP. Comparison of the effect of acylation and phosphorylation on surface pressure, surface potential and foaming properties of protein isolates from rapeseed (*Brassica napus*). *Ind Crop Prod*. 2002; 15(3): 221-8.
25. Wanasundara PKJP.; Shahidi, F. Functional Properties of Acylated Flax Protein Isolates. *J Agr Food Chem*. 1997; 45(7): 2431-41.
26. Lawal OS, Adebawale KO, Adebawale YA. Functional properties of native and chemically modified protein concentrates from bambarra groundnut. *Food Res Int*. 2007; 40(8): 1003-11.
27. Gruener LE, Ismond MA. H. Effects of acetylation and succinylation on the functional properties of the canola 12s globulin. *Food Chem*. 1997; 60(3): 357-63.
28. Ponnampalam R, Goulet G, Amiot J, Chamberland B, Brisson G J. Some functional properties of acetylated and succinylated oat protein concentrates and a blend of succinylated oat protein and whey protein concentrates. *Food Chem*. 1988; 29: 109-18.
29. Fernández-Quintela A, Macarulla MT, Del Barrio AS, Martínez JA. Composition and functional properties of protein isolates obtained from commercial legumes grown in northern Spain. *Plant Foods for Human Nutr*. 1997; 51: 331-42.
30. Sheen SJ. Effect of succinylation on molecular and functional properties of soluble tobacco leaf proteins. *J Agr Food Chem*. 1991; 39(6): 1070-4.
31. Wang JC, Kinsella E. Functional properties of novel proteins, alfa-alfa leaf proteins. *J Food Sci*. 1976; 41: 286-92.
32. Narayana K, Narasinga Rao, MS. Effect of acetylation and succinylation on the functional properties of winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus*) flour. *J Food Sci*. 1984; 49: 547-50.
33. Choi YR, Lusas EW, Rhee KW. Succinylation of cotton seed flour. Effect on functional properties of protein isolates prepared by modified flour. *J Food Sci*. 1981; 46: 954 -5.
34. Cheftel JC, Cuq JL, Lorient D. Proteínas alimentares: bioquímica, propiedades funcionais, valor nutritivo e modificações químicas. Zaragoza: Acribia; 1989. 339 p.
35. Sze-Tao KWC, Sathe SK. Functional properties and in vitro digestibility of almond (*Prunus dulcis* L.) protein isolate. *Food Chem*. 2000; 69(2): 153-60.
36. Dua S, Mahajan A, Mahajan A. Improvement of functional properties of rapeseed (*Brassica campestris* Var. Toria) preparation by chemical modification. *J Agr Food Chem*. 1996; 44: 706-10.

Padronização da técnica de eletroforese de isoenzimas para certificação de linhagens celulares

Standardization of isoenzymes electrophoresis technique for cell lines certification

RIALA6/1347

Ana Cristina Scarparo de MIRANDA, Cláudia Regina GONÇALVES, Tamiko Ichikawa IKEDA, Aurea Silveira CRUZ*

*Endereço para correspondência: Núcleo de Cultura de Células, Centro de Procedimentos Interdisciplinares, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, prédio da Virologia, 2º andar, Cerqueira César, São Paulo, SP, Brasil, CEP 01246-902, e-mail: auracruz@ial.sp.gov.br

Recebido: 05.10.2010 – Aceito para publicação: 03.03.2011

RESUMO

A comprovação da espécie de origem é um dos itens da certificação de linhagens celulares, que pode ser feita por meio de técnica de eletroforese de isoenzimas. Com o objetivo de padronizar essa técnica, o grupo de estudo do Núcleo de Cultura de Células do IAL utilizou extratos celulares de diferentes espécies animais, que foram submetidos à eletroforese horizontal ou vertical em géis de poliacrilamida ou agarose, 100 V e 4 °C. A revelação das bandas para a enzima glicose 6-fosfato desidrogenase foi realizada com o auxílio de sais de tetrazólio. Observou-se a presença de uma única banda para cada linhagem celular testada, com os padrões de migração esperados para as diferentes espécies utilizadas, com exceção da linhagem bovina MDBK, que não apresentou uma das bandas, provavelmente em função de menor expressão dessa enzima. Após a avaliação dos resultados obtidos com os diferentes sistemas de eletroforese e géis testados, optou-se pelo uso de eletroforese horizontal em géis de agarose a 2%. A padronização e a implantação dessa técnica permitirão que o laboratório forneça linhagens celulares com o devido controle de qualidade.

Palavras-chave. isoenzimas, linhagens celulares, caracterização celular, contaminação cruzada.

ABSTRACT

The evidence of the species origin has been a crucial characteristic for cell line certification, which can be performed by isoenzymes electrophoresis. Aiming at standardizing the isoenzyme electrophoresis technique at the Cell Culture Nucleus of IAL, cell extracts from different animal species were investigated on horizontal or vertical electrophoresis using polyacrylamide or agarose gels, 100 V at 4°C. The glucose-6-phosphate dehydrogenase staining was carried out using tetrazolium salts. A single band for each tested cell line was detected, with the expected migration pattern for the different animal species used, excepting the bovine cell line MDBK which did not show one of the bands, probably due to low enzyme expression. After analyzing the results from different electrophoretic systems and gels testing, the horizontal electrophoresis with 2% agarose gels showed the best performance. This technique standardization and implementation will turn the laboratory be feasible in providing cell line with high quality control.

Keywords. isoenzymes, cell line, cellular characterization, cross contamination.

INTRODUÇÃO

As técnicas de culturas celulares permitiram grande avanço no desenvolvimento científico de várias áreas, mas a ocorrência de contaminação cruzada entre diferentes linhagens pode invalidar todo o resultado dos estudos que utilizam essas células. Os primeiros relatos de contaminação cruzada ocorreram nas décadas de 60-70 e estimativas recentes sugerem que 20 a 36% das linhagens celulares disponíveis possam estar contaminadas com outras¹⁻², o que vem sendo confirmado em diversas publicações³⁻⁵. Com o intuito de evitar esse problema, recomenda-se que os laboratórios utilizem apenas linhagens celulares certificadas, adquiridas de bancos de células reconhecidos que se responsabilizam pela caracterização das células¹⁻².

Um dos itens da certificação celular é a comprovação da espécie de origem da linhagem, que pode ser feita pela análise de isoenzimas por eletroforese. Essa técnica inicialmente era feita em géis de amido⁶⁻⁸, depois substituídos por um kit comercial (*Authentikit™ system*, Innovative Chemistry)⁹, o qual vem sendo utilizado por bancos de células internacionais¹⁰. No entanto, sua aquisição é difícil e os custos são altos, inviabilizando seu uso na rotina do laboratório.

O objetivo deste trabalho é a padronização e implantação da técnica de eletroforese de isoenzimas, utilizando géis de agarose ou poli(acrilamida), para a certificação das linhagens pertencentes ao acervo do Núcleo de Cultura de Células do Instituto Adolfo Lutz, as quais são fornecidas a diversos laboratórios do país, tanto para uso em pesquisa como no diagnóstico.

MATERIAIS E MÉTODOS

Linhagens celulares

Foram utilizadas as linhagens celulares: NCTC clone 929 (tecido conjuntivo de camundongo, ATCC CCL-1), HeLa (carcinoma de cervix humana, ATCC CCL-2), RD (rabdiosarcoma embrionário humano, ATCC CCL-136), SIRC (córnea de coelho, ATCC CCL-60) e MDBK (rim bovino, ATCC CCL-22).

Essas células foram mantidas em estufa a 37 °C, na ausência de antibióticos. As linhagens celulares NCTC clone 929, HeLa e MDBK foram cultivadas em meio mínimo essencial de Eagle em solução salina balanceada de Earle, 0,1 mM de aminoácidos não essenciais, 1 mM de piruvato de sódio e 10% de soro fetal bovino (SFB); as linhagens RD e SIRC foram cultivadas em partes iguais

de meio mínimo essencial de Eagle em solução salina balanceada de Earle e meio L-15, com 15% de SFB.

Preparo dos extratos celulares

Cada linhagem celular foi cultivada em garrafas de 25 ou 75 cm² por 2 a 8 dias. Com a monocamada formada, as células foram tripsinizadas, ressuspensas em volume conhecido de meio de cultura e a concentração ajustada para obter 1-3 x 10⁷ células. Esta suspensão celular foi centrifugada a 150 x g por 5 min a 8 °C e o sedimento lavado por 2 vezes com PBS (Solução Fosfatada Tamponada) gelada, seguido de centrifugação como descrito acima. As células foram ressuspensas em 200 µL de tampão de extração (2% de Triton X-100 em 50 mM de Tris e 1 mM de EDTA, pH 7,5 ± 0,1) e deixadas em gelo durante 20-30 min para lise. O extrato foi centrifugado a 1.900 x g por 5 min a 8 °C, aliqüotado e armazenado em freezer -70 °C até o uso (protocolo adaptado de *Laboratory Procedures for Animal and Human Cell Lines*¹¹).

Eletroforese da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PD)

Os extratos celulares com solução de azul de bromofenol 0,015%/glicerol 2,5% (1-5 µL) foram submetidos à eletroforese em sistema horizontal LCV 7x8 (Loccus do Brasil), em géis de agarose ou poli(acrilamida). Géis de agarose (Ultrapure™ Agarose, Invitrogen) foram preparados nas concentrações 1 ou 2% em tampão Tris (Invitrogen) 0,375 M, pH 8,8 ± 0,1. Géis de poli(acrilamida) foram preparados nas concentrações 5 ou 7,5% (razão de acrilamida:bis-acrilamida 38,4:1) em tampão Tris 0,375 M, pH 8,8 ± 0,1, persulfato de amônio 0,06% e N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina 0,07% (TEMED). Neste caso, para obter uma polimerização uniforme foi utilizada uma placa de acrílico sobre o gel, deixando apenas a região do pente descoberta, que foi fechada pela adição de uma camada de água para isolar do contato com ar. O tampão de corrida utilizado foi Tris 25 mM/glicina (Invitrogen) 192 mM, pH 8,3 ± 0,1. As eletroforeses foram realizadas a 100 V e 4 °C, por 1:40 h (agarose) ou 2:30 h (poli(acrilamida)), com a adição de 1 mL de β-nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (β-NADP, Sigma Chemical Co.) 10 mg/mL ao tampão de corrida, no lado do cátodo.

Após a corrida, os géis foram incubados por cerca de 10 ou 30 min (agarose ou poli(acrilamida), respectivamente) a 37 °C no escuro, em solução

reveladora contendo glicose 6-fosfato 2,5 mM (Sigma Chem. Co.), Tris 0,05 M pH 7,5 ± 0,1, MgCl₂.6H₂O 0,01 M, β-NADP 0,5 mM, MTT (3-(4'-5'-dimetiltiazol-2-yl)-2,4-difeniltetrazólio brometo, Sigma Chem. Co.) 0,1 mg/mL e PMS (fenazine metossulfato, Sardi) 0,04 mg/mL (protocolo modificado de Hay et al.⁸). Ao final, os géis foram lavados em água destilada e os resultados registrados por fotografia.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A eletroforese de isoenzimas permite a identificação da espécie de origem das linhagens celulares através da comparação do padrão de migração das bandas obtidas em relação às células utilizadas como padrão e controle do ensaio, NCTC clone 929 e HeLa, respectivamente⁸. Para a enzima G6PD, a maioria das espécies apresenta apenas uma isoforma⁶⁻⁸. Uma exceção é a espécie humana, com duas isoformas, A e B, sendo que o tipo A migra mais rapidamente e está presente nas células HeLa¹².

Nossos resultados, utilizando géis horizontais de agarose ou poliacrilamida, mostraram a presença de uma banda em cada linhagem celular avaliada, que foi mais nítida nas maiores concentrações dos géis ensaiados (Figura 1). O padrão de migração foi o esperado para cada espécie (Figura 1). A única exceção foi a linhagem MDBK, de rim bovino, que apresentou apenas uma banda (Figura 1), enquanto vários autores mostraram a presença de duas bandas para esta espécie, ambas posicionadas acima da obtida na linhagem HeLa⁶⁻⁸. Mesmo após repetir a extração, aumentando a concentração de células e o volume de amostra aplicada, o resultado permaneceu o mesmo. Dados semelhantes foram encontrados com a mesma linhagem celular por outro grupo brasileiro¹³. Talvez a outra isoforma tenha menor expressão e, por isso, não foi detectada nessa linhagem, um fator que pode complicar a análise de isoenzimas⁸. Para evitar isso, a utilização de ao menos 3-4 enzimas diferentes é recomendada na literatura^{9,14}. Além da MDBK, nas células RD foi necessário ajustar o volume do extrato aplicado ao gel para que as bandas pudessem ser detectadas com intensidade próxima à obtida nas demais, sugerindo que as linhagens RD e MDBK possam apresentar uma menor expressão de G6PD (Figura 1).

Diversas variações na metodologia foram avaliadas para a padronização da técnica em nosso laboratório. No preparo dos extratos celulares foram

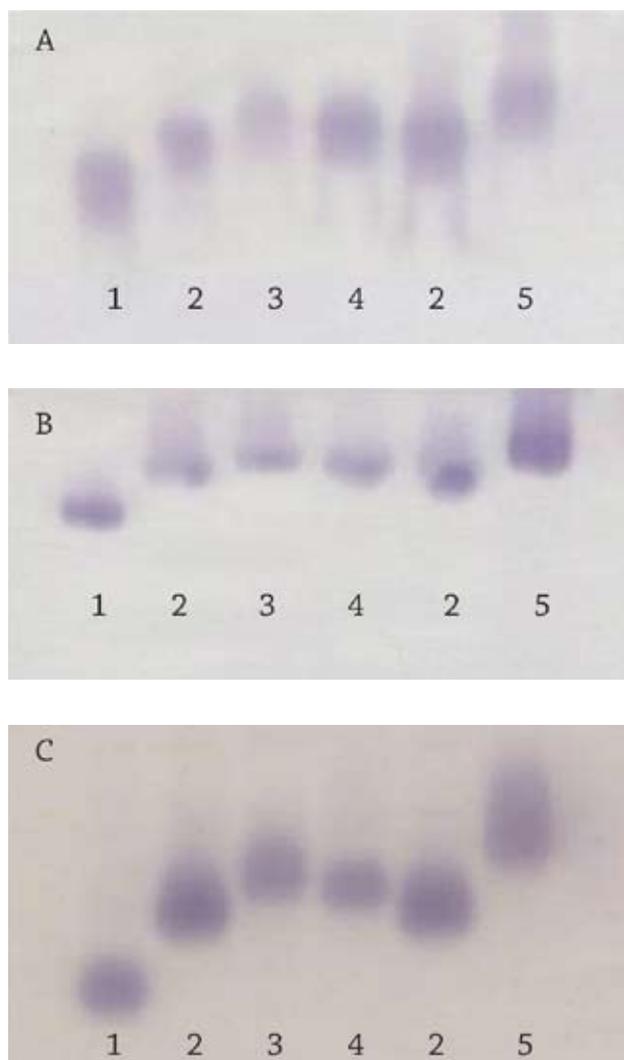


Figura 1. Resultados da eletroforese horizontal para G6PD em diversas linhagens celulares, em géis de poliacrilamida 5% (1A), 7,5% (1B) ou agarose 2% (1C) em tampão Tris 25 mM/ glicina 192 mM. Linhagens celulares: NCTC clone 929 (1), HeLa (2), RD (3), SIRC (4) e MDBK (5)

utilizados outros dois protocolos, de rompimento das células por congelamento e descongelamento^{8,13}, para os quais foram obtidos resultados semelhantes. Analisamos, também, eletroforese vertical com gel de poliacrilamida nas concentrações 5, 7,5, 10 e 12% e observamos que as linhagens celulares mantinham as diferenças de migração esperadas entre as diversas espécies, porém cada banda apresentou-se subdividida em 3, muito próximas umas das outras e bem definidas (Figura 2A). Para esta observação não foi encontrado nenhum relato na literatura. Com géis verticais de agarose 1 ou 2% foi identificada uma única banda para cada espécie, mas todas tinham a mesma distância de migração (Figura 2B). Outra variação foi a

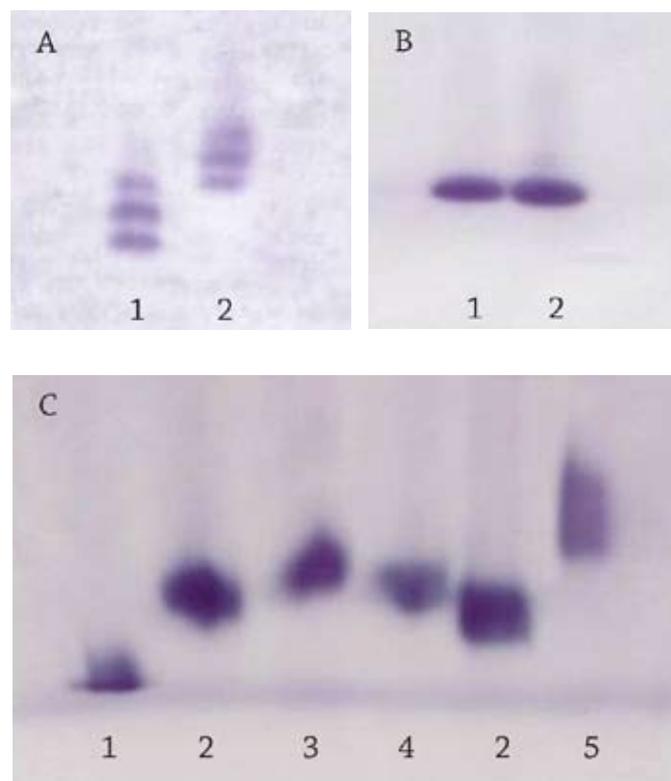


Figura 2. Resultados da eletroforese vertical para G6PD em diversas linhagens celulares, em géis de poliacrilamida 7,5% (2A), agarose 2% (2B) ou agarose 2% com glicerol 30% (2C) em tampão Tris 25 mM/glicina 192 mM. Linhagens celulares: NCTC clone 929 (1), HeLa (2), RD (3), SIRC (4) e MDBK (5)

adição de glicerol 15 ou 30% aos géis de agarose (protocolo modificado de Warren et al.¹⁵), permitindo identificar uma única banda para a G6PD em cada linhagem, as quais apresentaram o padrão de migração esperado para as espécies testadas (Figura 2C). Nessas condições, porém, as bandas obtidas foram menos definidas que nos ensaios feitos em sistema horizontal, um efeito aparentemente causado pela presença do glicerol.

Após observar os resultados obtidos e dada a maior praticidade na confecção e manipulação dos géis de agarose no sistema horizontal, pela rápida revelação das bandas e por não utilizar produtos tóxicos, optou-se pela utilização desse gel na rotina do laboratório. Essa técnica permitirá o maior controle de qualidade das nossas linhagens celulares, de acordo com os requisitos técnicos e científicos internacionais¹⁻².

REFERÊNCIAS

1. Masters JR, Thomson JA, Daly-Burns B, Reid YA, Dirks WG, Packer P et al. Short tandem repeat profiling provides an international reference standard for human cell lines. *PNAS*. 2001; 98 (14): 8012-7.
2. Nardone RM. Eradication of cross-contaminated cell lines: a call for action. *Cell Biol Toxicol*. 2007; 23 (6): 367-72.
3. American Type Culture Collection Standards Development Organization Workgroup ASN-0002. Cell line misidentification: the beginning of the end. *Nat Rev Cancer*. 2010; 10 (6): 441-8.
4. Barallon R, Bauer SR, Butler J, Capes-Davis A, Dirks WG, Elmore E et al. Recommendation of short tandem repeat profiling for authenticating human cell lines, stem cells, and tissues. *In: Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2010; 46(9): 727-32.
5. Capes-Davis A, Theodosopoulos G, Atkin I, Drexler HG, Kohara A, MacLeod RAF et al. Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines. *Int J Cancer* 2010; 127: 1-8.
6. Montes de Oca F, Macy ML, Shannon JE. Isoenzyme characterization of animal cell cultures. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1969; 132: 462-9.
7. O'Brien SJ, Shannon JE, Gail MH. A molecular approach to the identification and individualization of human and animal cells in culture: isozyme and allozyme genetic signatures. *In Vitro*. 1981; 16 (2): 119-35.
8. Hay RJ, Caputo J, Macy M. *ATCC quality control methods for cell lines*. 2nd ed. Rockville: American Type Culture Collection; 1992.
9. Nims RW, Shoemaker AP, Bauernschub MA, Rec LJ, Harbell JW. Sensitivity of isoenzyme analysis for the detection of interspecies cell line cross-contamination. *In: Vitro Cell Dev Biol - Animal* 1998; 34 (1): 35-9.
10. Nims RW, Herbstritt CJ. Cell line authentication using isoenzyme analysis. Strategies for accurate speciation and case studies for the detection of cell line cross-contamination using a commercial kit. *BioPharm Internacional* 2005; 12 (6). Disponível em: [<http://biopharminternational.findpharma.com/biopharm/article/articleDetail.jsp?id=166541&pageID=4>]
11. Laboratory Procedures for Animal and Human cell lines. Reference n° AHC/1998/3/3.1/2.2. Disponível em: [http://www.cabri.org/guidelines/animal/AHC_9833122.html]
12. Gartler SM. Apparent HeLa cell contamination of human heteroploid cell lines. *Nature*. 1968; 217 (5130): 750-1.
13. Fernandes MJB, Simoni IC. Caracterização de linhagens celulares: I- Identificação de espécies por análise isoenzimática. *Arq Inst Biol*. 1995; 62 (1/2): 59-63.
14. Stacey GN, Hoelzl H, Stephenson JR, Doyle A. Authentication of animal cell cultures by direct visualization of repetitive DNA, aldolase gene PCR and isoenzyme analysis. *Biologicals* 1997; 25: 75-85.
15. Warren CD, Krzesinski PR, Greaser ML. Vertical agarose gel electrophoresis and electroblotting of high-molecular-weight proteins. *Electrophoresis*. 2003; 24: 1695-702.

Enterobacteriaceae in processed cocoa products

Enterobactérias em produtos processados de cacau

RIALA6/1348

Maristela da Silva do NASCIMENTO^{1*}, Érika Marques REOLON¹, Aline Regina Barbosa SANTOS¹, Vanessa Eliana MOREIRA¹, Ivone Francisca da SILVA², Neusely da SILVA¹

*Endereço para correspondência: ¹Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, SP, Brasil, tel: 19 3743 1815, fax: 19 3743 1812, e-mail: mnascimento@ital.sp.gov.br.

²Departamento de Ciências de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP, Brasil.

Recebido: 22.03.2010 – Aceito para publicação: 24.02.2011

ABSTRACT

Little is known of the presence of *Salmonella* in Brazilian cocoa, which justifies the present work that had the aim of checking the presence of total *Enterobacteriaceae*, coliforms, *Escherichia coli* and *Salmonella* in semi-processed cocoa products. A total of 150 samples of cocoa products from two different cocoa-processing manufacturers were analyzed (30 samples of nibs, 30 of liquor, 30 of cocoa cake, 30 of cocoa butter and 30 of cocoa powder). The samples of processed cocoa products had pH values between 5.31 and 7.35, and water activity ranging from 0.29 to 0.52. *E. coli* and *Salmonella* were not detected in any of the samples analyzed. Regarding the other analyzed microorganisms, 17% of the nibs contained total *Enterobacteriaceae*, 20 % showed total coliforms, while thermotolerant coliforms were detected in one sample (0.6 log MPN/g). Seven percent of liquor and cocoa powder samples showed total coliforms. In cocoa cake, the same percentage in regard to total *Enterobacteriaceae* was observed. Total *Enterobacteriaceae* and total coliforms were detected in one sample of cocoa butter. Despite the low contamination observed, these results indicate failure in quality programs of the manufactures studied, since these bacteria are easily inactivated by thermal and sanitizer process.

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

RESUMO

Pouco se sabe sobre a presença de *Salmonella* no cacau brasileiro, o que justifica o presente trabalho cujo objetivo foi verificar a presença de enterobactérias totais, coliformes, *Escherichia coli* e *Salmonella* em derivados processados do cacau. Foram analisadas 150 amostras de produtos derivados do cacau provenientes de duas indústrias processadoras (30 amostras de “nibs”, 30 de liquor, 30 de torta, 30 de manteiga de cacau e 30 de cacau em pó). As amostras apresentaram valores de pH entre 5,31 e 7,35 e atividade de água entre 0,29 e 0,52. Não foi detectada *E. coli* e *Salmonella* em nenhuma amostra analisada. Com relação aos demais grupos de microrganismos analisados, 17% das amostras de nibs apresentaram enterobactérias totais, 20% apresentaram coliformes totais e em uma amostra foram detectados coliformes termotolerantes (0,6 log NMP/g). Sete por cento das amostras de liquor e cacau em pó apresentaram coliformes totais. Nas amostras de torta foi observada a mesma porcentagem para enterobactérias totais. Em uma amostra de manteiga de cacau foram detectados enterobactérias totais e coliformes totais. Apesar da baixa contaminação observada, esses resultados indicam falhas no programa de qualidade das indústrias avaliadas, já que essas bactérias são facilmente inativadas por processo térmico e sanitizante.

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

INTRODUCTION

The first step in conventional cocoa processing consists of roasting the cleaned, whole beans in their shells at a temperature between 120 and 150 °C, for 5 to 120 minutes. During roasting, a series of chemical reactions critical to the development of aroma, taste and color of the chocolate take place. The time/temperature combination will depend on several factors, including the origin and harvesting time within the year, pre-roasting treatments, the moisture level, the size of the beans and the desired flavor characteristics. Upon completion of roasting, the beans are cooled and cracked. Next, the shell and germ are removed (“winnowing”) to obtain the nibs¹.

The nibs are ground to a fine particle size, called cocoa mass or cocoa liquor. Cocoa mass is subjected to hydraulic pressing, which separates some of the cocoa butter from the solid cocoa mass, resulting in compressed cocoa cake. Cocoa butter is the most valuable by-product of the pressing process. Cocoa cake is normally submitted to one more grinding process to obtain a fine powder of different particle sizes. Cocoa powder can be used in the manufacture of chocolate-flavored beverages, confectionery and bakery fillings and ice cream¹.

From a public health standpoint, the microorganisms most likely to adversely affect the quality of chocolate are enteropathogens like *Salmonella*. With regard to *Salmonella*, the European Union² lists chocolate among the products associated with major salmonellosis outbreaks in humans that spread across several countries and affected large numbers of people. Although cocoa products are not the only ingredients that may introduce *Salmonella* into chocolate, they have been implicated as the most prominent potential source of some outbreaks (dried cocoa beans, cocoa powder). Cordier³ points out cocoa beans as a major source of *Salmonella* contamination throughout the manufacturing of chocolate and cocoa-based ingredients. Consequently, it is imperative that in-process products be routinely screened for the presence of *Salmonella* as part of an integrated control process that begins with the selection of reliable suppliers⁴.

Indicator microorganisms are generally used to measure the quality of the practices used to ensure proper processing. Total *Enterobacteriaceae* are used as an indicator of hygiene practices since they are easily inactivated by sanitizers, and are able to colonize several niches of food processing plants⁵.

The coliform group is a subgroup of *Enterobacteriaceae*, and the most used as an indicator in the food industry. They are aerobic or facultative anaerobic Gram-negative, nonspore-forming rods that ferment lactose, forming acid and gas. Representatives of 20 or more species may conform to criteria for this group, including fecal (*Escherichia coli*) and non fecal origins (*Citrobacter*, *Enterobacter*, etc)⁵.

Nonetheless, there is still a huge gap in the scientific data and information available concerning contamination of primary ingredients. Thus, the implementation of any prevention measures should be preceded by detailed studies that allow determining prevalence and the main points of entrance of these microorganisms into the chocolate production chain. For this reason, the aim of this study was to investigate the presence of total *Enterobacteriaceae*, coliforms, *Escherichia coli* and *Salmonella* in semi-processed cocoa products.

MATERIAL AND METHODS

Sampling

A total of 150 samples divided into five groups of semi-finished processed cocoa products from two different processing Brazilian manufacturers were analyzed. Each group consisted of 30 samples of each product type: nibs, cocoa liquor, cocoa cake, cocoa butter and cocoa powder.

Test methods

Water activity was measured at 25 °C with a hygrometer Aqua Lab 3TE (Braseq, Brazil). The pH was determined according to the method developed by the Instituto Adolfo Lutz⁶. *Salmonella* analysis was performed according to the method of the Bacteriological Analytical Manual (BAM/FDA)⁷. The pre-enrichment phase was performed in reconstituted skimmed milk to 10%, supplemented with brilliant green. After that, the sample materials were enriched in Rappaport–Vassiliadis and tetrathionate broth and subsequently plated onto Bismuth Sulphite Agar, Hecktoen enteric agar, and Xylose Lysine Deoxycholate agar. Suspect colonies were confirmed by biochemical and serological tests. *Enterobacteriaceae* were enumerated on Violet Red Bile Glucose agar by the plate count method. Total coliforms, thermotolerant coliforms and *E. coli* counts were determined by the Most Probable Number (MPN) technique, described in the Compendium of methods for microbiological examination of foods⁸. The presumptive test was performed using Lauryl Sulfate

Tryptose broth. Confirmation of total coliforms was carried out in Brilliant Green Bile broth and that of thermotolerant coliforms in EC broth. Confirmation of *E. coli* was followed by isolation on EMB agar and confirmation by biochemical tests (Indole, Voges-Proskauer, Methyl Red and citrate).

RESULTS

Tables 1 and 2 show the results for water activity, pH and microbiological analyses of 150 samples of

Table 1. Results of pH and water activity of processed cocoa products

Product	pH	Water activity
Nibs	4.98 to 5.67	0.42 to 0.57
Liquor	5.54 to 7.12	0.22 to 0.80
Cocoa cake	5.40 to 8.48	0.24 to 0.48
Cocoa butter	5.51 to 7.87	0.41 to 0.56
Cocoa powder	5.57 to 8.24	0.28 to 0.58

Table 2. Results of microbiological analyses of processed cocoa products

Product	Contamination parameter	Total <i>Enterobacteriaceae</i> (Log CFU/g)*	Total coliforms (Log MPN/g)**	Thermotolerant coliforms (Log MPN/g)**
Cocoa nibs	Positive samples (%)	05 (17%)	06 (20%)	01 (3%)
	Counts in positive samples (mean)	1.0 to 2.0 (1.2)	0.6 to 1.4 (0.9)	0.6
Cocoa liquor	Positive samples (%)	0	02 (7%)	0
	Counts in positive samples (mean)	-	0.6 to 1.0 (0.8)	-
Cocoa butter	Positive samples (%)	01 (3%)	01 (3%)	0
	Counts in positive samples (mean)	1,0	0.6	-
Cocoa cake	Positive samples (%)	02 (7%)	0	0
	Counts in positive samples (mean)	1.0 to 1.3 (1.2)	-	-
Cocoa powder	Positive samples (%)	0	02 (7%)	0
	Counts in positive samples (mean)	-	0.6 to 0.9 (0.7)	-

*Colony forming units, detection limit 1.0 Log CFU/g. **Most probable number, detection limit 0.5 Log MPN/g

processed cocoa products from two cocoa processing manufacturers. *Salmonella* and *E. coli* were not detected in any of the 150 samples (date not shown).

The cocoa nib samples had water activity values between 0.422 and 0.567 and the pH varied between 4.98 and 5.67. Five (17%) of the 30 samples were found to be contaminated with total *Enterobacteriaceae*, with counts

varying from 1.0 to 2.0 Log CFU/g. Total coliforms were detected in six (20%) of the 30 samples, with mean of 0.9 Log MPN/g, while thermotolerant coliforms were detected in one sample (0.6 Log MPN/g).

The samples of cocoa liquor had water activity values between 0.22 and 0.80 and the pH varied between 5.54 and 7.12. Total *Enterobacteriaceae* were not detected

by the plate count method. However, total coliforms were isolated in two (7%) of the 30 samples by the MPN technique, with counts of 0.6 and 1.0 Log MPN/g.

The samples of cocoa butter had water activity values ranging between 0.41 and 0.56 and the pH varied between 5.40 and 8.48. One sample (3%) was found to be contaminated with total *Enterobacteriaceae* (1.0 Log CFU/g). In another sample (3%) total coliforms were detected, with a count of 0.6 Log MPN/g.

The cocoa cake samples had water activity ranging between 0.24 and 0.35. The pH varied between 6.60 and 7.35. Total *Enterobacteriaceae* were observed in two samples (7%), with counts of 1.0 and 1.3 Log CFU/g. However, total coliforms were not isolated in any analyzed sample.

The samples of cocoa powder had water activity between 0.28 and 0.58. The pH varied between 5.57 and 8.24. Just as occurred for liquor samples, total *Enterobacteriaceae* were not detected in cocoa powder by the plate count method. Nevertheless, in two samples (7%), using the MNP technique, contamination by total coliforms was observed, with counts varying from 0.6 to 0.9 Log MPN/g.

The fact of total *Enterobacteriaceae* not being detected in samples which showed contamination by total coliforms was possibly due to the difference between methods and detection limit used in this study. Total *Enterobacteriaceae* were analyzed by the plate count method, whose detection limit is 1.0 Log CFU/g. In contrast, the MPN method was used to isolate total coliforms which a part from having a lower detection limit (0.5 Log MPN/g), also has a step in nonselective broth that allows for the recovery of possibly injured cells. Furthermore, it is worth pointing out that the total coliform count observed in liquor and cocoa powder samples were below the detection limit of the total *Enterobacteriaceae* method (1.0 Log CFU/g).

DISCUSSION

The processing of cocoa beans into semi-processed products consists basically of the following steps: bean selection and cleaning, roasting, grinding, pressing and pulverizing. Roasting is the main step capable of significantly reducing the microbial counts, even though alkalization also serves as a barrier function.

The low water activity and the high fat level of some semi-processed cocoa products may influence the

increase in heat resistance of the pathogens⁴. According to Jay⁵, the optimum pH value for *Enterobacteriaceae* growth falls within the neutral range (6.6 to 8.2); values above 9 and lower than 4 are considered bactericidal. With regard to water activity, growth inhibition of most members of this family occurs at values lower than 0.94. All the products tested had a pH falling within the development range for *Enterobacteriaceae* such as *Salmonella*, but at the same time had water activity values lower than 0.60 which is an adverse growth condition. However, the fact that the semi-processed cocoa product exhibited low water activity values does not prevent the contamination with and the subsequent survival of these microorganisms, what was observed in this study.

In all 150 samples of semi-processed cocoa products analyzed, *Salmonella* and *E. coli* were not detected. However, 18.5% of the samples showed total *Enterobacteriaceae* and/or total coliforms, microorganisms routinely used as hygiene indicator of process⁵. Hence, despite the low contamination (≤ 2 Log CFU or MPN/g), this result suggests failure in quality programs, since these bacteria are easily inactivated by thermal and sanitizer process.

It is worrying from public health point of view because a possible contamination by *Salmonella* and *E. coli* could occur in these conditions. As these products are used as raw material for chocolate manufacturing, the control must be rigorous, seeking the absence of indicator organisms. This concern is corroborated by the fact that two salmonellosis outbreaks associated with chocolate have been reported, in which the source of contamination was traced back to the cocoa beans or the cocoa powder⁹. In addition, epidemiological surveys have confirmed that the *Salmonella* infecting dose in this type of product is very low, sometimes even lower than 1 CFU/g⁹.

Therefore, temperature monitoring during cocoa roasting, use of quality raw material, use of good manufacturing practices, employee training, pest control, and adequate, well-executed hygiene program are prime factors throughout the supply chain of cocoa and chocolate to obtain products microbiologically safe.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support.

REFERENCES

1. Beckett ST. The science of chocolate, 2nd ed. London (UK): Royal Society of Chemistry Paperbak; 2008.
2. European Commission. *Salmonella* in Foodstuffs. Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health. [cited 2007 nov 22]. Available from: http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scv/out66_en.pdf.
3. Cordier JL. HACCP in the chocolate industry. *Food Contr*. 1994;5:171-5.
4. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Cocoa, chocolate and confectionery. *In: Microorganisms in Foods 6: Microbiological Ecology of Food Commodities*. 2nd ed. New York (NY): Kluwer Academic; 2005. p. 467-479.
5. Jay JE. *Microbiologia de alimentos*. 6th ed. Porto Alegre (RS): Artmed, 2005.
6. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo – Brasil). *Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos: Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. 4th ed. Brasília (DF): ANVISA; 2005.
7. Andrews WH, Hammack TS. *Salmonella*. *In: Bacteriological analytical manual online*. Food and Drug Administration. [cited 2007 nov 22]. Available from: <http://www.cfsan.fda.gov/ebam/bam-5.html>.
8. Kornacki JL, Johnson JL. *Enterobacteriaceae*, coliforms and *Escherichia coli* – quality and safety indicators. *In: Downes, FP, Ito K, editors. Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Washington (DC): American Public Health Association; 2001. p.69-82.
9. Werber D, Dreesman J, Feil F, van Treeck U, Fell G, Ethelberg S et al. International outbreak of *Salmonella* Oranienburg due to German chocolate. *BMC Infect Dis*. 2005;5(7):7-17.

Ciclamato de sódio em refrigerantes de baixa caloria

Sodium cyclamate in low calorie soft drinks

RIALA6/1349

Mateus Henrique PETRARCA, Maria Terezinha Elizene da Silva BONIFÁCIO, Magali MONTEIRO*

*Endereço para correspondência: Laboratório de Análise de Alimentos, Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", CP 502, Rodovia Araraquara-Jaú Km 1, Araraquara, SP, Brasil, CEP 14801-902, e-mail: monteiro@fcfar.unesp.br

Recebido: 23.09.2010 – Aceito para publicação: 31.03.2011

RESUMO

O objetivo deste estudo foi determinar os teores de ciclamato de sódio nos refrigerantes de baixa caloria mais consumidos no país. Os refrigerantes de baixa caloria dos tipos cola, guaraná, laranja, limão e uva foram analisados seguindo-se a técnica descrita por Sjöberg e Alanko (1987), com algumas modificações. Os ensaios de recuperação da metodologia foram realizados em três níveis de fortificação, com recuperação média de 92,5% e 110,3%, respectivamente, para cola e guaraná, e o desvio-padrão relativo foi de 3,7%. Os teores médios de ciclamato de sódio variaram de $27,1 \pm 1,1$ (cola A) a $127,3 \pm 1,5$ mg.100 mL⁻¹ (limão B), o que mostra que a ingestão diária aceitável do edulcorante pode ser facilmente excedida com o consumo de refrigerantes de baixa caloria. Todas as amostras de refrigerantes apresentaram teores de ciclamato de sódio superiores àqueles indicados no rótulo, com 12,9% (cola A) a 19,0% (limão B) acima do declarado. Dos 18 refrigerantes analisados, apenas quatro apresentaram teor médio de ciclamato de sódio de acordo com o limite máximo de 40 mg.100 mL⁻¹ de bebida, permitido pela legislação brasileira; e os demais apresentaram variação de 74,8% (laranja) a 218,3% (limão B) acima do limite permitido.

Palavras-chave. edulcorante, ciclamato de sódio, refrigerantes de baixa caloria, espectrofotometria UV/Visível.

ABSTRACT

Sodium cyclamate contents in the widely consumed low calorie soft drinks were determined. Low calorie soft drinks made from cola, guarana, orange, lemon and grape were analyzed following the technique described by Sjöberg and Alanko (1987), with some modifications. The methodology recovery assays were carried out at three spiked levels, and the average recovery of 92.5% and 110.3% were found in cola and guarana, respectively; and the relative standard deviation was of 3.7%. The average sodium cyclamate contents ranged from 27.1 ± 1.1 (cola A) to 127.3 ± 1.5 mg.100 mL⁻¹ (lemon B), indicating that the acceptable daily intake of the sweetener can be easily exceeded after drinking low calorie beverages. All of the analyzed low calorie soft drinks showed sodium cyclamate contents higher than those stated on the label, ranging from 12.9% (cola A) to 19.0% (lemon B). Among 18 low calorie soft drinks analyzed, only four showed the average sodium cyclamate contents in accordance with the maximum limit permitted by Brazilian legislation, that is 40 mg.100 mL⁻¹ of beverage; and in other samples the sweetener exceeded ranging from 74.8% (orange) to 218.3% (lemon B) above of the limit permitted.

Keywords. sweetener, sodium cyclamate, low calorie soft drinks, UV/Visible spectrophotometry.

INTRODUÇÃO

O mercado brasileiro de produtos *diet* e *light* cresceu 1.875% nos últimos 13 anos, ou seja, mais de 144% ao ano, sendo os adoçantes de mesa, os refrigerantes e os sucos de fruta os produtos mais consumidos. Em 2009, foram consumidos 1.419,26 milhões de litros de refrigerantes de baixa caloria no Brasil. Os campeões de venda foram os refrigerantes dos tipos cola, guaraná e laranja^{1,2}.

De acordo com a Instrução Normativa nº 30, de 27 de setembro de 1999, da Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária, bebida de baixa caloria é “a bebida não alcoólica, e hipocalórica, devendo ter o conteúdo de açúcares adicionados normalmente na bebida convencional inteiramente substituído por edulcorantes hipocalóricos e não calóricos, naturais ou artificiais, exceto para o preparado sólido para refresco, que poderá conter o conteúdo de açúcar parcialmente substituído por edulcorantes hipocalóricos e não calóricos, naturais ou artificiais, e cujo teor calórico não ultrapasse a 20 kcal.100 mL⁻¹ da bebida”³.

Os edulcorantes são definidos como “substâncias diferentes dos açúcares que conferem sabor doce aos alimentos”⁴. Dentre os edulcorantes permitidos pela legislação brasileira estão o sorbitol, manitol, isomalte, glicosídeos de esteviol, maltitol, lactitol, xilitol e eritritol, classificados como naturais, e o acesulfame de potássio, aspartame, ácido ciclâmico e seus sais de cálcio, potássio e sódio, sucralose, neotame, taumatina, e sacarina e seus sais de cálcio, potássio e sódio, classificados como artificiais⁵.

O ciclamato de sódio é aproximadamente 30 vezes mais doce que a sacarose, estável em ampla faixa de pH e temperatura, e apresenta alta solubilidade em água. O ciclamato foi descoberto por Michael Sveda em 1937, aprovado como aditivo alimentar pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 1949 e tem seu uso permitido como edulcorante em mais de 40 países, incluindo os da União Europeia, Mercosul e o Canadá, e também no Brasil, onde começou a ser produzido em 1977^{6,7}. A Resolução RDC nº 18 de 24 de março de 2008, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), autoriza o uso do edulcorante ácido ciclâmico e seus sais de cálcio, potássio e sódio, em alimentos e bebidas, considerando o limite máximo de 0,04 g.100 mL⁻¹ de bebida ou 100 g de alimento⁵.

Nos Estados Unidos, o uso do ciclamato e seus sais está proibido pela FDA desde 1969, baseado em estudos que associaram a combinação de ciclamato e sacarina sódica com o aumento da incidência de tumores de bexiga em ratos machos, após observação de que parte

do ciclamato ingerido era metabolizado à ciclohexilamina pelas bactérias intestinais^{8,9}.

Na última avaliação do *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA) sobre ciclamato de cálcio e sódio, realizada em 1982, foi estabelecida a ingestão diária aceitável (IDA) de 11 mg.kg⁻¹ de peso corpóreo, considerando o nível em que não foram observados efeitos (NOEL – *No Observed Effect Level*) de 100 mg.kg⁻¹ de peso corpóreo, devido à atrofia testicular em ratos, observada para o metabólito ciclohexilamina, em doses superiores. Segundo o estudo, 37% do ciclamato ingerido são absorvidos, e os 63% restantes estão disponíveis para a conversão à ciclohexilamina, cuja taxa média de conversão em seres humanos é de 30%¹⁰. De acordo com a *International Agency of Research on Cancer* (IARC), em 1999, o ciclamato de sódio foi classificado no grupo 3, não carcinogênico para humanos¹¹.

Uma vez que o consumo de produtos *diet* e *light* vem aumentando no Brasil e muito se questiona sobre a segurança de uso do ciclamato de sódio em alimentos e bebidas, o objetivo do estudo foi determinar os teores de ciclamato de sódio nos refrigerantes de baixa caloria mais consumidos no país.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Um total de 18 unidades de refrigerantes de baixa caloria (dos tipos cola, guaraná, laranja, limão e uva), cujo rótulo informava a presença de ciclamato de sódio, foi adquirido em três supermercados (grande, médio e pequeno portes) do município de Araraquara, SP, nos meses de outubro e novembro de 2009, e abril de 2010. Foram coletadas duas embalagens (350 mL e/ou 2000 mL) de cada tipo de refrigerante das marcas líderes de mercado (A e B), de diferentes datas de fabricação. Para o refrigerante do tipo laranja, apenas uma marca foi analisada, pois dentre as disponíveis, somente essa declarava a presença de ciclamato de sódio.

Ácido sulfúrico, ciclohexano, hipoclorito de sódio e ciclamato de sódio foram adquiridos da Synth (Diadema, SP, Brasil), acetato de etila da Quimex (São Paulo, SP, Brasil), e hidróxido de sódio da Qhemis (Indaiatuba, SP, Brasil).

Método

O método empregado para a determinação de ciclamato de sódio nos refrigerantes de baixa caloria foi

de acordo com o descrito por Sjöberg e Alanko¹², com algumas modificações, sendo suas etapas descritas a seguir. As determinações foram realizadas em triplicata.

Extração

Previamente à extração os refrigerantes foram mantidos à temperatura ambiente e desgaseificados em banho de ultrassom durante 30 minutos. Com base na quantidade de ciclamato de sódio declarada na rotulagem, alíquotas de 5 a 25 mL de refrigerante foram pipetadas para balão volumétrico de 50 mL e o volume foi completado com água destilada. A solução foi transferida para o 1º funil de separação, no qual foram adicionados 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, seguido de agitação manual por 2 minutos e, após resfriamento do sistema, foram adicionados 50 mL de acetato de etila. O sistema foi novamente agitado por 2 minutos e a fase orgânica foi separada da fase aquosa.

Uma alíquota de 40 mL da fase orgânica foi transferida para o 2º funil de separação, no qual foi realizada a extração com três porções de 15 mL de água destilada, cada. As fases aquosas foram recolhidas e combinadas num 3º funil de separação, em que foram adicionados 1 mL de hidróxido de sódio 10M e 5 mL de ciclohexano, seguindo-se de agitação por 2 minutos e posterior separação da fase aquosa, que foi transferida para o 4º funil de separação, para o procedimento de derivatização.

Derivatização

Uma vez que a molécula do edulcorante absorve fracamente na região do UV/Visível, foi necessário proceder à reação de derivatização do ciclamato de sódio a N,N-diclorociclohexilamina. Ao 4º funil de separação contendo a fase aquosa foram adicionados 3 mL da solução de ácido sulfúrico: água (3:7), 5 mL de ciclohexano e 5 mL de hipoclorito de sódio, seguindo-se de agitação por 2 minutos e separação das fases. A fase aquosa foi escoada e a fase orgânica agitada por 2 minutos com 25 mL de hidróxido de sódio 0,5M. Em seguida, a fase aquosa foi novamente escoada e a orgânica lavada com uma porção de 25 mL de água destilada. Após nova separação, a fase orgânica foi recolhida em balão volumétrico e o volume completado com ciclohexano. A fase aquosa foi descartada.

Quantificação

Após derivatização, a absorbância da fase orgânica foi lida em espectrofotômetro UV/Visível (*Beckman*

DU® 640, Fullerton, CA, USA) no comprimento de onda de 314 nm, utilizando o ciclohexano como branco. A quantificação foi realizada usando a curva de calibração obtida com solução-padrão de ciclamato de sódio (0,06 – 0,25 mg.mL⁻¹).

Recuperação

Os ensaios de recuperação do método foram realizados nos refrigerantes de baixa caloria dos tipos cola e guaraná, em três níveis de fortificação (0,06, 0,10 e 0,20 mg.mL⁻¹). A recuperação foi calculada como a razão percentual entre o teor de ciclamato de sódio obtido e o teor adicionado. Os teores de ciclamato de sódio determinados nos refrigerantes não foram corrigidos em função da porcentagem de recuperação do método.

Análise estatística

Os teores de ciclamato de sódio foram expressos como média ± desvio-padrão. O software *Origin 7.0* (2000) foi utilizado para a obtenção da curva de calibração, determinação da equação da reta de regressão linear e do coeficiente de correlação linear. Os teores médios de ciclamato de sódio foram analisados estatisticamente, usando análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, considerando-se um nível de significância de 5%, empregando o software *BioEstat 4.0* (2005).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o propósito de reduzir o custo e a geração de resíduos orgânicos, algumas modificações foram realizadas em relação ao método descrito por Sjöberg e Alanko¹². Os volumes dos reagentes utilizados na extração e na reação de derivatização foram reduzidos em cerca de 50%. Apesar de o método empregado ter apresentado porcentagem média de recuperação acima de 90% para a substância de interesse, o grande número de etapas requer longo tempo para execução, o que o torna de difícil aplicabilidade quando se trata de grande número de amostras.

A equação da reta de regressão linear da curva de calibração empregada para a quantificação do ciclamato de sódio nos refrigerantes de baixa caloria foi $y = -0,01588 + 3,30201x$, onde y = absorbância e x = concentração de ciclamato de sódio (mg.mL⁻¹), com coeficiente de correlação linear (r) de 0,99956.

Os teores médios de ciclamato de sódio nos refrigerantes variaram de $27,1 \pm 1,1$ a $127,3 \pm$

1,5 mg.100 mL⁻¹. O refrigerante do tipo cola A foi o que apresentou o menor teor do edulcorante, enquanto os refrigerantes dos tipos cola B, uva B e limão B foram os de maior teor de ciclamato de sódio. Não houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) no teor de ciclamato de sódio dos refrigerantes de baixa caloria provenientes de diferentes datas de fabricação, em todos os tipos de refrigerantes analisados (Tabela 1).

Verificou-se acentuada variação no teor do ciclamato de sódio dos refrigerantes de baixa caloria do mesmo tipo entre as diferentes marcas analisadas. Essa variação pode ter ocorrido em função dos vários edulcorantes permitidos pela legislação brasileira. Assim, o ciclamato de sódio pode ser utilizado em diferentes concentrações e combinações com outros edulcorantes, como acessulfame de potássio, aspartame e sacarina, em um mesmo produto. Isso pode ser observado com os refrigerantes de baixa caloria do tipo cola, por exemplo. Os da marca A, além do ciclamato de sódio (27,1 mg.100 mL⁻¹), declaravam também em sua rotulagem os edulcorantes acessulfame de potássio e aspartame, enquanto os da marca B declaravam apenas o edulcorante ciclamato de sódio (82,8 mg.100 mL⁻¹) e sacarina sódica.

Ao comparar os teores de ciclamato de sódio obtidos com os teores informados na rotulagem dos refrigerantes, verifica-se que todos continham teores do

edulcorante entre 12,9% (cola A) e 19,0% (limão B) acima do declarado na rotulagem.

Apesar de o ciclamato de sódio ser ainda alvo de muitas discussões quanto à sua segurança de uso em alimentos e bebidas, são escassos os relatos sobre os níveis desse edulcorante em bebidas. Camargo e Toledo¹³ reportaram teores de ciclamato de sódio em refrigerantes variando de 36,1 a 101,1 mg.100 mL⁻¹. O refrigerante do tipo limão também foi o que apresentou o maior teor do edulcorante. O refrigerante do tipo laranja apresentou teor de ciclamato de sódio, 73,5 mg.100 mL⁻¹, concordante àquele do presente estudo, de 69,9 mg.100 mL⁻¹. No refrigerante do tipo guaraná foi reportado um teor médio do edulcorante de 36,1 mg.100 mL⁻¹, próximo ao valor verificado neste estudo de 35,4 mg.100 mL⁻¹ para o guaraná A.

As porcentagens de recuperação para os diferentes níveis de fortificação (0,06, 0,10 e 0,20 mg.mL⁻¹) variaram de 90,3 a 115,0%, com médias de 92,5% e 110,3% para os refrigerantes de baixa caloria dos tipos cola e guaraná, respectivamente (Tabela 2). Os resultados estão de acordo com o descrito por Camargo e Toledo¹³, cuja recuperação foi de 92%. O desvio-padrão relativo obtido na recuperação foi de 3,7%, próximo ao determinado por Camargo e Toledo¹³ de 4,1%, e dentro dos limites aceitos segundo Horwitz¹⁴.

Tabela 1. Teores médios de ciclamato de sódio (mg.100 mL⁻¹) em refrigerantes de baixa caloria

Tipos de refrigerantes de baixa caloria	Ciclamato de Sódio (mg.100 mL ⁻¹)			Rotulagem (mg.100 mL ⁻¹) ²
	1*	2*	Valor médio ¹	
Cola A	27,9 ± 0,1 ^a	26,3 ± 0,1 ^a	27,1 ± 1,1	24,0
Cola B	82,6 ± 0,7 ^a	82,9 ± 0,5 ^a	82,8 ± 0,2	72,8
Guaraná A	35,9 ± 0,1 ^a	34,9 ± 0,2 ^a	35,4 ± 0,7	31,0
Guaraná B	74,7 ± 0,2 ^a	73,2 ± 0,2 ^a	73,9 ± 1,1	69,7
Laranja	70,0 ± 0,3 ^a	69,9 ± 0,5 ^a	69,9 ± 0,1	62,0
Limão A	77,8 ± 0,4 ^a	77,6 ± 0,6 ^a	77,7 ± 0,1	64,0
Limão B	128,3 ± 0,5 ^a	126,2 ± 0,3 ^a	127,3 ± 1,5	107,0
Uva A	79,5 ± 0,5 ^a	77,2 ± 0,6 ^a	78,4 ± 1,6	64,0
Uva B	84,2 ± 0,3 ^a	83,1 ± 0,5 ^a	83,7 ± 0,8	72,8

* Diferentes datas de fabricação. Média ± desvio-padrão (n=3)

¹ Média ± desvio-padrão das duas datas de fabricação (1 e 2)

² Nível de ciclamato de sódio informado na rotulagem do produto

Médias seguidas de letras iguais na mesma linha não diferem significativamente ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey

Tabela 2. Porcentagens de recuperação de ciclamato de sódio em refrigerantes de baixa caloria

Refrigerantes de baixa caloria	Recuperação (%) ¹			DPR (%)	Recuperação (%) ²
	0,06 mg.mL ⁻¹	0,10 mg.mL ⁻¹	0,20 mg.mL ⁻¹		
Cola	90,3	90,8	96,4	3,7	92,5
Guaraná	108,0	115,0	108,0	3,7	110,3

¹ Média para cada nível de fortificação (n = 3)

² Média dos 3 níveis de fortificação (n = 9)

DPR: Desvio-padrão relativo

Com relação ao limite máximo de ciclamato de sódio em bebidas, estabelecido pela legislação brasileira, apenas quatro amostras (dos tipos cola A e guaraná A) apresentaram teor médio de acordo com a legislação vigente. Todas as demais apresentaram teores médios do edulcorante acima do limite máximo permitido de 40 mg.100 mL⁻¹ ⁵, com porcentagens variando de 74,8% (laranja) a 218,3% (limão B) acima do limite permitido. No entanto, as indústrias nacionais têm um prazo de três anos para adequarem seus produtos, a partir da data de publicação (25 de março de 2008) do regulamento técnico que estabelece os limites máximos de edulcorantes em alimentos e bebidas⁵.

Considerando a IDA de 11mg.kg⁻¹ de peso corpóreo, um indivíduo adulto de 60 kg poderia estar ingerindo 660 mg de ciclamato de sódio diariamente durante toda a sua vida sem apresentar riscos apreciáveis à sua saúde¹⁰. Isso significa que seriam necessárias aproximadamente 7 latas (350 mL em cada) do refrigerante de baixa caloria do tipo cola A para atingir a IDA recomendada, desde que apenas o refrigerante de baixa caloria fosse a fonte de ciclamato de sódio na dieta desse indivíduo. Paralelamente, apenas 2 latas do refrigerante de baixa caloria do tipo limão B já ultrapassariam a IDA para este edulcorante, ou seja, uma quantidade que pode normalmente ser ingerida por um indivíduo adulto em um só dia. No caso de uma criança de 30 kg, apenas 1 lata do refrigerante de baixa caloria do tipo limão B já excederia o limite diário.

O Instituto Brasileiro de Defesa do Consumidor (IDEC) divulgou, em 21 de junho de 2006, que 25 bebidas dietéticas estariam desrespeitando o Código de Defesa do Consumidor por não conterem na rotulagem informações sobre o limite do consumo diário de refrigerantes de baixa caloria, uma vez que a IDA do edulcorante presente nessas bebidas poderia ser ultrapassada com o consumo desses refrigerantes¹⁵.

Dados da Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e de Bebidas Não Alcoólicas (ABIR) indicam que o mercado brasileiro de refrigerantes de baixa caloria está em expansão. Em 2002 foram consumidos 734,15 milhões de litros de refrigerantes de baixa caloria, com um salto para 1.419,26 milhões de litros em 2009², o que torna imprescindível esclarecer o consumidor sobre o limite do consumo diário de refrigerantes de baixa caloria e os possíveis riscos à saúde quando a IDA recomendada do edulcorante for excedida.

CONCLUSÃO

Apenas quatro das dezoito amostras de refrigerantes avaliadas apresentaram teor médio de ciclamato de sódio dentro do limite máximo estabelecido pela legislação brasileira. Os teores de ciclamato de sódio indicaram que a IDA do edulcorante pode ser facilmente excedida com o consumo de alguns tipos de refrigerantes de baixa caloria, o que sugere que os rótulos devam conter informações sobre o consumo diário máximo de refrigerantes de baixa caloria.

REFERÊNCIAS

1. Associação Brasileira da Indústria de Alimentos Dietéticos e Para Fins Especiais – ABIAD. Mercado Diet e Light. [acesso 2010 Ago 12]. Disponível em: [http://www.abiad.org.br].
2. Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e de Bebidas Não Alcoólicas – ABIR. Refrigerantes Consumo 2002-2009. [acesso 2010 Ago 12]. Disponível em: [http://www.abir.org.br].
3. Brasil. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 30, de 27 de setembro de 1999. Aprova o Regulamento Técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para a bebida dietética e a de baixa caloria. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 29 set. 1999.
4. Brasil. Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares – definições, classificação e

- emprego. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 28 out. 1997.
5. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 18, de 24 de março de 2008. Dispõe sobre o “Regulamento Técnico que autoriza o uso de aditivos edulcorantes em alimentos, com seus respectivos limites máximos”. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 25 mar. 2008.
 6. Shibaio J, Santos GFA, Gonçalves NF, Gollücke APB. *Edulcorantes em alimentos: aspectos químicos, tecnológicos e toxicológicos*. São Paulo: Phorte Editora; 2009.
 7. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Informe Técnico nº 40 de 2 de junho de 2009 – Esclarecimentos sobre o uso do edulcorante ciclamato em alimentos. [acesso 2010 Ago. 12]. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/40_020609.htm].
 8. Price JM, Biava CG, Oser BL, Vogin EE, Steinfeld J, Ley HL. Bladder tumors in rats fed cyclohexylamine or high doses of cyclamate and saccharin. *Science*. 1970; 167: 1131-32.
 9. Drasar BS, Renwick AG, Williams RT. The role of the gut flora in the metabolism of cyclamate. *Biochem J*. 1972; 129: 881-90.
 10. Joint FAO/ WHO Expert Committee on Food Additives – JECFA. *Monographs & Evaluations - Calcium Cyclamates, Sodium Cyclamates and Cyclohexylamine*. [acesso 2010 Ago 12]. Disponível em: [<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v17je08.htm>].
 11. International Agency for Research on Cancer – IARC. *Summaries & Evaluations Cyclamates*. [acesso 2010 Ago 12]. Disponível em: [<http://www.inchem.org/documents/iarc/vol73/73-07.html>].
 12. Sjöberg AMK, Alanko TA. Spectrophotometric determination of cyclamate in foods: Nordic Committee on Food Analysis Collaborative Study. *J Assoc Off Anal Chem*. 1987; 70: 588-90.
 13. Camargo MCR, Toledo MC. Determinação espectrofotométrica de ciclamato de sódio em alimentos e bebidas dietéticas e de baixas calorias. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2006; 65(2): 100-5.
 14. Horwitz W, Kamps LR, Boyer KW. Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents. *J Assoc Off Anal Chem*. 1980; 63(6): 1344-54.
 15. Instituto Brasileiro de Defesa do Consumidor – IDEC. Pesquisa do IDEC constata: adoçantes e bebidas light desrespeitam o Código de Defesa do Consumidor. [acesso 2010 Ago 12]. Disponível em: [<http://www.idec.org.br/emacao.asp?id=1153>].

Avaliação da composição química de óleos extraídos de sementes de abóboras (*Cucurbita* spp.)

Veronezi CM. *Evaluation of Chemical Composition of Pumpkin Seed Oil (*Cucurbita* spp.)* - 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.

Cresce a busca por alimentos mais saudáveis, principalmente de origem vegetal, que são constituídos por substâncias benéficas ao organismo. Essas substâncias, denominadas de compostos bioativos, ajudam na redução do risco de doenças crônico-degenerativas e outras. Dentre esses alimentos, encontram-se os frutos. Porém, ainda são escassas as informações sobre a composição nutricional de certos frutos, principalmente no que se refere ao valor nutricional dos resíduos gerados em seu processamento. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a composição centesimal de sementes de frutos da família *Cucurbitaceae* cultivadas no Brasil e caracterizar os seus óleos a fim de identificar compostos bioativos para a possível aplicação em alimentos. As sementes de abóboras das variedades Nova-caravela, Mini-paulista, Menina-brasileira (*Cucurbita moschata*) e Moranga-de-mesa (*Cucurbita maxima*) foram caracterizadas quanto à umidade, lipídios, proteínas, cinzas e carboidratos totais, e os óleos dessas sementes quanto às propriedades físico-químicas, além do perfil de ácidos graxos, teores de tocoferóis, carotenoides e compostos fenólicos totais. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as diferenças entre as médias foram testadas a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, por meio do programa ESTAT, versão 2.0. Verificou-se que todas as sementes possuem composição centesimal semelhante, apresentando teores relativamente elevados de lipídios (33-42%) e proteínas (29-34%). Com relação às propriedades físico-químicas, todos os óleos apresentaram valores dentro das faixas características dos óleos vegetais comestíveis. Os principais ácidos graxos encontrados foram o linoleico (40-47%) e oleico (28-30%), que perfizeram um total de 70 a 78%, sendo o óleo das sementes das abóboras da variedade Moranga-de-mesa o mais insaturado. Quanto aos tocoferóis totais se destacou a variedade Menina-brasileira (386,43 mg/kg). Porém, quanto aos carotenoides e compostos fenólicos totais, sobressaiu-se a variedade Mini-paulista com 26,8 µg/g e 3,62 mg EAG/g, respectivamente.

Palavras-chave. *Cucurbita moschata*, *Cucurbita maxima*, aproveitamento de resíduos, compostos bioativos.

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: carolinaveronezi@yahoo.com.br

Dinâmica de circulação de *Leishmania spp.* no ambiente enzoótico de duas regiões do Estado de São Paulo, Brasil

Taniguchi HH. Dynamics of circulation of *Leishmania spp.* in the enzootic forested environment in two regions of the State of São Paulo, Brazil. São Paulo, SP. 2011. [Tese de Doutorado – Área de Concentração: Epidemiologia. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo – USP]. Orientadora: Dr^a. Eunice Aparecida Bianchi Galati.

Com o objetivo de investigar a ecoepidemiologia de *Leishmania spp.* com relação a animais silvestres e aos flebotômíneos vetores, desenvolveram-se estudos em duas áreas no Estado de São Paulo (Ilhabela e Itupeva) no período de outubro de 2000 a setembro de 2009.

Foram capturados 2.714 animais, dos quais 21,22% tiveram uma única captura, enquanto 78,78% foram recapturados até 35 vezes. Exemplares de *Philander opossum* permaneceram até 79 meses no mesmo local em Ilhabela. A recaptura sistemática e o longo tempo de permanência nos mesmos locais de alguns espécimes indicam a existência de territórios bem definidos, principalmente para *Philander opossum* e *Proechimys iheringi*.

A leishmaniose tegumentar americana no município de Itupeva ocorre em áreas de antiga colonização. Caracteriza-se por apresentar casos humanos e caninos em áreas com intensa ação antrópica próximas à mata e com evidências de participação de *Nyssomyia neivai* e *Nyssomyia whitmani* nos ambientes peri e intradomiciliar. Em interior de mata verificou-se que *Ny. neivai*, *Ny. whitmani* e *Evandromyia edwardsi* são as espécies predominantes. Não se observou infecção natural por *Leishmania sp.* em qualquer dos exemplares de flebotômíneos examinados. Em relação aos possíveis reservatórios silvestres, identificou-se: *Leishmania (V.) braziliensis* infectando *Didelphis albiventris*, *Nectomys squamipes* e *Lutreolina crassicaudata* e *Leishmania sp.* em *Akodon sp.* e *D. albiventris*. No bairro Monte Serrat, foi isolado *Leishmania sp.* de um *Didelphis albiventris* capturado no peridomicílio, podendo este marsupial atuar como elo entre o ciclo silvestre e o doméstico.

A presença de *L.(L.) infantum chagasi* em ciclo silvestre (*Akodon sp.* e *D. albiventris*) em região sem leishmaniose visceral (humana ou canina) em Itupeva e a presença do vetor *Lutzomyia longipalpis* merecem destaque e cuidado redobrado das autoridades de vigilância e controle das leishmanioses, em particular da forma visceral que grassa em todo o território paulista, inclusive em locais com ausência dessa espécie de flebotômíneo.

Em Ilhabela, em uma fazenda próxima à área de proteção ambiental, verificou-se a presença concomitante de *L. (V) braziliensis* e *L.(L) amazonensis* em exemplares de *Proechimys iheringi*; também foram encontrados exemplares de *P. iheringi* e *P. opossum* infectados por *Leishmania sp.* capturados em ambiente florestal. Os flebotômíneos mais abundantes foram *Ny. intermedia* e *Migonemyia migonei*, tanto em galinheiros no peridomicílio quanto em interior de mata, e houve a presença menos expressiva de *Ev. edwardsi* nos dois ambientes. Casos humanos de LTA ocorreram em áreas muito próximas às matas, demonstrando estreita relação com ciclos enzoóticos.

Palavras-chave. ecoepidemiologia das leishmanioses, Estado de São Paulo, reservatórios silvestres e domésticos, flebotômíneos, dinâmica de circulação, coorte de animais silvestres.

Tese disponível na Biblioteca da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo e na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP. Site www.teses.usp.br
E-mail: hhtaniguchi@uol.com.br

Errata

RIAL 69(4), 2010

Página 584

Onde se lê: Andressa Mara BASSEGIO

Leia-se: Andressa Mara BASEGGIO

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.

1. CATEGORIA DE ARTIGOS

1.1 ARTIGOS ORIGINAIS: Incluem estudos relacionados à prevenção e controle de agravos e à promoção à saúde. Devem ser baseados em novos dados ou perspectivas relevantes para saúde pública. Cada artigo deve conter objetivos e hipóteses claras, desenho e métodos utilizados, resultados, discussão e conclusões.

INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES:

▪ Devem ter até 20 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.

- As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 05 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.
- As referências bibliográficas, limitadas a 40, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.
- Os resumos em português e em inglês (*abstract*) devem ter até 200 palavras, com a indicação de 3 a 6 palavras-chave (*keywords*).

A estrutura dos artigos originais de pesquisa é a convencional: Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão e Conclusão, embora outros formatos possam ser aceitos, mas respeitando a lógica da estrutura de artigos científicos.

1.2 ARTIGOS DE REVISÃO: Dedicados à apresentação e à discussão de temas de interesse científico e de relevância para a saúde pública. Devem apresentar formulação clara de um objeto científico de interesse, argumentação lógica, crítica teórico-metodológica dos trabalhos consultados e síntese conclusiva. Devem ser elaborados por pesquisadores com experiência no campo em questão ou por especialistas de reconhecido saber.

Informações complementares:

- Devem ter até 25 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.
- As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 03 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.
- As referências bibliográficas, limitadas a 50, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.
- Os resumos em português e em inglês (*abstract*) devem ter até 200 palavras, com a indicação de 3 a 6 palavras-chave (*keywords*).

1.3 COMUNICAÇÕES BREVES: São relatos sucintos destinados à rápida divulgação de eventos significativos no campo da pesquisa de interesse em saúde pública e que não comportam uma análise mais abrangente.

Informações complementares:

- Devem ter até 10 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.
- As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 02 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.
- As referências bibliográficas, limitadas a 15, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.
- Os resumos em português e em inglês (*abstract*) devem ter até 200 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (*keywords*).
- Sua apresentação deve acompanhar as mesmas normas exigidas para artigos originais.

1.4 NOTAS CIENTÍFICAS: São relatos sucintos destinados à rápida divulgação de eventos relevantes de uma pesquisa experimental que justifique a publicação de resultados parciais.

Informações complementares:

- Devem ter até 06 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.
- As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 02 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.
- As referências bibliográficas, limitadas a 10, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.
- Os resumos em português e em inglês (*abstract*) devem ter até 200 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (*keywords*).
- Sua apresentação deve acompanhar as mesmas normas exigidas para artigos originais, porém na forma de texto único.

1.5 RELATOS DE CASO: São textos que contemplam principalmente a área médica, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada.

Informações complementares:

- Devem ter até 03 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.
- As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 02 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.

- As referências bibliográficas, limitadas a 10, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.
- Os resumos em português e em inglês (*abstract*) devem ter até 200 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (*keywords*).
- Devem apresentar Introdução, Relato de caso, Discussão e Conclusão, na forma de texto único.

1.6 RESUMOS DE TESES E DISSERTAÇÕES: São aceitos resumos de teses e dissertações até um ano após a defesa.

Informações complementares:

- Devem ter até 400 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (*keywords*).
- Sua apresentação deve conter o nome do autor e do orientador, título do trabalho em português e em inglês, nome da instituição em que foi apresentado, área de concentração e ano da defesa.

2. APRESENTAÇÃO DO MANUSCRITO: Os textos devem ser redigidos em processador de texto *Word for Windows* 2003 ou compatível, no formato A4, espaço duplo, fonte *Times New Roman*, tamanho 12. Devem ser evitados arquivos compactados. A estrutura do manuscrito deve estar em conformidade com as normas do Sistema Vancouver – Título; Autores e Instituições; Resumo e Abstract; Introdução; Material e Métodos; Resultados; Discussão; Conclusão; Agradecimentos; Referências; Tabelas; Figuras e Fotografias.

2.1 PÁGINA DE IDENTIFICAÇÃO: Deve constar:

Título em português e em inglês: O título deve ser conciso, completo e conter informações. Se o manuscrito for submetido em inglês, deve ser fornecido um título em português.

Autores: De acordo com o *International Committee of Medical Journal Editors* (ICMJE), são considerados autores aqueles que contribuíram substancialmente para a concepção e planejamento, ou análise e interpretação dos dados; contribuíram significativamente na elaboração do rascunho ou na revisão crítica do conteúdo e participaram da aprovação da versão final do mesmo. Somente a aquisição de financiamento, a coleta de dados ou supervisão geral de grupos de pesquisa não justificam autoria – maiores esclarecimentos sobre autoria podem ser encontrados na página do ICMJE (<http://www.icjme.org>). Deve constar o nome completo, sem abreviações e com último sobrenome em caixa alta (exemplo: Ana Maria Camargo da SILVA) e o e-mail do autor responsável. O autor responsável para troca de correspondência deve estar assinalado com asterisco (*) e apresentar também o endereço completo.

Afiliação: Deve ser indicada a instituição à qual cada autor está afiliado, na seguinte ordem de hierarquias institucionais de afiliação: laboratório, setor, seção, serviço, divisão, departamento, instituto, faculdade e universidade.

Financiamento da pesquisa: Se a pesquisa foi subvencionada, indicar o tipo de auxílio, o nome da agência financiadora e o respectivo número do processo.

Apresentação prévia: Quando baseado em tese ou dissertação, indicar o nome do autor, título, ano, nome do programa de pós-graduação e instituição onde foi apresentada. Quando apresentado em evento científico, indicar o nome do evento, local e ano da realização.

2.2 PREPARO DO MANUSCRITO:

Resumo/Abstract: Todos os textos deverão ter resumos em português e inglês, dimensionados para ter até 200 palavras. Como regra geral, o resumo deve incluir objetivos do estudo, principais procedimentos metodológicos, principais resultados e conclusões.

Palavras-chave/keywords: Devem ser indicados entre 3 a 6 descritores do conteúdo, extraídos do vocabulário Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) da Bireme (disponível em <http://www.bireme.br>) nos idiomas português e inglês. Em inglês, com base no *Medical Subject Headings* (MeSH).

Caso não sejam encontrados descritores adequados para a temática do manuscrito, poderão ser indicados termos não existentes nos conjuntos citados.

Estrutura do texto:

A) Introdução: Deve ser breve, relatando o contexto e a justificativa do estudo, apoiados em referências pertinentes ao objetivo do manuscrito, sintetizando a importância e destacando as lacunas do conhecimento abordadas. Não deve incluir dados ou conclusões do estudo em referência

B) Material e Métodos: Os procedimentos adotados devem ser descritos claramente, bem como as variáveis analisadas, com a respectiva definição, quando necessária, e a hipótese a ser testada. Devem ser descritas a população e a amostra, instrumentos de medida, com a apresentação, se possível, de medidas de validade e conter informações sobre a coleta e processamento de dados. Deve ser incluída a devida referência para os métodos e técnicas empregados, inclusive os métodos estatísticos; métodos novos ou substancialmente modificados devem ser descritos, justificando as razões para seu uso e mencionando suas limitações. Os critérios

éticos da pesquisa devem ser respeitados; os autores devem explicitar que a pesquisa foi conduzida dentro de padrões éticos e foi aprovada por comitê de ética, indicando o nome do comitê de ética, número e data do registro.

C) Resultados: Devem ser apresentados em uma sequência lógica, iniciando-se com a descrição dos dados mais importantes. Tabelas e figuras devem ser restritas àquelas necessárias para argumentação e a descrição dos dados no texto deve ser restrita aos mais importantes. Os gráficos devem ser utilizados para destacar os resultados mais relevantes e resumir relações complexas. Dados em gráficos e tabelas não devem ser duplicados nem repetidos no texto. Os resultados numéricos devem especificar os métodos estatísticos utilizados na análise.

D) Discussão: A partir dos dados obtidos e resultados alcançados, os novos e importantes aspectos observados devem ser interpretados à luz da literatura científica e das teorias existentes no campo. Argumentos e provas baseadas em comunicação de caráter pessoal ou divulgadas em documentos restritos não podem servir de apoio às argumentações do autor. Tanto as limitações do trabalho quanto suas implicações para futuras pesquisas devem ser esclarecidas. Incluir somente hipóteses e generalizações baseadas nos dados do trabalho. As conclusões podem finalizar esta parte, retomando o objetivo do trabalho ou serem apresentadas em item separado.

E) Agradecimentos: Este item é opcional e pode ser utilizado para mencionar os nomes de pessoas que, embora não preencham os requisitos de autoria, prestaram colaboração ao trabalho. Será preciso explicitar o motivo do agradecimento, por exemplo, consultoria científica, revisão crítica do manuscrito, coleta de dados etc. Deve haver permissão expressa dos nomeados e o autor responsável deve anexar a Declaração de Responsabilidade pelos Agradecimentos. Também pode constar desta parte apoio logístico de instituições.

2.3 CITAÇÃO NO TEXTO: A exatidão das referências é de responsabilidade dos autores. Devem ser indicadas pelo seu número na listagem, na forma de expoente, sem uso de parênteses, colchetes e similares. Nos casos em que há citação do nome do autor, o número da referência deve ser colocado a seguir do nome do autor. Trabalhos com dois autores devem fazer referência aos dois autores ligados por “e”. Nos outros casos apresentar apenas o primeiro autor (seguido de et al, em caso de autoria múltipla).

Exemplos: Nos Estados Unidos e Canadá, a obrigatoriedade da declaração dos nutrientes no rótulo do alimento é mais antiga e foram desenvolvidos métodos hidrolíticos, como o AOAC 996.061, de extração e determinação da GT por cálculo a partir dos AG obtidos por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (GC/DIC)2,3.

Segundo Chang et al³¹, o aumento do tamanho das partículas resulta numa redução da área de superfície conferindo uma melhora na retenção e estabilidade das mesmas.

2.4 REFERÊNCIAS: Listadas ao final do texto, devem respeitar a quantidade definida para cada categoria de artigos aceitos pela RIAL. As referências devem ser normalizadas de acordo com o estilo *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication*, numeradas consecutivamente na ordem em que foram mencionadas a primeira vez no texto.

Os títulos de periódicos devem ser referidos de forma abreviada, de acordo com o Medline, disponível no endereço <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=journals>. Para consultar periódicos nacionais e latino-americanos: <http://portal.revistas.bvs.br/main.php?home=true&lang=pt>.

No caso de publicações com até seis autores, citam-se todos; acima de seis, citam-se os seis primeiros, seguidos da expressão latina “et al”. Referências de um mesmo autor devem ser organizadas em ordem cronológica crescente.

Exemplos:

Artigos de periódicos:

Aued-Pimentel S, Zenebon O. Lipídios totais e ácidos graxos na informação nutricional do rótulo dos alimentos embalados: aspectos sobre legislação e quantificação. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2009;68(2):121-6.

Weihrauch JL, Posati LP, Anderson BA, Exler J. Lipid conversion factors for calculating fatty acids contents of foods. *J Am Oil Chem Soc*. 1977;54:36-40.

Hennington EA. Acolhimento como prática interdisciplinar num programa de extensão. *Cad Saude Coletiva* [Internet]. 2005;21(1):256-65. Disponível em: [<http://www.scielo.br/pdf/csp/v21n1/28.pdf>].

Livros:

Ringsven MK, Bond D. *Gerontology and leadership skills for nurses*. 2ª ed. Albany (NY):Delmar Publishers;1996.

Lopez D, organizador. *Estudos epidemiológicos qualitativos*. São Paulo: James Martim; 2009.

Institute of Medicine (US). *Looking at the future of the Medicaid program*. Washington (DC): The Institute; 1992.

Foley KM, Gelband H, editors. Improving palliative care for cancer. Washington: National Academy Press 2001 [acesso 2003 Jul 13]. Disponível em: [http://www.nap.edu/catalog.php?record_id=10149].

Capítulos de livro:

Wirdh L. História da Epidemiologia. In: Lopez D, organizador. Estudos epidemiológicos qualitativos. São Paulo: James Martim; 2009.p.64-76.

Dissertações, teses e monografias:

Santos EP. Estabilidade química da manteiga da terra [dissertação de mestrado]. Bananeiras (PB): Universidade Federal da Paraíba;1995.

Moreschi ECP. Desenvolvimento e validação de métodos cromatográficos e avaliação da estabilidade de vitaminas hidrossolúveis em alimentos [tese de doutorado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2006.

Trabalhos de congressos, simpósios, encontros, seminários e outros:

Barboza et al. Descentralização das políticas públicas em DST/AIDS no Estado de São Paulo. III Encontro do Programa de Pós-Graduação em Infecções e Saúde Pública; agosto de 2004; São Paulo: Rev Inst Adolfo Lutz. p. 34 [resumo 32-SC].

Dados eletrônicos:

Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo – SABESP. O que fazemos/Qualidade da água. [acesso 2008 Set 17]. Disponível em: [http://www.sabesp.com.br/CalandraWeb/CalandraRedirect/?temp=4&proj=sabesp&pub=T&db=&doc].

Legislação:

Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil. Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1, nº7-E. p.45-53.

Autoria institucional:

Instituto Adolfo Lutz (São Paulo - Brasil). Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 4ª ed. [1ª ed. digital]. São Paulo (SP): Instituto Adolfo Lutz; 2008. Disponível em: [http://www.ial.sp.gov.br/index.php?option=com_remository&Itemid=7&func=select&orderby=1&Itemid=7].

Organización Mundial de la Salud – OMS. Como investigar el uso de medicamentos em los servicios de salud. Indicadores seleccionados del uso de medicamentos. Ginebra; 1993. (DAP. 93.1).

Patente:

Larsen CE, Trip R, Johnson CR, inventors: Novoste Corporation, assignee. Methods for procedures related to eletrophysiology of the heart. US patent 5,529,067. 1995 Jun 25.

Casos não contemplados nesta instrução devem ser citados conforme indicação do *Committee of Medical Journals Editors (Grupo Vancouver)*, disponível em: <http://www.cmje.org>.

Referências a documentos não indexados na literatura científica mundial, em geral de divulgação circunscrita a uma instituição ou a um evento (teses, relatórios de pesquisa, comunicações em eventos, dentre outros) e informações extraídas de documentos eletrônicos, não mantidas permanentemente em sites, se relevantes, devem figurar no rodapé das páginas do texto onde foram citadas.

2.5 NÚMEROS DE FIGURAS E TABELAS: A quantidade de figuras e tabelas de cada manuscrito deve respeitar a quantidade definida para cada categoria de artigos aceitos pela RIAL. Todos os elementos gráficos ou tabulares apresentados serão identificados como *figura* ou *tabela*, e numerados sequencialmente a partir de um, e não como *quadros*, *gráficos* etc.

A) Tabelas: Devem ser redigidas em processador de texto *Word for Windows* 2003 ou compatível e serem apresentadas em arquivos separados, numeradas consecutivamente com algarismos arábicos, na ordem em que foram citadas no texto. A cada uma deve-se atribuir um título breve, não se utilizando traços internos horizontais ou verticais. As notas explicativas devem ser limitadas ao menor número possível e colocadas no rodapé das tabelas e não no cabeçalho ou título. Se houver tabela extraída de outro trabalho, previamente publicado, os autores devem solicitar formalmente autorização da revista que a publicou, para sua reprodução.

B) Figuras: As ilustrações (fotografias, desenhos, gráficos etc.) devem ser citadas como Figuras, apresentadas em arquivos separados e numeradas consecutivamente com algarismos arábicos na ordem em que foram citadas no texto. Devem conter título e legenda apresentados na parte inferior da figura. Só serão admitidas para publicação figuras suficientemente claras e com qualidade digital que permitam sua impressão, preferencialmente no formato vetorial. No formato JPEG, a resolução mínima deve ser de 300 dpi. Figuras em cores serão publicadas quando for necessária à clareza da informação e os custos deverão ser cobertos pelos autores. Se houver figura extraída de outro trabalho, previamente publicado, os autores devem solicitar autorização, por escrito, para sua reprodução.

3. DECLARAÇÕES E DOCUMENTOS SOLICITADOS: Em conformidade com as diretrizes do *International Committee of Medical Journal Editors*, são solicitados alguns documentos e declarações do(s) autor(es) para a avaliação de seu manuscrito. Observe a relação dos documentos abaixo e, nos casos em que se aplique, anexe o documento ao processo. O momento em que tais documentos serão solicitados é variável:

Documento/declaração	Quem assina	Quando anexar
Carta de Apresentação	Todos	Submissão
Responsabilidade pelos Agradecimentos	Autor responsável	Aprovação
Transferência de Direitos Autorais	Todos	Aprovação

A carta de Apresentação do manuscrito, assinada por todos os autores, deve conter:

- Um parágrafo declarando a responsabilidade de cada autor: ter contribuído substancialmente para a concepção e planejamento ou análise e interpretação dos dados; ter contribuído significativamente na elaboração do rascunho ou na revisão crítica do conteúdo; e ter participado da aprovação da versão final do manuscrito. Para maiores informações sobre critérios de autoria, consulte a página do ICMJE (<http://www.icjme.org>).
- Um parágrafo contendo a declaração de potenciais conflitos de interesses dos autores.
- Um parágrafo contendo a declaração que o trabalho não foi publicado, parcial ou integralmente, em outro periódico. Todos os autores devem ler, assinar e enviar documento transferindo os direitos autorais. O artigo só será liberado para publicação quando esse documento estiver de posse da RIAL.

4. VERIFICAÇÃO DOS ITENS EXIGIDOS NA SUBMISSÃO:

1. Nome e instituição de afiliação de cada autor, incluindo e-mail e telefone do autor responsável.
2. Título do manuscrito, em português e inglês.
3. Texto apresentado em letras *Times New Roman*, corpo 12, em formato *Word* ou similar (doc, txt, rtf).
4. Resumos em dois idiomas, um deles obrigatoriamente em inglês.
5. Carta de Apresentação assinada por todos os autores.
6. Nome da agência financiadora e número(s) do processo(s).
7. No caso de artigo baseado em tese/dissertação, indicar o nome da instituição/Programa, grau e o ano de defesa.
8. Referências normalizadas segundo estilo Vancouver, ordenadas pela citação no texto e numeradas, e se todas estão citadas no texto.
9. Tabelas numeradas sequencialmente, com título e notas, e no máximo com 12 colunas, em formato *Word* ou similar (doc, txt, rtf).
10. Figura no formato vetorial ou 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