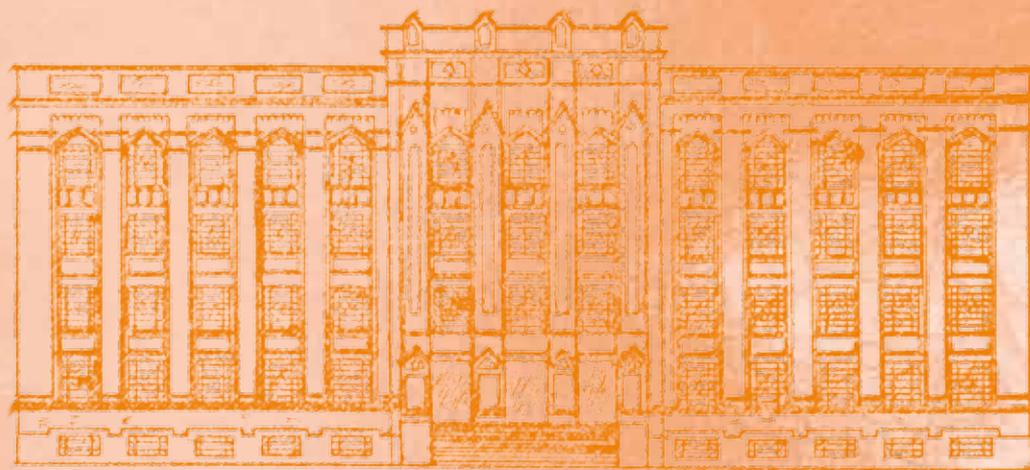


REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

ISSN 0073-9855
RIALA6



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE

Volume 69 número 4, 2010

ISSN 0073-9855



Governo do Estado de São Paulo
Secretaria de Estado da Saúde
Coordenadoria de Controle de Doenças
Instituto Adolfo Lutz

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Volume 69 número 4, 2010
Outubro - Dezembro 2010

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

Diretor Geral do Instituto Adolfo Lutz

Marta Lopes Salomão

Editor Chefe

Luís Fernando de Macedo Brígido

Editor Adjunto

Domingas Maria Aparecida Grispino Vieira Torres

Editores Assistentes

Adele Caterino-de-Araujo

Adriana Bugno

Luciana Juncioni de Arauz

Luzia Setuko Umeda Yamamoto

Maria Helena Iha

Márcia Liane Buzzo

Márcia Bittar Atuí

Neuza Kasumi Shirata

Núcleo de Acervo

Rocely Aparecida Bueno Moita

Conselho Editorial / Editorial Board

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

Luz Elena Cano Restrepo, Medellín, Colômbia.
Maria José Mendes Gianini, Araraquara, Brasil.
Marluce Bibbo, Pennsylvania, EUA.
Martin Emilio Munk, 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
2010, 69(4)

ISSN 0073-9855 CDD18614.07205

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>
http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_home&lng=pt&nrm=iso

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

▪ ARTIGOS DE REVISÃO/REVIEW ARTICLES

- 1312 **Câncer e modelos experimentais de tumores murinos**
Cancer and experimental models of mouse tumor
CLAUDIA PANTALEÃO, ADRIANA LUCHS.....439-445

▪ ARTIGOS ORIGINAIS/ORIGINAL ARTICLES

- 1313 **Condições sanitárias das águas de piscinas públicas e particulares**
Sanitary conditions of water from publics and privates swimming pools
FABIANA CORTEZ PIMENTEL, ANA CAROLINA BUCHALLA ALONSO, ANA RUTH PEREIRA DE MELLO, CÍCERO VÁGNER DE SOUSA, DANIEL SANTOS TAVARES, EDUARDO GONZALEZ, ESTEVÃO DE CAMARGO PASSOS, MARIA DE LOURDES PAIXÃO DA SILVA, MÁRIO TAVARES, ROBERTO CARLOS FERNANDES BARSOTTI.....446-452
- 1314 **Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp e cistos de *Giardia* spp em mananciais e águas de abastecimento público**
Occurrence of *Cryptosporidium* spp oocysts and *Giardia* spp cysts in water sources and public water supplies
REGINA CÉLIA ARANTES STANCARI, MARLENE CORREIA.....453-460
- 1315 **Influência de fatores climatológicos na ocorrência de microcistina**
Influence of climatic factors on the occurrence of microcystin
FERNANDO STOPATO DA FONSECA, VALTER RUVIERI, EDUARDO MAKOTO ONAKA, ROSANA LISBOA SANTANA, MARIA ANITA SCORSAFAVA, MYRNA SABINO.....461-466
- 1316 **Eficiência dos métodos microbiológicos e de ATP-bioluminescência na detecção da contaminação de diferentes superfícies**
Efficiency of microbiological and ATP-bioluminescence methodologies for detecting contaminants on different surfaces
TALITA DE OLIVEIRA, ANTONIO CARLOS VICTOR CANETTIERI.....467-474
- 1317 **Avaliação da resistência de *Salmonella* à ação de desinfetantes ácido peracético, quaternário de amônio e hipoclorito de sódio**
The resistance of *Salmonella* strains to the biocides peracetic acid, quaternary ammonium and sodium hypochlorite
Taís Raquel Marcon MACHADO, Patrícia da Silva MALHEIROS, Adriano BRANDELLI, Eduardo Cesar TONDO.....475-481
- 1318 **Resistência a oxacilina em *Staphylococcus* spp isolado de leite mastítico**
Oxacillin-resistance *Staphylococcus* spp isolated from mastitic milk
CRISTIANE MATOSO DINIZ, ROBERTA TORRES DE MELO, ELIANE PEREIRA MENDONÇA, LETÍCIA RÍSPOLI COELHO, BELCHIOLINA BEATRIZ FONSECA, DAISE APARECIDA ROSSI.....482-488

-
- 1319 **Condições higiênico-sanitárias, qualidade microbiológica e teste de susceptibilidade antimicrobiana de cepas isoladas de sanduíches comercializados por ambulantes**
 Hygienic-sanitary condition, microbiological quality and antimicrobial susceptibility of isolated strains from sandwiches sold in street markets
 LUCIANA FURLANETO-MAIA, MARCELO TEMPESTA DE OLIVEIRA², ANA FLÁVIA DE OLIVEIRA.....489-496
- 1320 ***Salmonella* Enteritidis: importância do inquérito epidemiológico, análise de alimentos e coprocultura na elucidação de 167 surtos alimentares**
Salmonella Enteritidis: the significance of the epidemiological investigation, analysis of food and fecal culture for elucidating 167 foodborne outbreaks
 MARISE SIMÕES, MARILU MENDES MOSCARDINI ROCHA, BEATRIZ PISANI, MARIA ÂNGELA GARNICA PRANDI, ENEIDA GONÇALVES LEMES-MARQUES.....497-502
- 1321 **Avaliação microbiológica do preparo de fórmula láctea infantil em lactário hospitalar**
 Microbiological quality in preparing the infant milk formula in hospital milk dispensary
 PAMELA ROSSI, DIRCE YORIKA KABUKI, ARNALDO YOSHITERU KUAYE.....503-509
- 1322 **Avaliação microbiológica da polpa de cajá conservada por métodos combinados**
 Microbiological evaluation of the yellow mombin pulp preserved by combined methods
 LEÔNIDAS FRANCISCO DE QUEIROZ TAVARES FILHO, ROSSANA CATIE BUENO DE GODOY, ELISA TESHIMA, RICARDO LUÍS CARDOSO, PALOMA ROMEIRO SAMPAIO BARBOSA, DIMITRI NEIVA LEMOS DE SANTANA.....510-517
- 1323 ***Campylobacter* spp em carne de ave crua: avaliação da etapa de resfriamento**
Campylobacter spp in fresh meat poultry: chilling step assessment
 LUCILLA IMBROINISE AZEREDO, ROSA HELENA LUCHESE, ANA LUZIA LAURIA-FILGUEIRAS.....518-524
- 1324 **Alimentos embalados que compõem as cestas básicas: avaliação microscópica e da rotulagem**
 Packaged foods composing the “basic baskets”: microscopic and labeling assessment
 VILMA DOS SANTOS MENEZES GAIOTTO DAROS, SONIA DE PAULA TOLEDO PRADO, MARIA HELENA MARTINI, REJANE ALEXANDRE SILVA GRACIANO, REGINA CÉLIA ARANTES STANCARI, ZENAIDE MARTINS GONZAGA, PAULO FLÁVIO TEIXEIRA CHIARINI, ISABEL TACACO YAMAMOTO, MARIA DE LOURDES PAIXÃO SILVA, AUGUSTA MENDES DA SILVA, MARIA APARECIDA MORAES MARCIANO, MÁRCIA DIMOV NOGUEIRA, MÁRCIA BITTAR ATUI.....525-530
- 1325 **Qualidade proteica e eficiência alimentar de farinhas integrais de linhaça obtidas de sementes cruas e submetidas a tratamento térmico**
 Protein and food qualities of brown flaxseed whole flour from the raw and heat-treated seeds
 ÉRICA AGUIAR MORAES, JÚLIA CRISTINA CARDOSO CARRARO, MARIA INÊS DE SOUZA DANTAS, NEUZA MARIA BRUNORO COSTA, SÔNIA MACHADO ROCHA RIBEIRO, HERCIA STAMPINI DUARTE MARTINO.....531-536
- 1326 **Tratamento térmico adequado proporciona melhoria da qualidade nutricional de farinhas de soja elaboradas a partir de novos cultivares destinados à alimentação humana**
 Adequate heat treatment improves the nutritional quality of soybean flours from new cultivars for human consumption purpose
 GLAUCIA FERREIRA ANDRADE, MARIA INÊS DE SOUZA DANTAS, NEWTON DINIZ PIOVESAN, RENATO MOREIRA NUNES, EVERALDO GONÇALVES DE BARROS, NEUZA MARIA BRUNORO COSTA, HÉRCIA STAMPINI DUARTE MARTINO.....537-544

- 1327 **Índices de qualidade nutricional da fração lipídica do leite de búfalas da raça Murrah produzido em diferentes fases de lactação**
Nutritional quality indexes of lipid fraction of milk of Murrah buffalo, produced at different stages of lactation
LUCIANA ALBUQUERQUE CALDEIRA, SIBELLI PASSINI BARBOSA FERRÃO,
SÉRGIO AUGUSTO DE ALBUQUERQUE FERNANDES, ANA PRUDÊNCIA ASSIS MAGNAVITA,
TAYSE DANTAS REBOUÇAS SANTOS.....545-554
- 1328 **Propriedades reológicas da gelatina obtida a partir de pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*)**
Rheological properties of gelatin from skin of tilápia (*Oreochromis niloticus*)
ALEXANDRE DA TRINDADE ALFARO, EDILSON FERREIRA DA SILVA.....555-561
- 1329 **Avaliação da estabilidade química de sardinhas-verdadeiras (*Sardinella brasiliensis*) inteiras e evisceradas armazenadas sob refrigeração**
The chemical stability of whole and eviscerated Brazilian sardines (*Sardinella brasiliensis*) stored under refrigeration
SABRINA DA COSTA SILVA ANDRADE, ELIANE TEIXEIRA MÁRSICO, LOURDES MARIA PESSOA MASSON,
CARLOS FREDERICO MARQUES GUIMARÃES.....562-566
- **COMUNICAÇÃO BREVE/BRIEF COMMUNICATION**
- 1330 **Aflatoxinas em amendoim: melhoria da qualidade e programas de controle**
Aflatoxins in peanut: quality improvement and control programs
LUZIA SHUNDO, SANDRA APARECIDA NAVAS, VALTER RUVIERI, JANETE ALABURDA,
LEDA CONCEIÇÃO ANTONIA LAMARDO, MYRNA SABINO.....567-570
- 1331 **Avaliação microbiológica da alimentação servida aos passageiros de um navio de cruzeiro na temporada 2009/2010. Detecção de *Bacillus cereus* em refeição à base de peixe**
Microbiology evaluation of the meal served to passengers in a ship cruiser in the 2009/2010 season. Detection of *Bacillus cereus* in the fish-based meal
ESTEVÃO DE CAMARGO PASSOS, ANA RUTH PEREIRA DE MELLO, CÍCERO VAGNER DE SOUSA,
ANA CAROLINA BUCHALLA ALONSO, EDUARDO GONZALEZ, MÁRIO TAVARES.....571-575
- 1332 **Ocorrência de fungos filamentosos de importância médica em água de bebedouros**
Filamentous fungi of medical importance in drinking water
ANDRÉ FERRAZ GOIANA LEAL*, DANIELLE PATRÍCIA CERQUEIRA MACÊDO, CRISTINA MARIA DE SOUZA-MOTTA,
MARIA JOSÉ DOS SANTOS FERNANDES, OLIANE MARIA CORREIA MAGALHÃES, REJANE PEREIRA NEVES.....576-579
- 1333 **Aplicação da análise microscópica na investigação de espinhos de *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (Figo da Índia) presentes em alimento**
Microscopic analysis of glochidia of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (Indian Fig *Opuntia*) occurring in food
SONIA DE PAULA TOLEDO PRADO, ADRIANA SALATINI ABUD, MARIA HELENA PIRES,
EMERSON RICARDO PANSARIN.....580-583
- 1334 **Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus reuteri* contra bactérias de interesse alimentar**
Antimicrobial activity of *Lactobacillus reuteri* against bacteria of nourishment concern
HELEN SILVESTRE DA SILVA, ROBERTA JULIANO RAMOS, ANDRÉIA CIROLINI, MARÍLIA MIOTTO,
ANDRESSA MARA BASSEGIO, CLEIDE ROSANA WERNECK VIEIRA.....584-587
- **NOTA CIENTÍFICA/SHORT COMMUNICATION**
- 1335 **Total lipids, cholesterol and fatty acids composition of ostrich eggs: a methodological approach**
Lipídios totais, colesterol e composição de ácidos graxos de ovos de avestruz: uma abordagem metodológica
JAILANE DE SOUZA AQUINO, JOÃO ANDRADE DA SILVA.....588-594

▪ RESUMOS DE TESES E DISSERTAÇÕES	
Use of the real-time polymerase chain reaction in the HTLV-1 and HTLV-2 infections diagnostic testing algorithm	
Introdução da reação em cadeia da polimerase em tempo real no algoritmo de testes laboratoriais para o diagnóstico de infecção por HTLV-1 e HTLV-2	
COSTA EAS.....	595
Atividade antioxidante dos extratos de shiitake (<i>Lentinus edodes</i>) e de cogumelo do sol (<i>Agaricus blazei</i>) aplicados em óleo de soja sob aquecimento	
Antioxidant activity of shiitake (<i>Lentinus edodes</i>) and sun mushroom (<i>Agaricus blazei</i>) extracts applied in soybean oil under heating	
SILVA, AC.....	596
Influência de hábitos maternos na concentração de bifenilos policlorados (PCBs) em soro de cordão umbilical	
Influence of maternal habits on polychlorinated biphenyls (PCBs) concentration in umbilical cord serum	
MOHR, S.....	597
▪ ERRATA.....	598
▪ COLABORADORES.....	599
▪ INSTRUÇÕES AOS AUTORES.....	604

Câncer e modelos experimentais de tumores murinos

Cancer and experimental models of mouse tumor

RIALA6/1312

Claudia PANTALEÃO¹, Adriana LUCHS^{2*}

*Endereço para correspondência: ²Núcleo de Doenças Entéricas, Centro de Virologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil, Av. Dr. Arnaldo, 355 CEP 01246-902, São Paulo/SP, Brasil. Fone: 11 3068-2909. Fax: 11 3085-3505. E-mail: driluchs@gmail.com

¹Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

Recebido: 04.06.2010 – Aceito para publicação: 10.10.2010

RESUMO

Nos últimos anos, a pesquisa do câncer proporcionou avanços importantes quanto à complexidade de desenvolvimento do tumor, em particular, sobre os mecanismos moleculares que são a base da transformação progressiva de células normais em derivados altamente malignos. A análise molecular do desenvolvimento tumoral em pacientes não é trivial, pois necessita da disponibilidade de biópsias em diversos estágios de transformação. Além disso, os estudos dos processos de metástase, de angiogênese e da resposta imune contra os tumores *in vitro* não mimetizam o que ocorre *in vivo*. Por esta razão, os modelos murinos experimentais de câncer têm desempenhado papel vital na compreensão da tumorigênese e suas relações com o ambiente *in vivo*, em que existe a dificuldade de avaliação de novos métodos diagnósticos e as ações terapêuticas de drogas contra tumores em pacientes. Nesta revisão, são discutidas as abordagens experimentais, técnicas e estratégias utilizadas no estudo de tumores em modelos murinos com ênfase na resposta imune contra o câncer e, ainda, as limitações conceituais e clínicas de cada sistema na sua aplicação no estudo do câncer em humanos.

Palavras-chave. câncer, imunologia, tumor experimental, modelos murinos, tumorigênese, células tumorais.

ABSTRACT

Over the past years, cancer research has gained important insights on the complexity of tumor development, particularly on the molecular mechanisms that underlie the progressive transformation of normal cells into malignant derivatives. The molecular analysis of tumor development in patient is not meaningless, because of the unavailability of biopsies from different tumor transformation stages. Furthermore, studies on metastasis, angiogenesis and the immune response to *in vitro* tumors processes, do not simulate what occur *in vivo*. For this reason, the murine experimental cancer models have played a vital role in understanding the tumorigenesis and its relation with the *in vivo* environment, because it is difficult to assess the novel diagnostic methodologies and the anticancer therapeutic drugs in patients. In the present review, the experimental approach, techniques and strategies used in the study on murine cancer models are considered, emphasizing the immune response against cancer, and also the conceptual and clinical limitations of each system and their applications in the human cancer study.

Key words. cancer, immunology, experimental tumor, murine models, tumorigenesis, tumor cells.

INTRODUÇÃO

Câncer é um nome genérico dado a uma grande variedade de doenças complexas caracterizadas pelo crescimento celular descontrolado. O desenvolvimento do câncer é dependente não apenas de mudanças ocorridas dentro da própria célula transformada, como também de interações entre essas células e o seu microambiente¹. O câncer deriva de alterações genéticas e algumas mudanças fisiológicas na célula são fundamentais para que a doença se manifeste. Dentre essas alterações, Hanahan e Weinberg² enumeram seis que são consideradas essenciais na fisiologia celular e que possibilitam o crescimento tumoral: autossuficiência em sinais de crescimento, insensibilidade a sinais de inibição de crescimento, evasão da apoptose, potencial replicativo ilimitado, manutenção da angiogênese e, finalmente, invasão tecidual e metástase.

De modo geral, os cânceres podem ser classificados em Carcinomas – neoplasias originárias de tecidos epiteliais (epidermóides, quando originado de epitélio; e adenocarcinomas, quando originários de ductos e/ou glândulas), sarcomas (neoplasias originárias de tecidos conjuntivos, de preenchimento ou de sustentação), leucemias (neoplasias originárias de medula) e linfomas (neoplasias originárias de tecidos linfóides)³.

Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) demonstraram em 2005, que de um total de 58 milhões de mortes no mundo, 7,6 milhões (cerca de 13%) ocorreram devido ao câncer e, projeta-se que o número de mortes devido a cânceres continuará crescendo: 9 milhões de mortes em 2015 e 11,4 milhões em 2030. No Brasil, dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) mostraram uma estimativa de 460 mil novos casos de cânceres, entre homens e mulheres, para os anos de 2008 e 2009³.

Esta revisão resume as abordagens experimentais utilizadas no estudo de tumores em modelos murinos, discute técnicas e estratégias, bem como as limitações conceituais e clínicas dos sistemas em sua aplicação no estudo do câncer humano.

MODELOS EXPERIMENTAIS DE TUMOR

Inúmeros esforços foram empregados nas últimas décadas para a compreensão do processo de tumorigênese. A maior parte do conhecimento a respeito de carcinogênese provém da análise *in vitro* de tecidos tumorais em estágios avançados de desenvolvimento, removidos a partir de pacientes. Essa prática elucidou muitas questões

referentes a mudanças genômicas apresentadas pelas células tumorais, mas pouco contribuiu na obtenção de informações sobre os fatores que influenciam os estágios iniciais do seu desenvolvimento *in vivo*¹.

Vários modelos animais foram desenvolvidos nas últimas décadas, visando elucidar diversas questões referentes ao câncer *in vivo*. A utilização de camundongos como instrumentos de estudos biológicos ocorre de modo intenso, principalmente nas áreas de imunologia, oncologia e genética. Essa prática ocorre por diversas razões, dentre elas, o fato das linhagens de camundongos serem altamente padronizadas, possuírem características conhecidas e monitoradas após várias gerações, além do fato de compartilharem similaridades genéticas e fisiológicas com os humanos, permitindo que múltiplas características da doença sejam estudadas nestes modelos⁴.

Existem critérios fundamentais para que um modelo tumoral murino possa ser utilizado no esclarecimento da tumorigênese: origem e progressão clonal do tumor; evidências da progressão tumoral; patologia e histologia tumoral semelhantes à doença em humanos; possibilidade de estudar aspectos de invasão tecidual e o papel da resposta imune contra tumores; padrões de expressão gênica e a possibilidade de estudo de terapias antitumorais⁴.

Diversos estudos têm utilizado a tecnologia de transfecção de tumores com proteínas fluorescentes para monitorar os tumores *in vivo* e aprimorar o conhecimento da progressão tumoral e metástase^{5,6}. Essas técnicas permitem observar micrometástase *in vivo*, processo que não pode ser detectado por métodos clássicos⁷. Nessa linha, foram publicados trabalhos que avaliaram padrões fisiopatológicos de alguns tumores guiados pela expressão da proteína EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*) *in vivo*, tais como os tumores de pulmão⁸, de cérebro⁹, de mama¹⁰ e de carcinoma de cólon¹¹.

Os modelos tumorais murinos transgênicos atuais mimetizam precisamente a sua contraparte humana e, possuem aplicações potenciais nos testes de eficácia de novas terapias anticâncer. Um dos modelos mais promissores de camundongo transgênico deriva de animais construídos para apresentar instabilidade genômica. Esses modelos desenvolvem cânceres semelhantes aos humanos e são utilizados no estudo e compreensão de eventos moleculares que ocorrem nos estágios mais primordiais da tumorigênese *in vivo*¹.

Outros modelos tumorais são desenvolvidos a partir de implantes xenográficos dos tumores humanos

em camundongos imunologicamente comprometidos¹². Dentre os exemplos do uso desses modelos estão o estudo do tratamento hormonal em implantes de linhagens tumorais de mama em camundongos atímicos (*nude*), os quais não apresentam linfócitos T maduros¹³; a criação de uma linhagem altamente tumorigênica e metastática de melanoma humano para o estudo do crescimento, metástase e expressão de moléculas em camundongo atímico¹⁴; e o estudo da destruição óssea causados pela inoculação de mieloma em camundongos SCID (*Severe Combined Immunodeficiency*), os quais não apresentam linfócitos T nem B¹⁵. O uso desses modelos murinos no estudo da eficácia clínica é uma questão importante, já que cada modelo apresenta vantagens e fraquezas inerentes, espelhando o processo extremamente complexo da carcinogênese humana. As diferenças em tamanho e fisiologia, bem como as variações na homologia entre ratos e seres humanos, acarretam em limitações de translação¹². Há duas desvantagens principais no uso desses modelos xenográficos: não permitem o estudo do desenvolvimento tumorigênico e o câncer tratado como uma doença celular isolada e não como o resultado da interação tumor-hospedeiro¹⁶.

O entendimento biológico de que o câncer é uma doença genética e de que o comportamento irregular da célula cancerígena se deve a alterações genéticas e epigenéticas complexas, levou ao desenvolvimento de modelos experimentais mais sofisticados, nos quais camundongos são geneticamente manipulados para expressar ou não determinadas moléculas, tais como a superexpressão de oncogenes ou a inibição de genes supressores tumorais. O papel desempenhado pelos oncogenes e/ou pelos genes supressores tumorais são estudados em modelos animais experimentais, os quais transportam deleções e/ou mutações gênicas, as quais foram inicialmente identificadas em amostras teciduais provenientes de pacientes. A riqueza dos dados gerados, a partir desses modelos sobre as funções biológicas dos genes e das vias de sinalização envolvidas no processo tumoral, permitiu a construção do conceito atual de metástase¹⁷. A superexpressão de oncogenes também está relacionada à indução de tumores. O trabalho de Arbeit et al¹⁸ demonstrou que camundongos modificados e superexpressando os genes E6 e E7 do HPV (*Human Papiloma Vírus*) apresentaram carcinogênese de células neuroepiteliais e tumores cerebrais entre os 4 e 10 meses de idade.

A superexpressão de oncogenes em camundongos geneticamente modificados é uma técnica discutível,

uma vez que não mimetiza os estágios iniciais do desenvolvimento tumoral. Porém, esse fato não exclui a possibilidade de que os eventos moleculares e celulares subsequentes apresentados pelos modelos possam ser importantes para desvendar questões relacionadas à biologia dos tumores. A inibição de genes supressores tumorais também está associada ao surgimento de tumores, sendo considerada menos artificial como modelo experimental, uma vez que o aparecimento da doença em humanos ocorre justamente devido à perda de função destes genes. Um exemplo da utilização desse tipo de modelo experimental está no desenvolvimento de camundongos heterozigotos para o gene *p53*. Esta molécula supressora tumoral tem sido denominada como “guardiã do genoma” devido a sua habilidade em bloquear o ciclo celular de células que sofreram algum tipo de dano no DNA¹⁹ e/ou induzir morte por apoptose. Nestes modelos, o desenvolvimento tumoral ocorre aos 18 meses em camundongos heterozigotos e aos 4 meses e meio nos camundongos deficientes em *p53*²⁰.

Vale ressaltar que as modificações genéticas que levam ao desenvolvimento tumoral, muitas vezes requerem mais de uma alteração, e não somente a expressão de oncogenes ou a perda de função de genes supressores tumorais. A fim de esclarecer essas contribuições foram desenvolvidos modelos murinos que superexpressam ou nocauteiam mais de um gene envolvido no aparecimento da doença. Um exemplo é o trabalho de Johnson et al²¹, o qual desenvolveu linhagens de camundongos que carregam o alelo do gene *K-ras*. Esse gene pode ser ativado por recombinação espontânea em todo o animal e resulta no aparecimento de diversos tumores, entre eles tumores pulmonares. Ao nocautear o gene *p53*, em tumores que possuem a mutação de *K-ras*, os autores caracterizaram um modelo experimental ainda mais agressivo do que o anterior.

Foram desenvolvidos, ainda, modelos murinos experimentais que permitem a expressão de oncogenes de maneira condicional, possibilitando a expressão e a reversão dessa expressão (sistemas *Cre-loxP*, Tet-On). Com esses modelos, descobriu-se que a expressão contínua do gene alterado é necessária para a manutenção do tumor em alguns casos, dando suporte a ideia de que seriam alvos terapêuticos interessantes^{4,22}. A utilização desses modelos também permitiu descobrir que a expressão do gene *Bcr-abl* durante o desenvolvimento do camundongo tem efeito tóxico devido à atividade tirosina-quinase da proteína. Esse efeito pode ser evitado através da expressão condicional do gene *Bcr-abl*, mas somente em células de medula óssea^{23,24}.

VIGILÂNCIA IMUNOLÓGICA CONTRA TUMORES

Segundo Sengupta et al²⁵, o artigo original publicado por Burnet e Thomas em 1957, apresentou a hipótese de que o sistema imune seria capaz de reconhecer e destruir células transformadas. Essa teoria foi chamada de vigilância imunológica (*immunosurveillance*) e acreditava-se que esse processo era um importante mecanismo de proteção do hospedeiro na inibição da carcinogênese e manutenção da homeostase celular. Também foi sugerido que a vigilância imunológica seria a etapa inicial de um processo mais amplo chamado edição imunológica de tumores (*immunoediting*).

A edição imunológica de tumores é a habilidade do sistema imune em controlar e moldar o câncer, sendo esse processo composto por 3 fases: fase de eliminação, fase de equilíbrio e fase de escape. Essas fases podem funcionar de maneira independente ou em sequência. A fase de eliminação é anterior ao aparecimento dos sintomas clínicos. Nessa fase, as células do sistema imune inato reconhecem a presença do tumor em crescimento, o qual gera danos teciduais locais, causados pela remodelagem estromal. Essa remodelagem induz uma resposta inflamatória essencial para o recrutamento das células do sistema imune inato em direção ao sítio do tumoral. Durante esse processo, os linfócitos infiltradores, tais como as células NK (*Natural Killers*), são estimulados a produzir interferon-gama (IFN- γ), o qual induz a morte da célula tumoral^{25,26,27}. Corroborando este conceito, estudos mostraram que deficiências em IFN- γ e perforina aumentam a susceptibilidade à tumores induzidos, tanto quimicamente quanto espontâneos²⁶. A participação de células NK também foi demonstrada em estudos utilizando camundongos desprovidos dessa população celular. Os animais deficientes são mais susceptíveis ao aparecimento de tumores induzidos quimicamente em comparação a animais controles²⁶.

Quimiocinas também são produzidas durante a fase de eliminação, as quais exercem um papel importante na progressão tumoral, prevenindo a angiogênese. Ainda na fase de eliminação, células NK e macrófagos são capazes de ativar um ao outro através de uma via recíproca de produção de IFN- γ e interleucina-12 (IL-12). A morte das células tumorais ocorre via apoptose, com produção de oxigênio reativo e intermediários de nitrogênio. Finalmente, as células T CD4+, específicas para tumor, e células T CD8+ se dirigem para o sítio tumoral, onde os linfócitos T citolíticos destroem o antígeno apresentado pelas células tumorais²⁵. Foi demonstrado que tumores

induzidos química ou espontaneamente surgem mais rapidamente e em alta frequência nos camundongos deficientes em linfócitos T e B maduros, quando comparados a animais controles. Dessa forma, os animais que possuem linfócitos parecem estar mais protegidos contra o aparecimento de tumores²⁶.

Desafiando os mecanismos descritos acima e a destruição das células tumorais pelo sistema imune, algumas células cancerígenas são capazes de resistir e sobreviver à pressão exercida pela vigilância imunológica, dando origem a variantes com mutações que conferem resistência ao ataque do sistema imune do hospedeiro, permitindo que o tumor entre na fase de equilíbrio²⁶. As células tumorais resistentes que sobreviveram à fase de eliminação e passaram pela fase de equilíbrio entram na fase de escape²⁵. Nessa fase, as células tumorais continuam a crescer dentro do hospedeiro e a expandir de uma maneira descontrolada, sendo então consideradas células tumorais editadas, os quais podem eventualmente levar a malignidade. Para escapar dessa pressão, alguns tumores perdem a expressão de moléculas de MHC (*Major Histocompatibility Complex*) de classe I e, assim, escapam do ataque dos linfócitos T citotóxicos, os quais são restritos à apresentação de antígenos no contexto do MHC. Outra alteração observada em tumores editados é a secreção de citocinas imunossupressoras que inibem as respostas do hospedeiro²⁶.

Avanços significativos são realizados continuamente no campo da imunologia do câncer e da imunoterapia. Uma melhor compreensão dos mecanismos de escape e daqueles envolvidos na supressão do sistema imune poderá auxiliar no desenvolvimento de protocolos novos e mais eficientes na área da imunoterapia clínica²⁸.

MODELOS MURINOS EXPERIMENTAIS PARA A INVESTIGAÇÃO DA VIGILÂNCIA IMUNOLÓGICA CONTRA TUMORES

O conceito de vigilância imunológica foi proposta há várias décadas, mas só recentemente é que a teoria tem sido rigorosamente examinada. Com o advento das tecnologias de supressão (*knockout*), a vigilância imunológica pôde ser evidenciada em camundongos e humanos. Modelos tumorais murinos de surgimento espontâneos ou quimicamente induzidos têm sido úteis na demonstração de que o sistema imunológico vigia constantemente o aparecimento de células aberrantes e desempenha papel fundamental na prevenção da formação de tumores^{25,26}.

Utilizando linfoma T murino, alguns trabalhos conseguiram elucidar as funções de determinadas células do sistema imune na vigilância imunológica contra tumores. Como demonstrada pela teoria do *missing self*, a qual sugeriu que as células NK são capazes de reconhecer de forma eficiente e, eliminar tumores que não expressam MHC de classe I na superfície celular²⁹. Células tumorais que apresentam esse defeito são frequentemente encontradas em cânceres humanos e são capazes de escapar do reconhecimento pelos linfócitos T citotóxicos, os quais dependem da apresentação de antígenos na molécula MHC de classe I. Contudo, a expressão de antígenos de MHC de classe I em tumores não está necessariamente associada à susceptibilidade ao ataque pelos linfócitos T citotóxicos. Isso pode ocorrer, por exemplo, quando não há peptídeos derivados de antígenos tumorais ligados ao MHC I ou quando há a coexpressão de moléculas imunossupressoras³⁰.

No trabalho de Karre et al²⁹, o estudo sobre o mecanismo de ataque que as células NK desempenham contra tumores foi realizado utilizando-se duas linhagens celulares denominadas RMA e RMA-S. Em 1985, os autores geraram estas linhagens celulares durante o desenvolvimento de um estudo que tinha por objetivo obter estirpes tumorais que não expressavam moléculas de MHC de classe I na superfície celular, a fim de observar os mecanismos de vigilância imunológica no caso de tumores que escapavam ao ataque de linfócitos T citotóxicos. Para tal, os autores induziram mutações genéticas na linhagem celular RBL-5 (linfoma T induzido por vírus Rauscher), sendo, então, selecionada através de exposição, ou não, a anticorpos anti-MHC I e ao sistema complemento. As células que não foram expostas aos anticorpos e ao sistema complemento receberam o nome de RMA e as células que sobreviveram a exposição e que, portanto, foram selecionadas a expressar baixos níveis de MHC de classe I na superfície celular, receberam o nome de RMA-S. Posteriormente, descobriu-se que uma das mutações ocorridas nesta última linhagem era a deficiência da molécula responsável em transportar as proteínas citoplasmáticas para o retículo endoplasmático – TAP 2 (*Transporter Associated with Antigen Processing 2*)^{31,32,33}. A formação do complexo MHC de classe I e peptídeo são iniciados no retículo endoplasmático. O peptídeo degradado é levado do citosol para dentro do retículo endoplasmático pelas moléculas transportadoras, TAP 1 e TAP 2³⁴, que estabilizam a molécula de MHC de classe I ao se ligarem a ela. Após a formação do complexo, este é expresso na superfície celular para que os peptídeos

citosólicos sejam apresentados aos linfócitos T CD8+³⁵ e, com isso, promover o reconhecimento de moléculas próprias ou não próprias do organismo. Com a ausência da molécula TAP 2, os peptídeos citoplasmáticos não são transportados para o interior do retículo endoplasmático e, conseqüentemente, não se ligam a molécula de MHC de classe I, a qual fica instável e não é expressa de maneira adequada na superfície celular. Portanto, a linhagem RMA-S praticamente não expressa esta molécula na superfície celular e, dessa forma, as proteínas citosólicas não podem ser reconhecidas pelos linfócitos T citotóxicos^{31,32,33}.

Sabapathy e Nam³⁶ descreveram outra diferença entre essas duas linhagens celulares, onde a molécula p53, ao invés de se encontrar no compartimento nuclear, se acumula no compartimento citosólico de células RMA-S. Normalmente, quando essa molécula é ativada por sinais de estresse, migra para o núcleo celular, onde se liga a seqüências responsivas no genoma e transcreve inúmeros genes, dentre eles, vários relacionados à indução de morte por apoptose. Por não apresentarem essa translocação de p53 do citosol para o núcleo, as células RMA-S se tornam mais resistentes à indução de morte por apoptose por ambas as vias: extrínseca e/ou intrínseca^{37,38}.

Utilizando-se as duas linhagens tumorais descritas, alguns mecanismos de ação efetora das células NK contra tumores foram elucidados, tais como a importância da IL-12 na imunidade inata e adquirida na supressão de tumores³⁹.

Humblet et al⁴⁰ demonstraram que camundongos irradiados de forma letal desenvolviam linfomas de células do timo após 1 ano. Quando estes animais eram submetidos a um enxerto com células normais de medula óssea após 2 e 10 dias de irradiação, tornavam-se protegidos contra o aparecimento de linfomas. Porém, o mesmo não ocorria se o enxerto fosse realizado após 15 e 30 dias de irradiação. Esses dados demonstraram que as células pré-tumorais sofriam alterações intrínsecas após 15 dias, tornando-se resistentes ao ataque das células de medula óssea enxertada.

CONCLUSÃO

O desenvolvimento de terapias efetivas contra o câncer é um objetivo importante e presente nas ciências biomédicas modernas. O estudo de modelos revela as complexas interações entre as células tumorais e o seu ambiente, onde a progressão tumoral e a metástase são promovidas e moduladas.

O papel de vários genes supressores e oncogenes foram estudados funcionalmente em modelos murinos, e

isso tem permitido abordar novos conceitos e mecanismos subjacentes à doença. Embora muitos camundongos geneticamente modificados sejam gerados, as limitações dos modelos murinos incluem diferenças de componentes moleculares entre as espécies e perfis diferentes de expressão gênica, dificultando a aplicação direta desses conhecimentos no tratamento de pacientes. Porém, o conhecimento acumulado, a partir do estudo de modelos animais, permitiu superar obstáculos e avançar em uma ampla gama técnico-metodológica¹.

Projetos de humanização de camundongos são desenvolvidos com o objetivo de mimetizar um sistema imunológico humano parcial em ratos, e no futuro, esses animais poderão gerar populações de células humanas. Em suma, os modelos murinos caracterizam métodos poderosos para elucidar os mecanismos subjacentes à progressão tumoral e a metástase, além de permitir o desenvolvimento de drogas específicas para o tratamento de pacientes com câncer.

REFERÊNCIAS

1. Conmy S, Nasheuer HP. The use of transgenic mice in cancer and genome stability research. *Subcell Biochem* 2010;50:325-36.
2. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100(1):57-70.
3. Instituto Nacional de Câncer - INCA. Atlas TNM. Classificação de Tumores Malignos. 6ª ed. Springer - Verlag; 2004.
4. Hann B, Balmain A. Building validated mouse models of human cancer. *Curr Opin Biol* 2001;13(6):778-84.
5. Kim HS, Cho HR, Choi SH, Woo JS, Moon WK. In vivo imaging of tumor transduced with bimodal lentiviral vector encoding human ferritin and green fluorescent protein on a 1.5T clinical magnetic resonance scanner. *Cancer Res* 2010;70(18):7315-24.
6. Wei S, Sun Y, Yang Z, Song Y. Establishment of orthotopic lung cancer model expressing enhanced green fluorescent protein. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi* 2010;13(7):670-5.
7. Kaneko K, Yano M, Yamano T, Tsujinaka T, Miki H, Akiyama Y et al. Detection of peritoneal micrometastases of gastric carcinoma with green fluorescent protein and carcinoembryonic antigen promoter. *Cancer Res* 2001;61(14):5570-4.
8. Huang DC, Cory S, Strasser A. Bcl-2, Bcl-XL and adenovirus protein E1B19kD are functionally equivalent in their ability to inhibit cell death. *Oncogene* 1997;14(4):405-14.
9. MacDonald TJ, Tabrizi P, Shimada H, Zlokovic BV, Laug WE. Detection of brain tumor invasion and micrometastasis in vivo by expression of enhanced green fluorescent protein. *Neurosurgery* 1998;43(6):1437-42.
10. Li X, Wang J, An Z, Yang M, Baranov E, Jiang P et al. Optically imageable metastatic model of human breast cancer. *Clin Exp Metastasis* 2002;19(4):347-50.
11. Sturn JW, Keese MA, Petruch B, Bonninghoff RG, Zhang H, Gretz N et al. Enhanced green fluorescent protein-transfection of murine colon carcinoma cells: key for early tumor detection and qualification. *Clin Exp Metastasis* 2003;20(5):395-405.
12. de Jong M, Maina T. Of mice and humans: are they the same? - Implications in cancer translational research. *J Nucl Med* 2010;51(4):501-4.
13. Clarke R. Human breast cancer cell line xenografts as models of breast cancer. The immunobiologies of recipient mice and the characteristics of several tumorigenic cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 1996;39(1):69-86.
14. van Muijen GN, Jansen KF, Cornelissen IM, Smeets DF, Beck JL, Ruiter DJ. Establishment and characterization of a human melanoma cell line (MV3) which is highly metastatic in nude mice. *Int J Cancer* 1991;48(1):85-91.
15. Roodman GD. Mechanisms of bone lesions in multiple myeloma and lymphoma. *Cancer* 1997;80(Suppl 8):1557-63.
16. Hillman GG, Singh-Gupta V, Al-Bashir AK, Zhang H, Yunker CK, Patel AD et al. Dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging of sunitinib-induced vascular changes to schedule chemotherapy in renal cell carcinoma xenograft tumors. *Transl Oncol*. 2010;3(5):293-306.
17. Kim IK, Baek SH. Mouse models for breast cancer metastasis. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;394(3):443-7.
18. Arbeit JM, Munger K, Howley PM, Hanahan D. Neuroepithelial carcinomas in mice transgenic with human papillomavirus type 16 E6/E7 ORFs. *Am J Pathol* 1993;142(4):1187-97.
19. Lane DP. Cancer. P53, guardian of the genome. *Nature* 1992;358(6381):15-6.
20. Donehower LA. The p53-deficient mouse: a model for basic and applied cancer studies. *Semin Cancer Biol* 1996;7(5):269-78.
21. Johnson L, Mercer K, Greenbaum D, Bronson RT, Crowley D, Tuveson DA et al. Somatic activation of the K-ras oncogene causes early onset lung cancer in mice. *Nature* 2001;410(6832):1111-6.
22. Resor L, Bowen TJ, Wynshaw-Boris A. Unraveling human cancer in the mouse: recent refinements to modeling and analysis. *Hum Mol Genet* 2001;10(7):669-75.
23. Bernardi R, Grisendi S, Pandolfi PP. Modeling haematopoietic malignancies in the mouse and therapeutic implications. *Oncogene* 2002;21(21):3445-58.
24. Ren R. Modeling the dosage effect of oncogenes in leukemogenesis. *Curr Opin Hematol* 2004;11(1):25-34.
25. Sengupta N, MacFie TS, MacDonald TT, Pennington D, Silver AR. Cancer immunoeediting and "spontaneous" tumor regression. *Pathol Res Pract* 2010;206(1):1-8.
26. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoeediting. *Immunity* 2004;21(2):137-48.
27. Malmberg KJ, Ljunggren HG. Escape from immune- and nonimmune-mediated tumor surveillance. *Semin Cancer Biol* 2006;16(1):16-31.
28. Mincheff M. Immunoeediting and immunoeediting - can the immune response be made more "immunoeocratic"? *J BUON* 2010;14(Suppl 1):S89-96.

29. Karre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 1986;319(6055):675-8.
30. Chang CC, Campoli M, Ferrone S. HLA class I antigen expression in malignant cells: why does it not always correlate with CTL-mediated lysis? *Curr Opin Immunol* 2004;16(5):644-50.
31. Powis SJ, Townsend AR, Deverson EV, Bastin J, Butcher GW, Howard JC. Restoration of antigen presentation to the mutant cell line RMA-S by MHC-linked transporter. *Nature* 1991;354(6354):528-31.
32. Attaya M, Jameson S, Martinez CK, Hermel E, Aldrich C, Forman J et al. Ham-2 corrects the class I antigen-processing defect in RMA-S cells. *Nature* 1992;355(6361):647-9.
33. Yang Y, Früh K, Chambers J, Waters JB, Wu L, Spies T et al. Major histocompatibility complex (MHC)-encoded HAM2 is necessary for antigenic peptide loading onto class I MHC molecules. *J Biol Chem* 1992;267(17):11669-72.
34. Kleijmeer MJ, Kelly A, Geuze HJ, Slot JW, Townsend A, Trowsdale J. Location of MHC-encoded transporters in the endoplasmic reticulum and cis-Golgi. *Nature* 1992;357(6376):342-4.
35. Townsend A, Bodmer H. Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 1989;7:601-24.
36. Sabapathy K, Nam SY. Defective MHC class I antigen surface expression promotes cellular survival through elevated ER stress and modulation of p53 function. *Cell Death Differ* 2008;15(9):1364-74.
37. Levine AJ, Hu W, Feng Z. The P53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell Death Differ* 2006;13(6):1027-36.
38. Aylon Y, Oren M. Living with p53, dying of p53. *Cell* 2007;130(4):597-600.
39. Grufman P, Kärre K. Innate and adaptive immunity to tumors: IL-12 is required for optimal responses. *Eur J Immunol* 2000;30(4):1088-93.
40. Humblet C, Greimers R, Boniver J, Defrense MP. Stages in the development of radiation-induced thymic lymphomas in C57 BL/Ka mice: preleukemic cells become progressively resistant to the tumor preventing effects of a bone marrow graft. *Exp Hematol* 1997;25(2):109-13.

Condições sanitárias das águas de piscinas públicas e particulares

Sanitary conditions of water from publics and privates swimming pools

RIALA6/1313

Fabiana Cortez PIMENTEL, Ana Carolina Buchalla ALONSO, Ana Ruth Pereira de MELLO, Cícero Vágner de SOUSA, Daniel Santos TAVARES, Eduardo GONZALEZ, Estevão de Camargo PASSOS, Maria de Lourdes Paixão da SILVA, Mário TAVARES*, Roberto Carlos Fernandes BARSOTTI

*Endereço para correspondência: Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas, Centro Laboratório Regional de Santos, Instituto Adolfo Lutz

Rua Silva Jardim, 90, Vila Nova, 11015-020, Santos/SP, Brasil. E-mail: tavares.ial@gmail.com

Recebido: 01.04.2010 – Aceito para publicação: 29.12.2010

RESUMO

As piscinas representam locais de recreação, porém podem colocar em risco a saúde dos usuários pela possibilidade de veicular agentes danosos. A norma técnica do Estado de São Paulo para o controle de qualidade das águas de piscina entrou em vigor em 1979, e requer revisão. Este trabalho avaliou as condições sanitárias das águas de piscinas do Município de Praia Grande/SP. Foram coletadas quatro amostras semanais por estabelecimento, sendo duas piscinas públicas e seis particulares, totalizando-se 32 amostras. Os exames microbiológicos foram realizados segundo a APHA, 2005, para coliformes totais, *Escherichia coli*, *Enterococos*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, bolores e leveduras. As análises físico-químicas de turbidez, cloreto, nitrato, nitrito, cor, condutividade, ferro, sulfato, dureza total, odor, temperatura, pH e cloro residual livre foram efetuadas, de acordo com a ANVISA/MS, 2005. Apenas duas amostras estavam de acordo com a legislação e 30 mostraram não conformidade, quanto aos parâmetros estabelecidos (cloro residual livre e pH). Houve presença de coliformes totais, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, não previstos na norma. Além da necessidade de controle permanente da qualidade das águas de piscinas localizadas no mencionado município, esses achados oferecem subsídios para efetuar atualização da legislação em vigor no Estado de São Paulo.

Palavras-chave. Saúde Pública, águas de piscinas, legislação, cloro residual livre, pH, micro-organismos .

ABSTRACT

This study aimed to assess the health conditions of water from public and private swimming pools located in Praia Grande, São Paulo State, Brazil, regarding the microbiological control and physical-chemical characteristics. Four samples were collected weekly from each site, being two public swimming pools and six private ones (sports academies), and a total of 32 samples were analyzed. The microbiological tests were performed according to APHA, 2005, for coliforms, *Escherichia coli*, *Enterococos*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, yeasts and molds. The physical and chemical analyses were carried out using the methodology described by ANVISA/MS, 2005. Turbidity, chloride, nitrate, nitrite, color, conductivity, iron, sulfate, total hardness and smell were determined; in the field, temperature, pH and free residual chlorine were measured. Only two samples were approved, and 30 were in disagreement in the restricted free residual chlorine and pH parameters, and also coliforms group, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* were isolated, which are not included in the specific legislation. A permanent control of water quality of swimming pools located in the municipality should be monitored, as well as a review on the São Paulo State legislation in force is required, and also the inclusion of new parameters.

Key words. public health, swimming pools water, legislation, free residual chlorine, pH, microorganisms.

INTRODUÇÃO

Dois aspectos devem ser levados em consideração quando se refere à piscina: a importância social e sanitária. Estes dois itens devem ser ressaltados, pois a piscina consegue combinar a atividade física com a social.

Cabe destacar que, como atualmente a natação, a hidroginástica, entre outras atividades aquáticas, têm sido esportes muito indicados para a saúde e preferidos por pessoas de várias idades, de ambos os sexos, a qualidade sanitária da água das piscinas deve ser rigorosamente observada. De acordo com Sansebastiano et al¹, as águas de piscina podem representar risco para a saúde, podendo ser veículo na transmissão de infecções dos olhos, do nariz, da garganta e do trato intestinal; disseminar o pé de atleta, o impetigo, outras infecções da pele, otites e, até mesmo, desencadear complicações severas.

Conforme descrito por Itah e Ekpombok², o fato acima abordado é possível, pois para Alvarenga et al³ a sobrevivência de um microrganismo em condições de alta temperatura, dessecação e na presença de alguns desinfetantes químicos é observada pela capacidade do protozoário de se encistar e da bactéria de formar esporos, tornando-o, assim, mais resistente.

Segundo Russomanno⁴, o *Sub-Committee on Water Quality Criteria* indica que as atividades com prolongado e íntimo contato com a água envolvem considerável perigo de ingestão do líquido em quantidade suficiente para representar um significativo risco à saúde, sendo que a facilidade da transmissão deve-se ao fato das mucosas e pele apresentarem menor resistência por causa das imersões prolongadas e do atrito com a água.

Para La Torre et al⁵, vários fatores intervêm na ocorrência de doenças adquiridas em piscinas, tais como: presença de micro-organismos colonizados no corpo dos banhistas; poluição da água, do piso e dos objetos de uso dos frequentadores; diminuição da resistência orgânica do indivíduo pela fadiga provocada por exercícios, em intensidade, às vezes não apropriada.

Com o intuito de impedir ou diminuir a possibilidade dos banhistas adquirirem doenças durante suas atividades, os proprietários das academias fazem uso de alguns mecanismos de desinfecção, tais como a filtração, que também é eficiente no processo de remoção de micro-organismos da água, mas que de acordo com Zholdakova et al⁶ não é suficiente para garantir a qualidade microbiológica da água. Ademais, a cloração da água de piscina também é realizada no processo de desinfecção

com intuito de suprir uma possível falha durante o processo de filtração.

Existem várias técnicas para tratar a água de piscina, como por exemplo, a luz ultravioleta, porém a cloração ainda é a mais utilizada devido à relação custo/benefício, apesar das técnicas disponíveis atualmente serem mais eficientes e aprovadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

No processo de desinfecção da água com produtos à base de cloro, há a possibilidade de formação de substâncias cancerígenas, ou seja, subprodutos da cloração, destacando-se os trihalometanos (THM), que se originam das reações entre o cloro e substâncias orgânicas, e a presença de outros compostos organoclorados (ácido acético clorado, cloropropanonas, haloacetoneitrilos) também resultantes do processo de cloração das águas e mais perigosos que os próprios THM⁷.

Por sua vez, Menezes e Silva⁸ refere que o tratamento das águas de piscinas reduz consideravelmente a incidência de muitas doenças como as já citadas no texto, mas há a necessidade de constante vigilância, conforme observado por Mendonça e Ruff⁹.

Como os critérios microbiológicos relativos às águas de piscinas não são universalmente padronizados, são seguidas as atuais recomendações do protocolo da *Environmental Protection Agency* (EPA) dos Estados Unidos, o qual determina que a qualidade microbiológica da água de piscina deve obedecer a critérios de ensaios padronizados, utilizando como indicadores de escolha os seguintes micro-organismos: coliformes totais, *Escherichia coli*, enterococos, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, bolores e leveduras.

As análises físico-químicas para controle da qualidade das águas de piscinas, em termos de legislação do Estado de São Paulo, baseiam-se numa Norma Técnica Especial, que não é atualizada desde a década de 1970, específica aos parâmetros cloro residual e pH, limpidez e observação da superfície da água¹⁰. Além destes, a literatura e a Associação Brasileira de Normas Técnicas recomendam outros parâmetros tais como turbidez, temperatura, cloretos, nitrato, nitrito, cor, condutividade, sólidos totais dissolvidos, alcalinidade total, ferro, sulfato, dureza total, odor e oxidabilidade, visto que estes dados poderão ser de relevância para uma atualização na legislação, visando sempre a importância da saúde pública^{11,12}.

Segundo Signorelli et al¹³, além de uma fiscalização eficiente de acordo com os padrões analíticos estabelecidos, é preciso uma educação ao banhista quanto aos seus

hábitos pessoais e higiênicos, como evitar o uso de óleos ou soluções bronzeadoras, seguir orientações para que não urine ou defeque dentro da piscina, como também não se alimentar dentro da mesma, pois a introdução de matéria orgânica na água pode comprometer toda uma desinfecção realizada adequadamente.

Com base no exposto, o presente trabalho objetivou avaliar as condições sanitárias das águas em piscinas públicas e particulares (em dias de maior fluência de banhistas), localizadas em estabelecimentos do município de Praia Grande, Estado de São Paulo, e oferecer dados para uma atualização da legislação estadual paulista quanto ao controle microbiológico e físico-químico das referidas águas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas durante os meses de agosto e setembro de 2008, 04 amostras de água de cada piscina, semanalmente (segunda-feira, sendo a primeira coleta realizada entre 6 e 7 horas, antes da utilização da piscina, codificada pelo número 1 e a segunda coleta por volta das 11 horas, após seu uso pelos banhistas, codificada pelo número 2; este procedimento foi repetido na sexta-feira, sendo codificadas pelos números 3 e 4, respectivamente), perfazendo o total 32 amostras.

As coletas abrangeram seis piscinas particulares, instaladas em academias desportivas, codificadas pelas letras A, C, E, F, G, e H, e duas piscinas públicas, codificadas pelas letras B e D, todas localizadas no Município de Praia Grande/SP. O ponto de coleta foi na borda da piscina que contém a escada para a entrada dos banhistas, em uma profundidade de pelo menos 30 cm.

Todas as piscinas examinadas eram equipadas com sistemas de recirculação e tratamento de água.

Os exames microbiológicos foram realizados utilizando frascos estéreis, com tampas, contendo 0,4 mL de tiosulfato de sódio a 10% para cada 480 mL de água, a fim de inibir a ação do cloro, de acordo com a metodologia descrita pela APHA¹⁴, item 9213 B. Swimming Pools. A pesquisa de coliformes totais e *Escherichia coli* foi realizada pela técnica do número mais provável, dissolvendo um sachê contendo substrato cromogênico (colillert) em 100 mL da amostra de água de cada da piscina. Após a dissolução do sachê, a amostra foi transferida para cartelas Quanty-tray e incubada a 35°C por 24h. A leitura foi realizada visualmente, sendo que a coloração amarela indicou a presença de coliformes totais e a visualização

em iluminação ultravioleta com presença de fluorescência indicou a presença de *Escherichia coli*.

Os bolores e leveduras foram analisados semeando 1,0 mL e 0,1 mL da amostra de água de cada da piscina, em placas de Petri contendo meio de cultura Ágar Dextrose Batata acrescentado de ácido tartárico, incubando a 25°C por 5 dias.

A técnica da membrana filtrante foi utilizada para a pesquisa de enterococos, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, filtrando 100 mL da amostra de água de cada piscina em membrana filtrante de 0,45m, e semeando em Ágar m-Enterococos, seguido de incubação a 35°C por 48h, e para *Staphylococcus* e *Pseudomonas* em meio APT 1%, incubando a 35°C por 24-48h. Nas amostras positivas de *Staphylococcus* o meio tornou-se turvo, sendo semeado 0,1 mL em Ágar Baird Parker a 35°C por 48h, seguindo-se nova semeadura no meio BHI a 35°C por 48h. A identificação das amostras positivas foi realizada por meio da prova da coagulase a 35°C por 6h, com plasma coagulase com formação de coágulo. Nas amostras positivas de *Pseudomonas aeruginosa* o meio tornou-se turvo, sendo semeado uma alçada em Ágar Cetrimide a 35°C por 48h, seguindo-se nova semeadura no meio IAL a 35°C por 24h, e no Ágar Leite a 35°C por 48h. As amostras positivas apresentaram colônias com halo de hidrólise da caseína e pigmento amarelo a verde.

Para efetuar os exames físico-químicos foram utilizados 04 frascos de 200 mL, limpos e secos, sendo o material igualmente coletado nos 04 pontos diferentes da piscina.

Este mesmo material foi utilizado para a determinação em laboratório da turbidez, cloreto, nitrato, nitrito, cor, condutividade, ferro, sulfato, dureza total e odor, enquanto que a medição da temperatura, pH e cloro residual livre foi realizada em campo nos 04 pontos de coleta.

As análises físico-químicas foram realizadas segundo a metodologia descrita pela ANVISA/MS¹⁵.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De um total de 32 amostras analisadas, apenas duas estavam de acordo com a legislação vigente¹⁰, sendo a primeira relativa à piscina pública (B1) e a outra à particular (G4), e 30 estavam em desacordo. Ressalte-se que a norma técnica se restringe aos parâmetros pH e cloro residual livre.

Em relação ao pH, 25 amostras apresentaram valores de acordo com a legislação paulista em vigor (entre 6,7 e 7,9)¹⁰. Por sua vez, 06 amostras apresentaram valores acima do máximo permitido, cabendo ressaltar que um valor de pH acima de 7,9 reduz a eficácia do cloro e poderá

causar problemas como água turva, incrustações brancas, cinzentas ou marrons nos tubos e em outras partes do sistema de circulação de água, além de irritar os olhos e ressecar a pele e os cabelos dos usuários¹¹.

Apenas uma amostra foi insatisfatória por apresentar um valor abaixo do mínimo permitido, destacando que um pH abaixo de 6,7 pode causar irritação na pele e nos olhos e corrosão nos equipamentos metálicos¹¹.

Em relação ao cloro residual livre, apenas 03 amostras estavam de acordo com a legislação em vigor no Estado de São Paulo¹⁴, enquanto 16 apresentaram valores acima do máximo permitido (0,8 mg.L⁻¹) e 13 apresentaram valores abaixo do mínimo permitido pela legislação vigente (0,5 mg.L⁻¹)¹⁰.

Cabe ressaltar que a maioria destas 13 condenações ocorreu na segunda coleta do dia, pois, com o uso das piscinas pelos banhistas, houve uma degradação do cloro residual livre presente na água devido a vários fatores, como por exemplo, a temperatura, que acelera esta degradação

natural devido à interação química que ocorre. Esta pode ter sido também favorecida por um pé direito baixo, permitindo que uma temperatura elevada seja mantida.

Quanto à concentração de cloro residual livre presente nas piscinas foi levado em consideração se este era cloro granulado ou líquido, já que o granulado mantém o seu teor ativo por até 12 meses, enquanto o líquido, quando estocado, perde seu teor de cloro ativo muito rapidamente. Em uma semana, a taxa de redução pode alcançar até 25%, sendo necessária uma dosagem superior à normal para manter o mesmo efeito microbicida na piscina.

Dentre as piscinas analisadas utilizava-se na maioria o cloro líquido devido ao seu menor custo no mercado. A elevada taxa de condenações obtidas em relação a este parâmetro não pode ser associada ao fator preço.

A Figura 1 apresenta os percentuais obtidos para os micro-organismos analisados nas amostras de água de piscinas do município de Praia Grande/SP.

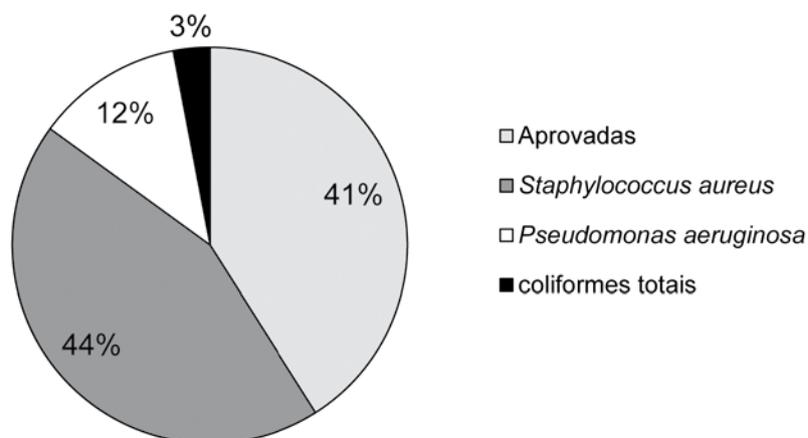


Figura 1. Percentuais de detecção de micro-organismos em amostras de água de piscinas do município de Praia Grande/SP

De um total de 32 amostras apenas 13 amostras (40,63%) apresentaram ausência de todos os micro-organismos pesquisados. Por sua vez, 14 amostras (43,75%) apresentaram *Staphylococcus aureus*, microrganismo prevalente nesta pesquisa, o qual está correlacionado com a transmissão de infecções dos olhos, do nariz, da garganta, entre outros. Já 04 amostras (12,50%) revelaram a presença de *Pseudomonas aeruginosa*, um dado que deve ser destacado, uma vez que este microrganismo apresenta uma alta relação com o desenvolvimento de otite, além de lesões eritematosas. Apenas 01 amostra (3,1%) apresentou coliformes totais, sendo este um indicador de contaminação fecal.

O microrganismo *Staphylococcus aureus* esteve presente em ambas as coletas, ou seja, antes e após o uso das piscinas, o que indica que os sistemas de tratamento utilizados nas piscinas em questão não foram eficientes para eliminá-lo. No caso da *Pseudomonas aeruginosa* e dos coliformes totais, estes se apresentaram apenas na segunda coleta do dia, o que indica uma contaminação recente, provavelmente ocasionada por algum banhista que fez uso da piscina no dia da coleta.

A amostra B1, coletada em piscina pública, revelou a presença de *Pseudomonas aeruginosa* que, no entanto, não está contemplada na legislação¹⁰.

Tabela 1. Valores obtidos para as análises físico-químicas das amostras de água de piscinas do Município de Praia Grande/SP

Análise físico-química	A1	A2	A3	A4	B1	B2	B3	B4	C1	C2	C3	C4	D1	D2	D3	D4
CRL (mg.L ⁻¹)*	1,5	0	3	1	0,5	0,4	1	0	5	3	3	3	2	2	3	3
pH *	7,5	7,6	7,4	7,8	7,2	7,4	7,7	7,8	7,2	7,2	8	7,7	8,2	8,1	8	8
Temperatura (°C)*	32	31	36	33	32	32	31	31	30	30	30	29	25	25	27	27
Turbidez (UT)	0,9	0,9	0,8	0,9	0,3	0,5	1,8	2	0,5	0,6	0,8	1,4	1,2	1,3	1,8	2
Cor (uHz)	3	3,4	6,1	5,6	1,6	1,9	6,5	5,8	3,4	5	4,8	2,4	6,7	6,8	4,5	5,3
Odor	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
Cloretos (mg.L ⁻¹)	88	95	107	117	471	475	422	401	180	148	135	133	191	192	142	170
Nitrato (mg.L ⁻¹)	7,9	9,7	8,8	8,4	4,9	5,7	7	7,9	12	11	11	8,4	15	15	11	13
Nitrito (mg.L ⁻¹)	0,1	0,1	ND	ND	0,02	0,02	ND	ND	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
STD (mg.L ⁻¹)	239	238	518	515	539	541	1236	1244	471	469	454	456	695	684	653	654
Condutividade (µS. cm ⁻¹)	479	475	1036	1030	1070	1075	2472	2488	942	938	908	912	1390	1368	1306	1308
Ferro (mg.L ⁻¹)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Sulfato (mg.L ⁻¹)	46	46	51	50	21	20	23	23	4,3	4,7	4,6	4,3	2,7	1,9	3,3	4,2
Dureza total (mg.L ⁻¹)	13	15	38	52	191	190	278	274	113	98	107	115	145	98	184	178

Análise físico-química	E1	E2	E3	E4	F1	F2	F3	F4	G1	G2	G3	G4	H1	H2	H3	H4
CRL (mg.L ⁻¹)*	0,2	0,1	0,2	0,2	3,4	2,8	2	1,5	0,3	0,4	0,3	0,7	0,2	0,2	0,3	0,7
pH *	7,2	7,2	7,5	7,7	6,7	6,5	7	7	7,5	7,6	7,9	7,8	7,6	7,7	7,9	8,1
Temperatura (°C)*	28	28	27	27	29	29	28	27	30	30	31	31	31	29	31	30
Turbidez (UT)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,9	0,7	0,8	0,8
Cor (uHz)	2	0	4	2,5	0	0	2	2	2	4	0	1	12	4	1,5	5
Odor	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
Cloretos (mg.L ⁻¹)	89	230	198	185	105	246	667	687	913	898	202	278	3483	3336	1112	1146
Nitrato (mg.L ⁻¹)	7	8,8	7	7,5	15	14	14	14	30	34	40	36	13	12	8,8	13
Nitrito (mg.L ⁻¹)	ND	ND	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	2	2,3	0,01	0,01	2,8	2,3	0,01	0,01
STD (mg.L ⁻¹)	301	303	323	320	791	796	812	807	2300	2570	2620	2850	7630	7180	8310	8090
Condutividade (µS. cm ⁻¹)	602	606	646	640	1582	1592	1624	1614	4600	5140	5240	5700	15260	14360	16620	16180
Ferro (mg.L ⁻¹)	ND	ND	0,05	0,02	0,02	0,01	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03	0,01	0,03	0,03	0,03	0,02
Sulfato (mg.L ⁻¹)	32	32	35	35	62	68	71	26	47	42	43	49	49	46	39	38
Dureza total (mg.L ⁻¹)	56	56	134	65	82	100	63	101	82	82	88	82	234	235	243	247

1 = 1ª coleta, segunda-feira; 2 = 2ª coleta, segunda-feira; 3 = 1ª coleta, sexta-feira; 4 = 2ª coleta sexta-feira

STD = Sólidos totais dissolvidos; NO = Não objetável; ND = Não detectado

* média da dosagem de 4 pontos na mesma coleta

Assim sendo, a amostra G4, coletada em piscina particular, foi a única que não só atendeu aos padrões estabelecidos legalmente, como não apresentou quaisquer micro-organismos nesta coleta, pois nas outras três realizadas neste mesmo estabelecimento (G1, G2 e G3) verificou-se a presença de *Staphylococcus aureus*. Cabe informar que o mencionado estabelecimento possui o sistema de tratamento de ozônio, com dosador de cloro num intervalo 1 a 2 ppm, sendo aquele tratamento muito referido atualmente para esterilização das águas de piscinas, mas com restrições devido à toxicidade do gás e de seu desaparecimento da água com facilidade.

O fato acima citado indica que o referido método não é tão eficiente ou está sendo utilizado de forma inadequada pelo proprietário, visto que não eliminou todos os micro-organismos presentes, bem como apresentou um valor elevado para condutividade ($5.700 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) e sólidos totais dissolvidos ($2850 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), ao contrário do descrito pelo fabricante, já que o único subproduto formado é o oxigênio.

Dentre os 14 parâmetros físico-químicos relacionados na Tabela 1, 3 merecem destaque: condutividade, sólidos totais dissolvidos (STD) e cloretos.

No tocante à condutividade, 14 amostras apresentaram valores de acima de $1500 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, indicador da mineralização da água. Estes valores elevados alertam para a sobrecarga de banhistas e envelhecimento da água¹¹.

No caso dos STD, 08 amostras apresentaram valores superiores a $1500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, que correspondem ao peso total dos constituintes minerais presentes na água, por unidade de volume. Este parâmetro tem correlação com a condutividade, visto que esta aumenta com a adição de sólidos dissolvidos na água.

Por sua vez, 08 amostras apresentaram valores para dosagem de cloretos acima de $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, sendo que estes estão associados à contaminação com origem nos banhistas, deficiências na renovação da massa de água, provocando corrosão dos equipamentos metálicos, sendo também indicativos de envelhecimento da água¹¹.

CONCLUSÃO

Considerando os resultados obtidos e a desatualização das legislações quanto aos padrões físico-químicos e microbiológicos, sugere-se uma revisão das mesmas.

A maioria dos métodos utilizados para a desinfecção das águas de piscinas não se mostrou eficiente, bem como

a forma de se tratar a água utilizada pelos banhistas, cujo número vem aumentando consideravelmente.

A única piscina que utilizava o sistema de tratamento à base de ozônio possui um dosador de cloro com um intervalo superior ao estabelecido pela legislação em vigor no Estado de São Paulo, visto que os aparelhos existentes no mercado são, em sua maioria, importados, seguindo a legislação do país fabricante.

Os resultados obtidos neste trabalho oferecem dados para uma atualização da legislação com base nos parâmetros pesquisados, bem como a aplicação de questionário fornece subsídios para um melhor controle de qualidade por parte dos proprietários de academias com piscinas, além de auxiliar na fiscalização das mesmas pela Vigilância Sanitária.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Equipe Técnica da Vigilância Sanitária da Prefeitura do Município de Praia Grande, Estado de São Paulo, pela valiosa colaboração.

REFERÊNCIAS

1. Sansebastiano G, Zoni R, Zanelli R, Bigliardi R. Microbiological aspects of pool water. *Ig Sanita Pubbl*. 2008; 64(1):121-9.
2. Itah AY, Ekpombok MU. Pollution status of swimming pools in south-south zone of south-eastern Nigeria using microbiological and physicochemical indices. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2004; 35(2):488-93.
3. Alvarenga LS, Freitas D, Hofling-Lima AL. Ceratite por *Acanthamoeba*. *Arq Bras Oftalmol*. 2000; 63(2):155-9.
4. Russomanno R. Water quality criteria for recreation and aesthetics. In: Environmental Protection Agency. Water Programs Operations. Training Program. Current practices in water Microbiology. Cincinnati:EPA, 1973. p. 6.1-6.6.
5. La Torre G, De Vito E, Barra M, Masala D, Tartaglia A, Mannocci A et al. Applicability of the new law of State and Regional Agreement on management of swimming pools. *Ann Ig*. 2005; 17(4): 281-8.
6. Zholdakova ZI, Sinitsyna OO, Tul'skaia EA, Odintsov EE. Hygienic standards of chemicals for water sterilization in the swimming pools. *Gig Sanit*. 2007; Set-Oct:76-80.
7. Macêdo JAB, Andrade NJ, Araújo JMA, Chaves JBP, Silva MTC, Jordão CP. Cloraminas orgânicas uma solução para evitar a formação de trihalometanos no processo de desinfecção de águas para abastecimento público. *Rev Hig Alim*. 2001; 15(90/91): 93-103.

8. Menezes e Silva CH. Contaminação bacteriana em águas de piscina. *Caderno Técnico*, 2004; 1(2):1-6. (Suplemento de Hidronews).
9. Mendonça CP, Ruff SD. Estudo das condições sanitárias das águas de piscinas públicas e particulares, na cidade de Araraquara, SP, Brasil. *Rev Saúde Pública*. 1978; 12(2):113-21.
10. São Paulo. Leis, decretos, etc. Decreto nº 13.166, de 23 de janeiro de 1979. Aprova Norma Técnica Especial (NTE) relativa a piscinas. *Diário Oficial [do] Estado de São Paulo*. São Paulo, SP, 24 jan. 1979. Seção I.
11. Heitor AM. Saúde em piscinas/Água-qualidade química. [acesso em 18 jun. 2008]. Disponível em: [<http://www.tratamentodeagua.com.br/a1/informativos/acervo.php?cp=est&chave=250>].
12. ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. Qualidade de água de piscina. (NBR 10818, nov/1989).
13. Signorelli C, Pasquarella C, Saccani E, Sansebastiano G. Treatment of thermal pool waters. *Ig Sanita Pubbl*. 2006; 62(5):539-52.
14. Eaton AE, Clesceri LS, Rice EU, Greenberg AE. *Standard Methods for the examination of water and wastewater*. 21st ed. Baltimore: United Book Press; 2005.
15. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo - Brasil). *Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. 4^a ed. Brasília (DF): ANVISA; 2005.

Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp e cistos de *Giardia* spp em mananciais e águas de abastecimento público

Occurrence of *Cryptosporidium* spp oocysts and *Giardia* spp cysts in water sources and public water supplies

RIALA6/1314

Regina Célia Arantes STANCARI¹, Marlene CORREIA²

*Endereço para correspondência: Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas, Centro de Laboratório Regional de Bauru, Instituto Adolfo Lutz, Rua Rubens Arruda, Quadra 06, Bauru/SP, Brasil. CEP 17015-110. E-mail: rstancari@ial.sp.gov.br

¹Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas, Centro de Laboratório Regional - CLR - IAL de Bauru II, Instituto Adolfo Lutz, Bauru, SP, Brasil

²Núcleo de Ensaios Físicos e Químicos em Medicamentos, Centro de Medicamentos, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil
Financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo 05/52005-0.

Recebido: 11.06.2010 – Aceito para publicação: 29.10.2010

RESUMO

O monitoramento de *Cryptosporidium* e *Giardia* é recomendado pela Portaria nº 518/2004/MS, pela possibilidade de causar doenças diarreicas na população, por veiculação hídrica. Neste estudo foram analisados a presença de oocistos e cistos, a qualidade microbiológica e físico-química, e os parâmetros físico-químicos foram correlacionados aos indicadores bacteriológicos com a presença desses parasitas em amostras de água de cinco municípios da DRS VI – Bauru. A metodologia USEPA 1623 foi utilizada na pesquisa dos protozoários e, para análises microbiológicas, foi seguida a metodologia do Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater; e os métodos fotométrico, turbidimétrico, potenciométrico e colorimétrico foram utilizados nas análises físico-químicas. Cistos de *Giardia* foram encontrados em 10% das amostras e oocistos de *Cryptosporidium* não foram detectados. Todas as amostras de água tratada foram aprovadas nas análises microbiológicas, e 66,7% das amostras de água bruta não atenderam a legislação. Para a cor, 20% das amostras de água bruta estavam em desacordo com a legislação e 40% das águas tratadas apresentaram turbidez acima do limite seguro para remoção desses protozoários. A detecção de cistos de *Giardia* demonstrou a importância do monitoramento de águas para consumo, contudo não houve correlação entre a presença de cistos e os demais parâmetros avaliados.

Palavras-chave. *Cryptosporidium*, *Giardia*, água, análise parasitológica, análise microbiológica, análise físico-química.

ABSTRACT

Cryptosporidium and *Giardia* monitoring is recommended by the Brazilian Regulation 518/2004-MS, as they can cause diarrheal disease through water transmission. The occurrence of oocysts and cysts was investigated, and the physicochemical and microbiological quality were assessed. The correlation between the physicochemical parameters and the bacteriological indicators with the presence of these parasites was performed in water samples collected from five municipalities of Bauru –DRS VI. For detecting the protozoa, the USEPA 1623 methodology was employed. Microbiological analysis was based on the Standard Methods of the Examination of Water and Wastewater, and photometric, turbidimetric, potentiometric and colorimetric methodologies were used for physicochemical analysis. *Giardia* cysts were found in 10% of samples, and *Cryptosporidium* oocysts were not detected. All treated water samples were approved in the microbiological analysis, and 66% of the raw water were in discordance with regulation. Regarding to color, 20% of the raw water samples were in discordance with regulation, and 40% of the treated water showed turbidity above that safe limit for removing protozoa. The occurrence of *Giardia* cysts showed the importance in monitoring the drinking water, and no correlation was found between the presence of cysts and the other parameters evaluated in this study.

Key-words. *Cryptosporidium*, *Giardia*, water, parasitological analysis, microbiological analysis, physicochemical analysis.

INTRODUÇÃO

O protozoário *Cryptosporidium* foi descrito pela primeira vez por Tyzzer em 1907, porém, os dois primeiros casos de criptosporidiose humana foram relatados somente em 1976, nos Estados Unidos, sendo um desses casos uma criança de 3 anos de idade residente em uma zona rural¹ e o outro um adulto imunodeprimido². A doença pode ser causada, entre outros, pela ingestão de água e alimentos contaminados com oocistos³.

De acordo com Pereira et al, o gênero *Cryptosporidium* compreende 21 espécies, com pelo menos sete espécies parasitando o homem (*C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. suis* e *C. muris*)⁴.

Giardia é outro protozoário parasita intestinal contaminante de água, cujo gênero compreende seis espécies que infectam pequenos roedores, anfíbios e pássaros^{3,5}, porém, apenas *G. duodenalis* é transmitida para humanos e outros mamíferos⁶. A espécie *G. duodenalis* é compreendida por várias assembleias, dentre as quais, apenas as assembleias A e B são infecciosas para o homem⁷.

A transmissão desses protozoários pela água vem se tornando preocupante, pois pode atingir facilmente um grande contingente da população, acarretando surtos⁸, os quais dependem, para sua ocorrência, de fatores como o número de oocistos e cistos na fonte de água envolvida, a resistência dos mesmos ao processo de cloração, a eficiência do processo de filtração utilizado no tratamento de água e a baixa dose infectante desses parasitas^{7,9,10}.

No Brasil, o controle e vigilância da água para consumo humano, assim como o padrão de potabilidade estão estabelecidos na Portaria nº 518, de 25 de março de 2004, do Ministério da Saúde, com a recomendação da inclusão da pesquisa de organismos patogênicos como enterovírus, cistos de *Giardia* spp e oocistos de *Cryptosporidium* spp nas análises de água como um importante instrumento de avaliação de sua qualidade¹¹.

Apesar da recomendação do monitoramento desses protozoários nas águas utilizadas para o abastecimento público, isso ainda não ocorre rotineiramente nas Estações de Tratamento de Água devido aos entraves como questões metodológicas, custos e falta de recursos humanos capacitados. Porém, torna-se necessário conhecer essa ocorrência nos ambientes aquáticos visando à adoção de medidas que garantam a segurança dos suprimentos de água e a saúde da população.

O objetivo do presente estudo foi pesquisar a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp e cistos *Giardia* spp em amostras de água, pré e pós-tratamento, destinadas ao abastecimento público em 5 municípios abrangidos pela DRS VI – Bauru, verificar a qualidade microbiológica e físico-química das mesmas e relacionar os parâmetros físico-químicos e indicadores bacteriológicos com a eventual presença desses protozoários.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

As amostras foram coletadas nas estações de tratamento de água (ETA) de 5 municípios (I, II, III, IV e V) abrangidos pela Divisão Regional de Saúde VI (DRS – VI), Bauru/SP (Bauru, Brotas, Jaú, Lençóis Paulista e Torrinha).

Os tipos de captação de água nessas estações de tratamento são: a) mista (manancial superficial/rio e subterrânea/poços e/ou minas) nos municípios I, III e IV; b) subterrânea (poço profundo e minas) no município II; c) superficial (rio) no município V.

Foram realizadas três coletas sazonais correspondentes a três etapas: nos meses de maio, agosto e setembro de 2006 (1ª etapa – período seco), em janeiro e fevereiro de 2007 (2ª etapa – período chuvoso) e nos meses de agosto e setembro de 2007 (3ª etapa – período seco).

As coletas de água foram realizadas em dois pontos de cada ETA, separadamente, sendo um na entrada da água no sistema de tratamento (água bruta) e outro na saída do reservatório ou entrada do sistema de distribuição (água tratada). Foram coletadas 90 amostras, sendo 30 para pesquisa de parasitas, 30 para análises bacteriológicas e 30 para análises físico-químicas.

Para a pesquisa de parasitas, as amostras de água tratada foram coletadas acoplado, na torneira da ETA, um sistema de filtração (composto de suporte de membrana de aço inoxidável, mangueiras e conexões, previamente esterilizados e membrana de policarbonato de 293 mm de diâmetro e 1,0 µm de porosidade), deixando a água fluir até a saturação completa da membrana filtrante.

O volume coletado foi variável (Tabela 1), o qual dependeu das características físico-químicas e do fluxo de água na torneira onde o sistema de filtração foi instalado.

Tabela 1. Volumes de água tratada coletados para as análises de detecção de parasitas

Municípios	Períodos	Volumes de água tratada (L)
Bauru	Seco	128
Brotas	Seco	64
Jaú	Seco	160
Lençóis Paulista	Seco	328
Torrinha	Seco	140
Bauru	Chuvoso	160
Brotas	Chuvoso	80
Jaú	Chuvoso	220
Lençóis Paulista	Chuvoso	675
Torrinha	Chuvoso	135
Bauru	Seco	190
Brotas	Seco	84
Jaú	Seco	170
Lençóis Paulista	Seco	137
Torrinha	Seco	255

Para a água bruta foram coletados volumes de 10 L de cada amostra, os quais foram filtrados no laboratório, colocando-se a água em balão de fundo chato com capacidade de 6 L conectado, através de mangueiras, ao sistema de filtração descrito acima, utilizando-se para o fluxo de água, uma bomba de pressão positiva.

Para as análises bacteriológicas, as amostras foram coletadas em frascos de polipropileno estéreis com capacidade para 250 mL, contendo 0,2 mL de tiosulfato de sódio a 10% e para as análises físico-químicas, foram utilizados frascos de polipropileno com capacidade de 1L.

Os procedimentos analíticos foram realizados nos laboratórios de Microscopia, Microbiologia e Físico-química de Alimentos do Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas, do Centro de Laboratório Regional - CLR - IAL de Bauru II.

Pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp e cistos de *Giardia* spp

Para a pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp e cistos de *Giardia* spp foi utilizado o método USEPA 1623, com filtração em membrana de policarbonato como procedimento alternativo para a concentração das amostras¹², sendo introduzida uma modificação na etapa de eluição da membrana.

Nesse procedimento alternativo de filtração, a membrana utilizada é transferida para um béquer de 1000 mL, onde é adicionado 120 mL da solução de eluição e realizado o massageamento da mesma durante 2 minutos.

Após esse tempo, o béquer é colocado no banho de ultra-som por 2 minutos e o processo de massageamento é repetido por igual período. A solução de eluição é então transferida para um tubo cônico de 250 mL e todo procedimento é repetido com a adição de mais 120 mL de solução de eluição.

A modificação na etapa de eluição, proposta no presente estudo, consistiu em colocar a membrana utilizada na filtração em béquer de 2000 mL, adicionar 120 mL da solução de eluição¹², agitar por 1 hora em agitador de Kline com velocidade de 100 – 120 ciclos/minuto (virando a membrana periodicamente com ajuda de um bastão de vidro) e transferir a solução de eluição para um tubo cônico de 250 mL. Adicionar mais 120 mL da solução de eluição ao béquer e agitar novamente por 30 minutos. Massagear a membrana, colocar no banho de ultra-som por 2 minutos, massagear novamente e transferir a solução de eluição para o mesmo tubo.

As etapas de purificação das amostras (separação imunomagnética – IMS), de identificação e enumeração (imunofluorescência com isotiocianato de fluoresceína – FITC) e confirmação dos oocistos e cistos detectados com corante vital 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) e microscopia com contraste diferencial e interferencial de fase (DIC) foram realizadas de acordo com o método original^{12,13}. Para a realização da separação imunomagnética foi utilizado o kit Dynabeads GC-Combo, marca Dynal Biotech, enquanto para a imunofluorescência direta foram utilizados os kits Merifluor *Cryptosporidium/Giardia* e A 100 FLK – Aqua-Glo G/C.

Testes de recuperação

Para cada etapa de coletas, maio, agosto e setembro de 2006 (1ª etapa), janeiro e fevereiro de 2007 (2ª etapa) e nos meses de agosto e setembro de 2007 (3ª etapa), foram adquiridas suspensões de oocistos e de cistos para a realização dos testes de recuperação. A suspensão de *C. parvum* foi fornecida pelo Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro e a de *G. duodenalis*, pela Fundação da Universidade Federal do Paraná (Funpar). As suspensões eram conservadas em PBS-Tween adicionado de antibióticos e mantidas em temperatura de refrigeração.

Para avaliar a recuperação do método, quatro alíquotas de 10L de água destilada foram contaminadas com 100 a 500 oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* e realizado todo o procedimento analítico.

O inóculo foi obtido a partir de oocistos e cistos das suspensões estoques, com contagem em câmara de Neubauer e diluições adequadas¹². A confirmação do

inóculo foi realizada através da aplicação em lâmina e coloração por imunofluorescência, tendo em vista a variabilidade no número dos parasitas calculados a partir das suspensões utilizadas no presente estudo¹⁴.

Para avaliar a presença ou a ausência de contaminação dos equipamentos, materiais e reagentes, utilizados na metodologia, todo o procedimento analítico foi realizado em alíquotas de 10 L de água destilada.

Análises microbiológicas

Para determinação de coliformes totais e termotolerantes foram utilizadas a técnica de filtração em membrana e a de tubos múltiplos para a água tratada e bruta, respectivamente, segundo o Standard Methods for Examination of Water and Wastewater¹⁵.

Determinação dos Parâmetros Físico-Químicos

Os valores do cloro residual livre e do pH foram fornecidos pelos técnicos dos laboratórios das respectivas estações de tratamento de água.

Para a determinação da cor e da turbidez foram utilizados os métodos fotométrico e turbidimétrico, descritos nos manuais dos equipamentos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a pesquisa de parasitas, a modificação proposta na etapa de eluição do método USEPA 1623 demonstrou ser mais eficiente, pois a agitação da membrana com a solução de eluição possibilitou uma melhor remoção das partículas e dos parasitas retidos durante o processo de filtração. O massageamento utilizado nessa etapa tornava a membrana amassada e com dobras, nas quais os oocistos e cistos poderiam ficar retidos e serem perdidos. Além disso, o pequeno espaço no interior do béquer de 1 L, dificultava os movimentos de massageamento, propiciando um contato insuficiente da membrana com a solução de eluição e, conseqüentemente, a remoção deficiente dos resíduos retidos durante o processo de filtração.

Nos testes de recuperação, para *Cryptosporidium* a média de recuperação (29,2%) e o desvio padrão relativo (43,3%) atenderam os critérios estabelecidos no método (24 a 100% e 55%, respectivamente)¹³. Para *Giardia*, a média de recuperação (55,3%) também atendeu a esses critérios de aceitação (24 a 100%) e, embora o desvio padrão relativo (69,3%) tenha ficado acima do limite especificado (49%)¹³, o método foi utilizado e cistos foram detectados em mananciais estudados.

Os resultados de recuperação foram compatíveis com os obtidos por outros autores como Machado¹⁶ que, utilizando amostras de água tratada, contaminadas com $1,5 \times 10^2$ oocistos/L e raspagem da membrana na etapa de eluição, obteve recuperação de 33,05%; e Muller¹⁷ obteve 22% com água destilada contaminada com $1,0 \times 10^2$ oocistos/L, utilizando como metodologia a filtração e dissolução da membrana.

Quanto aos resultados obtidos nas análises de água bruta, oocistos de *Cryptosporidium* não foram detectados. Cistos de *Giardia* foram encontrados em 2 amostras (13,3%) colhidas na 1ª etapa (período seco) e a concentração desse parasita foi de 0,10 cistos/L e 0,30 cistos/L, respectivamente, nos municípios II e IV.

Nas análises de água tratada não foram detectados oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* foram encontrados em 1 amostra (6,7%) com concentração de 0,03 cistos/L, colhida na 1ª etapa (período seco) no município II. Verificou-se que a ETA desse município utilizava apenas a filtração no tratamento da água e a identificação de cistos de *Giardia* na água tratada, é indicativo de que o processo utilizado não estava sendo eficaz na eliminação do protozoário, confirmando dados da literatura que citam que a filtração pode não remover totalmente os cistos da água contaminada¹⁶.

No município IV, que utilizava o tratamento convencional da água, as etapas de floculação e decantação favoreceram a retenção dos cistos, diminuindo a probabilidade de passagem da contaminação da água bruta para a tratada.

Vários autores^{16,18,19,20} citam que a variação na concentração de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* na água são dependentes de alguns fatores como: as características da bacia hidrográfica, das fontes de contaminação do ambiente aquático (atividades humanas, descargas de efluentes industriais e domésticos), das variações pluviométricas, da temperatura, do tipo de água analisada, além da metodologia empregada e da eficiência da recuperação dos experimentos controles.

Os resultados obtidos nas análises microbiológicas (Tabela 2) mostraram que somente 5 (33,3%) das amostras de água bruta atendiam aos limites estabelecidos na legislação²¹. No entanto, em todas as amostras de água bruta foram encontrados coliformes termotolerantes, indicando contaminação fecal, que pode ter origem no tipo de atividade econômica das margens desses mananciais, no grau de preservação dos mesmos, ou na forma de lançamento de esgoto (tratado ou não) nos rios utilizados para captação da água.

Para água tratada, observou-se que 100% das amostras (Tabela 2) estavam de acordo com a legislação em vigor¹¹, indicando que a desinfecção da água bruta foi eficaz em relação à eliminação das bactérias do grupo coliforme.

As amostras de água bruta onde foram encontrados cistos de *Giardia* (municípios II e IV da 1ª etapa – período seco) também estavam em desacordo com os limites estabelecidos para os parâmetros microbiológicos. No entanto, a ocorrência de cistos na água tratada (município II da 1ª etapa – período seco), com a análise microbiológica de acordo com a legislação, mostrou

que o grupo coliforme pode não ser bom indicador da qualidade da água em relação à presença de parasitas, visto que as bactérias são organismos menos resistentes do que esse protozoário.

Devido à correlação significativa obtida por diferentes autores^{22,23}, outros micro-organismos poderiam ser propostos para avaliar a qualidade da água no que se refere à presença de parasitas, como *Clostridium perfringens* e estreptococos fecais, visando priorizar os locais e os mananciais onde os métodos específicos para detecção de parasitas seriam realizados.

Tabela 2. Resultados das análises microbiológicas das amostras de água bruta e tratada, dos municípios em estudo, segundo Resolução nº 357/05/CONAMA e Portaria 518/04/ANVISA/MS

Municípios	Resultado		Conclusão		Legislação Aplicada	
	Água Bruta NMP/100mL (CTT)	Água Tratada UFC/100mL (CT)	Água Bruta	Água Tratada	Água Bruta	Água Tratada
I (P. Seco)	350.000	< 1,0	Desacordo	Aprovada	CONAMA ⁽²¹⁾	Port. 518 ⁽¹¹⁾
II (P. Seco)	45	<1,0	Desacordo	Aprovada	Port. 518 ⁽¹¹⁾	Port. 518 ⁽¹¹⁾
III (P. Seco)	2.700	< 1,0	Aprovada	Aprovada	CONAMA ⁽²¹⁾	Port. 518 ⁽¹¹⁾
IV (P. Seco)	49.000	< 1,0	Desacordo	Aprovada	CONAMA ⁽²¹⁾	Port. 518 ⁽¹¹⁾
V (P. Seco)	14.000	< 1,0	Desacordo	Aprovada	CONAMA ⁽²¹⁾	Port. 518 ⁽¹¹⁾
I (P. chuvoso)	930	< 1,0	Aprovada	Aprovada	CONAMA ⁽²¹⁾	Port. 518 ⁽¹¹⁾
II (P. chuvoso)	68	< 1,0	Desacordo	Aprovada	Port. 518 ⁽¹¹⁾	Port. 518 ⁽¹¹⁾
III (P. chuvoso)	78	< 1,0	Aprovada	Aprovada	CONAMA ⁽²¹⁾	Port. 518 ⁽¹¹⁾
IV (P. chuvoso)	7.900	< 1,0	Desacordo	Aprovada	CONAMA ⁽²¹⁾	Port. 518 ⁽¹¹⁾
V (P. chuvoso)	110.000	< 1,0	Desacordo	Aprovada	CONAMA ⁽²¹⁾	Port. 518 ⁽¹¹⁾
I (P. Seco)	680	< 1,0	Aprovada	Aprovada	CONAMA ⁽²¹⁾	Port. 518 ⁽¹¹⁾
II (P. Seco)	130	< 1,0	Desacordo	Aprovada	Port. 518 ⁽¹¹⁾	Port. 518 ⁽¹¹⁾
III (P. Seco)	46.000	< 1,0	Desacordo	Aprovada	CONAMA ⁽²¹⁾	Port. 518 ⁽¹¹⁾
IV (P. Seco)	1.400	< 1,0	Desacordo	Aprovada	CONAMA ⁽²¹⁾	Port. 518 ⁽¹¹⁾
V (P. Seco)	20	< 1,0	Aprovada	Aprovada	CONAMA ⁽²¹⁾	Port. 518 ⁽¹¹⁾

NMP – número mais provável UFC – unidade formadora de colônias CT – coliformes totais CTT – coliformes termotolerantes
P. – período

Em relação aos parâmetros físico-químicos (Tabela 3), das 15 amostras de água bruta analisadas, 3 (20,0%) apresentaram valor para cor acima do estabelecido pela legislação²¹, enquanto turbidez e pH estavam de acordo com o permitido. Estas amostras foram colhidas no período chuvoso, indicando que houve uma

maior introdução de partículas no manancial devido à lavagem das margens desses pela água da chuva ou pela ressuspensão do sedimento do leito do rio.

Para água tratada, todas as amostras analisadas estavam de acordo com a Portaria 518/MS¹¹, em relação à cor e pH. O controle do parâmetro cor nas estações de

tratamento é importante porque, estando presente na água tratada, pode levar os consumidores em busca de águas nem sempre seguras em termos microbiológicos, enquanto o pH pode interferir no tratamento da água afetando o processo de floculação/coagulação, a eficiência da desinfecção (cloração) e a manutenção da integridade da rede de distribuição.

Quanto ao valor de turbidez, 6 (40,0%) amostras de água tratada estavam acima do recomendado (> 0,5 UNT), mostrando que o processo de filtração realizado nessas estações de tratamento não atingiu o nível seguro para a remoção de parasitas¹¹. Dessas amostras, 4 (26,7%) apresentaram valores acima de 1,0 UNT, estando em desacordo com o valor estabelecido para os efluentes de filtração rápida¹¹. Porém, todas as amostras estavam de acordo com a Portaria 518/MS¹¹, apresentando valores abaixo de 5,0 UNT.

Em relação ao cloro residual livre, que é adicionado intencionalmente à água para assegurar

a qualidade microbiológica, em relação às bactérias e vírus ao longo da rede de distribuição, 2 (13,3%) amostras de água tratada do município I estavam acima do recomendado¹¹, mostrando a necessidade de maior controle do processo de tratamento, em relação a esse parâmetro, para evitar problemas operacionais e/ou rejeição dos consumidores.

Considerando os parâmetros físico-químicos, não houve correlação com a presença de parasitas nas amostras de águas bruta, visto que, os municípios II e IV, positivos para cistos de *Giardia* spp nas amostras colhidas na 1ª etapa (período seco), apresentaram resultados de acordo com a legislação em vigor. Em relação à água tratada, o município II, mesmo estando com valor de turbidez dentro dos padrões vigentes, apresentou contaminação por cistos, o que não foi verificado no município IV que, estando com a turbidez acima do recomendado, não apresentou tal contaminação.

Tabela 3. Resultados dos parâmetros físico-químicos das amostras de águas bruta e tratada dos municípios em estudo

Municípios	Períodos	Cor (uH)		Turbidez (UNT)		Cloro (CRL (mg/L))	pH	
		B	T	B	T	T	B	T
I	Seco	40,0	4,0	9,6	0,36	2,12	7,39	6,9
II	Seco	4,0	3,0	0,53	0,48	0,8 - 1,0	-	7,1
III	Seco	24,0	2,0	7,3	0,25	1,0	7,2	7,4
IV	Seco	46,0	4,0	11,0	0,8	1,5	7,06	6,45
V	Seco	21,0	5,0	5,0	1,1	ND	7,04	6,89
I	Chuvoso	70,0	8,0	13,0	0,89	> 2,0	7,1	6,8
II	Chuvoso	12,0	9,0	1,5	1,1	0,7 - 1,0	6,1	6,1
III	Chuvoso	150,0	3,0	45,0	0,29	1,0	7,1	7,3
IV	Chuvoso	97,0	6,0	13,0	0,33	1,5	6,89	6,17
V	Chuvoso	156,0	8,0	36,0	2,2	ND	ND	ND
I	Seco	42,0	6,0	11,0	1,1	1,2	7,3	6,9
II	Seco	2,0	<2	0,65	0,5	1,5	6,5	6,7
III	Seco	24,0	<2	8,6	0,25	0,8	7,3	7,3
IV	Seco	32,0	<2	8,9	0,30	1,0	7,2	6,6
V	Seco	19,0	<2	4,9	0,2	ND	ND	ND

B – bruta T – tratada ND – não disponível CRL – cloro residual livre

Em relação às duas marcas dos kits de imunofluorescência utilizados no estudo, foi verificado que o kit Aqua-glo G/C apresentou o mesmo desempenho em relação à coloração das lâminas, quando comparado ao kit Merifluor, porém com as vantagens de menor custo e maior número de reações.

CONCLUSÃO

O método USEPA 1623, apesar de suas limitações, pode ser utilizado pelos laboratórios de Saúde Pública para pesquisar *Cryptosporidium* e *Giardia* em águas para consumo humano, desde que estejam devidamente equipados e com os profissionais capacitados. Embora não tenham sido detectados oocistos de *Cryptosporidium* spp, a presença de cistos de *Giardia* spp nas amostras analisadas reforça a importância do monitoramento desses protozoários nos mananciais utilizados para captação de água, levando-se em consideração a vulnerabilidade das barreiras químicas e físicas dos sistemas de tratamento em relação à eliminação de parasitas.

Considerando o conjunto dos seis parâmetros estudados, somente a água tratada da ETA do município III estava de acordo com a legislação vigente, enquanto as demais amostras estavam em desacordo tanto para água bruta como tratada, em pelo menos um dos parâmetros.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Dra. Elayse Maria Hachich da Companhia de Tecnologia em Saneamento Ambiental e aos funcionários do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da CETESB, pelas orientações técnicas que permitiram a realização desse trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Nime FA, Burek JD, Page DL, Holscher MA, Yardley JH. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterol*. 1976;70(4):592-8.
2. Meisel JL, Perera DR, Meligro C, Rubin CE. Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterol*. 1976;70(6):1156-60.
3. Cacció SM, Thompson RCA, McLauchlin J, Smith HV. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends Parasitol*. 2005; 21(9):430-7.
4. Pereira JT, Soccol VT, Costa AO, Castro EA, Osaki SC, Paulino RC. *Cryptosporidium* spp: para controlar é necessário conhecer. *Rev Saúde Amb*. 2009;10(2):13-25.
5. Adam RD. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14(3):447-75.
6. Paulino RC. Detecção molecular de *Giardia* spp em amostras fecais e água: extração de DNA genômico, PCR e RFLP. [tese de doutorado]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2005.
7. Almeida A, Moreira MJ, Soares S, Delgado ML, Figueiredo J, Silva E et al. Biological and genetic characterization of *Cryptosporidium* spp and *Giardia duodenalis* isolates from five hydrographical basins in northern Portugal. *Korean J Parasitol*. 2010;48(2):105-11.
8. Lima EC, Stamford TLM. *Cryptosporidium* spp no ambiente aquático: aspectos relevantes da disseminação da disseminação e diagnóstico. *Ciênc Saúde Colet*. 2003;8(3):791-800.
9. Clarck DP. New insights into human cryptosporidiosis. *Clin Microbiol Rev*. 1999;12(4):554-63.
10. Vernile A, Nabi AQ, Bonadonna L, Briancesco R, Massa S. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Italian water supplies. *Environm Monit Assess*. 2009;152:203-7.
11. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. *Diário Oficial [da] União, Brasília, DF, 26 mar. 2004. Seção I, p. 266-70.*
12. United States Environmental Protection Agency (USEPA). Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/ FA, EPA-821-R-99-006, 1999.
13. United States Environmental Protection Agency (USEPA). Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/ FA, EPA-815-R-05-002, 2005. [acesso em 5 dez 2006]. Disponível em: <http://www.epa.gov/microbes/>.
14. Bennett JW, Gauci MR, Le Moënic S, Schaefer III FW, Lindquist HAD. A comparison of enumeration techniques for *Cryptosporidium parvum* oocysts. *J Parasitol*. 1999;85(6):1165-8.
15. American Public Health Association (APHA). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater 19th ed. Washington, 1995.
16. Machado ECL. Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp em águas superficiais na região metropolitana de Recife/PE. [tese de doutorado]. Pernambuco: Universidade Federal de Pernambuco; 2006.
17. Muller APB. Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp em águas de abastecimento superficiais e tratadas da região metropolitana de São Paulo. [dissertação de mestrado]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1999.
18. Cantusio Neto R. Ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* spp e cistos de *Giardia* spp em diferentes pontos do processo de tratamento de água. [dissertação de mestrado]. São Paulo: Universidade Estadual de Campinas; 2004.
19. Sales TFSM. Detecção de enteroparasitas e organismos do zooplâncton em água de consumo humano: risco à saúde pública. [dissertação de mestrado]. Pernambuco: Universidade Federal de Pernambuco; 2006.

20. LeChevallier MW, Norton WD, Lee RG. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp in surface water supplies. *Appl Environm Microbiol*. 1991;57(9):2610-6.
21. Brasil - Ministério do Meio Ambiente - Conselho Nacional do Meio Ambiente/ CONAMA. Resolução 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Diário Oficial [da] União, Brasília, DF, 18 mar. 2005a. n. 53, Seção I, p. 58-63.
22. Hachich EM. Avaliação da presença dos protozoários *Giardia* spp e *Cryptosporidium* spp em águas superficiais destinadas a captação e tratamento para consumo humano no estado de São Paulo. [tese de doutorado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2002.
23. Junqueira VCA, Cantusio Neto R, Silva N, Terra JH, Silva DF. Ocorrência de esporos de *Clostridium perfringens* em amostras de águas brutas e tratadas, na cidade de Campinas, São Paulo, Brasil. *Rev Hig Alim*. 2006;20(144):106.

Influência de fatores climatológicos na ocorrência de microcistina

Influence of climatic factors on the occurrence of microcystin

RIALA6/1315

Fernando Stopato da FONSECA^{1*}, Valter RUVIERI², Eduardo Makoto ONAKA¹, Rosana LISBOA Santana³, Maria Anita SCORSAFAVA³, Myrna SABINO²

Endereço para correspondência: ¹Centro Avançado do Pescado Continental, Instituto de Pesca, São José do Rio Preto/SP, Brasil. (17) 3232-1777. E-mail: fstopato@pesca.sp.gov.br

²Centro de Contaminantes, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil

³CPDSA-LDBR, Instituto Biológico, São Paulo, SP, Brasil

Recebido: 24.02.2010 – Aceito para publicação: 29.12.2010

RESUMO

As toxinas de cianobactérias têm sido um problema de saúde pública pela capacidade de contaminar águas dos reservatórios. Microcistinas (MCs) são compostos fortemente hepatotóxicos produzidos por diferentes cianobactérias, sendo a mais comum a *Microcystis aeruginosa*. Este estudo, realizado em 2005, pesquisou a ocorrência de MCs na região noroeste do Estado de São Paulo, bem como sua relação com a temperatura e o índice pluviométrico. A pesquisa de MCs nas amostras de água foi realizada por meio de ELISA (kit comercial), empregando-se anticorpo monoclonal. As concentrações de MCs mostraram variação temporal e foram relativamente menores durante as altas temperaturas. Apesar da contaminação detectada não ser considerada alta, recomenda-se a realização de constante monitoramento.

Palavras-chave. microcistina, *Microcystis aeruginosa*, cianobactéria, floração, ELISA, toxinas.

ABSTRACT

Cyanobacteria toxins have been a public health problem, due to the ability in contaminating waters of reservoirs. Microcystins (MCs) are strongly hepatotoxic produced by various cyanobacteria, notably *Microcystis aeruginosa*. The present investigation, conducted in 2005, aimed at studying the occurrence of MCs in the northwestern region of São Paulo State, and also its relationship with temperature and rain falls, which favor the development of cyanobacteria. The MCs were determined in water samples by means of commercial ELISA kit using a monoclonal antibody. Concentrations of MCs showed temporal variation and being relatively lower during the high temperatures. In spite of the contamination has not been high, a constant monitoring is recommended.

Key words. microcystin, *Microcystis aeruginosa*, cyanobacteria, bloom, ELISA, toxins.

INTRODUÇÃO

O enriquecimento de nutrientes nas massas de água é um processo natural que pode ocorrer em qualquer sistema aquático. No entanto, uma aceleração desse processo devido às ações antropogênicas tem sido observada nos últimos anos¹. A ocorrência de florescimentos de cianobactérias em reservatórios eutrofizados tem sido um problema mundial².

A proliferação de cianobactérias em ambientes eutróficos ocorre nos meses favorecidos pela temperatura da água em torno de 22°C, sendo chamada de floração ou proliferação de algas³. A cianobactéria *Microcystis* é a espécie mais encontrada em florações nestes ambientes, sendo que a maioria produz toxinas denominadas de microcistinas⁴. De 30 a 50% das espécies de cianobactérias produzem toxinas, entretanto, somente através da análise laboratorial é possível determinar se uma colônia de algas é produtora de toxinas⁵.

As microcistinas, juntamente com as neurotoxinas, são as principais toxinas de cianobactérias e, tanto podem ser letais em baixas concentrações, como, em doses sub-letais, podem levar a alguns tipos de câncer. Essas toxinas são extremamente resistentes e podem bioacumular nos alimentos⁶, como relatado em cultivo de alface irrigado por aspersão⁷.

A maioria das cianobactérias tem maior taxa de crescimento em temperaturas superiores a 25°C⁸, sendo que temperaturas entre 18 e 25°C ajudam na produção de cianotoxinas, enquanto temperaturas abaixo de 10°C e acima de 30°C diminuem sua produção⁹. Em testes laboratoriais para a determinação de produção de cianotoxinas, o parâmetro temperatura, aliado à idade da cultura de cianobactérias é um dos mais estudados, seguido dos parâmetros luminosidade, nutrientes, salinidade, pH e concentração de micronutrientes⁸.

O *bloom* de cianobactérias pode ser favorecido pelo uso excessivo de fertilizantes e esterco em produções agrícolas, que podem vir a contaminar a água na época das chuvas intensas ou tempestades – grande parte das perdas anuais de fósforo da terra pode ocorrer em apenas uma ou duas tempestades¹⁰, assim como pela baixa pluviosidade⁸.

Atualmente, os métodos mais promissores para quantificação e detecção de microcistinas são aqueles que envolvem imunoenaios, pois são capazes de monitorar nos níveis orientados pela Organização Mundial de Saúde (OMS), são específicos, exigem processo simples de transformação da amostra e são de fácil execução¹¹.

Com base nestas informações, os objetivos deste trabalho foram detectar a presença de microcistinas em águas na região noroeste do Estado de São Paulo, local que apresenta poucos dados sobre a floração de cianobactérias e suas toxinas, e avaliar a influência dos fatores climatológicos (temperatura e índice pluviométrico) no desenvolvimento de cianobactérias.

MATERIAL E MÉTODOS

Área estudada e amostras

Em São José do Rio Preto (SJRP) e região foram escolhidos 10 pontos potencialmente favoráveis à presença de cianobactérias, em três períodos distintos de coleta durante o ano de 2005 (totalizando 30 amostras). A escolha destes pontos foi feita a partir de informações obtidas em relatos pessoais sobre locais onde já ocorreram mortalidade de organismos aquáticos e *bloom* de cianobactérias, devido a diferentes fontes de poluição:

- Industrial (margem do rio Felicidade – SJRP);
- Agrícola (Pólo Centro Norte APTA no trapiche do reservatório em Pindorama);
- Resíduo industrial e extração de areia (margem do rio Turvo, em Icém);
- Aquicultura em tanque-rede (ribeirão Santa Bárbara, em Buritama, na margem e no meio do ribeirão a montante, jusante e dentro da produção);
- Poluição doméstica (reservatório de SJRP, nas barragens da represa nova e velha).

Também foi coletado em ponto que seria inicialmente considerado como controle, localizado em uma reserva ecológica onde não ocorreram *bloom* ou mortalidade de organismos aquáticos, porém descobriu-se possível contaminação ambiental via agricultura e pecuária (Instituto Penal Agrícola IPA-SJRP, no trapiche da represa), sendo então considerado como de contaminação agropastoril.

A Tabela 1 apresenta as indicações de latitude e longitude dos pontos de coleta obtidas por dispositivo GPS (Global Positioning System) IPS-760 – Sony.

Para determinar o período das chuvas e temperatura média mensal foram utilizados dados fornecidos pelo Escritório de Desenvolvimento Rural de São José do Rio Preto e Icém, além de informações do Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas (CIIAGRO) na região de Pindorama e de Buritama. Tomando por base esses dados, foram escolhidos três períodos de coleta de água para análise de microcistina, determinação da temperatura da água no local e obtenção da temperatura média e pluviometria com os órgãos já citados.

Tabela 1. Localização geográfica dos pontos de coleta

Local	Latitude			Longitude		
Buritama (ponto 1)	21°	0´	945S	50°	4´	211W
Buritama (ponto 2)	21°	1´	81S	50°	4´	568W
Buritama (ponto 3)	21°	2´	85S	50°	4´	960W
Buritama (ponto 4)	21°	0´	966S	50°	4´	610W
Represa velha*	20°	48´	731S	49°	22´	550W
Represa nova*	20°	43´	911S	49°	21´	345W
Pindorama	21°	13´	718S	48°	55´	675W
Rio Felicidade	20°	46´	646S	49°	21´	426W
IPA**	20°	50´	771S	49°	26´	483W
Icém	20°	25´	371S	49°	16´	60W

*São José do Rio Preto

**Instituto Penal Agrícola

A primeira coleta foi realizada no final de julho e início de agosto, que correspondeu ao período de precipitação e temperatura mais baixo. A segunda coleta foi realizada em outubro, que correspondeu ao começo das chuvas e altas temperaturas. A terceira coleta foi realizada em dezembro, no período de maior índice pluviométrico e de temperatura mais elevada.

Em cada um dos pontos definidos foram coletadas águas superficiais em potes de 100 mL. Em todas as 30 amostras foram efetuadas as análises de microcistina.

Quantificação das microcistinas

Todas as amostras foram resfriadas e, posteriormente, congeladas em laboratório, sendo sonicadas antes da análise em disruptor de células ultrassônico durante 20 minutos, para homogeneizar a amostra e liberar a microcistina.

Para a quantificação foi utilizado o protocolo do Kit Beacon de Análise de Microcistina Totais em placa de imunoafinidade - Kit ELISA, sendo as amostras analisadas em triplicata. Este kit possui limite de quantificação (LQ) de 0,1 µg/L e limite de detecção (LD) de 0,083 µg/L, controle negativo (0 µg/L de microcistina LR), padrão de microcistina-LR de 0,1 µg/L, 0,3 µg/L,

0,8 µg/L e 2,0 µg/L e controle interno de microcistina de 1 µg/L.

Análise estatística

Foi realizada através do sistema de análise estatística SAS para Correlação de Pearson.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período do estudo foi possível observar menor pluviosidade devido, aos efeitos de *La Niña*, fenômeno que esfria a massa de ar a partir do Oceano Pacífico e provoca chuvas na região nordeste do país, seca na região sul e deixa o ano atípico.

As chuvas que normalmente começam em setembro e, gradualmente, aumentam mês a mês até dezembro, tiveram um desempenho variável (Figuras 1, 2 e 3). A precipitação total no período de julho a dezembro de 2005 foi de 589,7 mm, em SJRP, 553,6 mm em Buritama e 350,5 mm em Pindorama. As maiores taxas de precipitações foram 275 mm na região de SJRP (em dezembro), 172 mm em Buritama (em dezembro) e 112,1 mm em Pindorama (em outubro), enquanto a menor pluviosidade verificada em SJRP e em Buritama foi 0 mm (em agosto) e 0,7 mm em Pindorama.

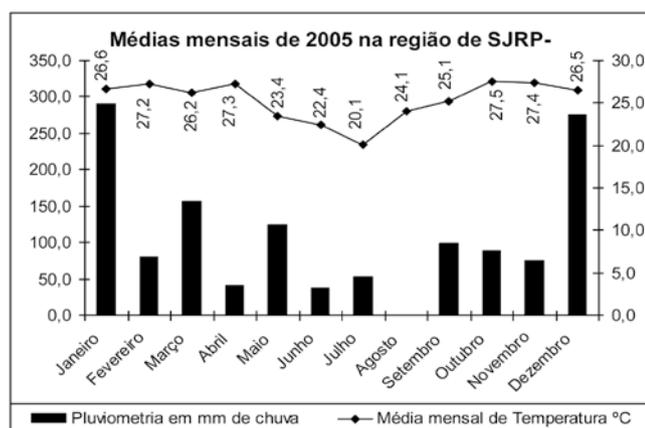


Figura 1. Médias mensais de índice pluviométrico e temperatura, verificadas na região de São José do Rio Preto, em 2005 (fonte: Escritório de Desenvolvimento Rural de São José do Rio Preto)

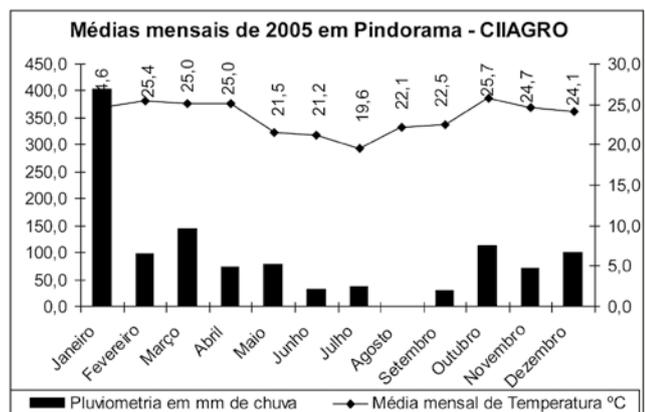


Figura 2. Médias mensais de índice pluviométrico e temperatura, verificadas na região de Pindorama, em 2005 (fonte: Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas - CIIAGRO)

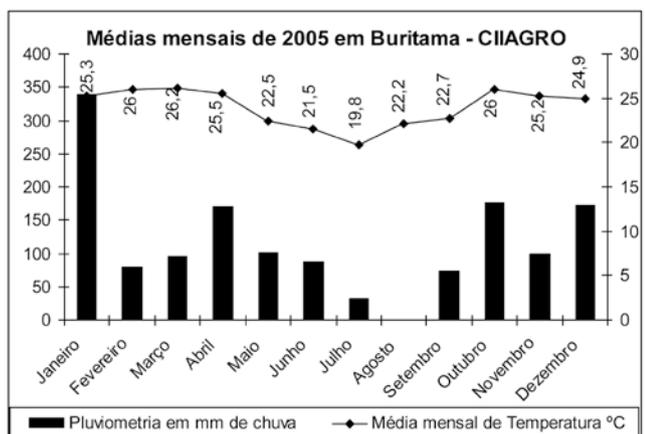


Figura 3. Médias mensais de índice pluviométrico e temperatura, verificadas na região de Buritama, em 2005 (fonte: Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas - CIIAGRO)

As temperaturas médias mais altas foram verificadas durante o estudo em outubro – 27,5°C na região de SJRP, 26,2°C na região de Buritama e 25,7°C em Pindorama – enquanto as temperaturas mais baixas foram verificadas em julho – seguindo a mesma ordem: 20,1°C, 19,8°C e 19,6°C.

A temperatura da água não foi constante durante o experimento (Tabela 2), sendo verificadas diferenças entre os pontos e o período de coleta. A temperatura da água não foi considerada homogênea, devido às diferentes profundidades dos corpos d’água e à incidência de chuvas.

Desta forma, podemos teorizar que a temperatura pode ser um fator limitante para o crescimento de organismos aquáticos nessas regiões, sendo que apenas espécimes resistentes apresentam vantagens nessas condições. De acordo com Kamogae et al¹², o melhor desenvolvimento das cianobactérias ocorre em água pouco turbulenta com temperaturas entre 18°C e 30°C, condições estas muito próximas às verificadas no período deste estudo, em todos os pontos.

A curva padrão da microcistina foi construída conforme procedimento indicado no kit, utilizando seus padrões e ajuste por análise de regressão não linear. Os resultados obtidos indicaram leitura do controle interno de microcistina 1 µg/L, dentro da faixa recomendada pelo kit (0,8 a 1,3 µg/L), e com a seguinte equação da reta para cálculo da concentração de microcistina nas amostras: $Y = -49189X + 42766$, onde X é o logaritmo da concentração da amostra, Y é a leitura de absorbância da amostra ($r = -0,9983$). A Tabela 2 apresenta também os valores médios de concentração de microcistina obtidas nas amostras.

A detecção de microcistinas deve servir como advertência às instituições que trabalham com saúde pública. No ponto de Pindorama foram detectadas concentrações de microcistinas acima do limite máximo recomendado pela OMS, de 1 mg/L de água potável, sendo esta uma região onde os residentes queixam-se de frequentes *blooms* de algas em reservatórios e lagos, utilizados em atividades recreativas, como pesca e natação e/ou utilizados como fonte de água para produção agropastoril.

Apesar desta elevada prevalência, 73% de presença de microcistina, não foram encontrados valores elevados de microcistina como aqueles obtidos por Kamogae et al¹² na represa de Itaipu em Santa Terezinha/PR, cuja concentração foi de 30236 µg/L. Entretanto, a concentração obtida na região de São José do Rio Preto, de 3,18 µg/L, foi acima daquela encontrada por Kamogae et al¹² em Capivari/PR, de 1,7 µg/L.

Tabela 3. Temperatura da água (em °C) verificada durante a coleta e concentração média de microcistina obtida nas amostras

Amostra	Temperatura (°C)			Concentração (µg/L)*		
	Agosto	Outubro	Dezembro	Agosto	Outubro	Dezembro
Buritama 1	20,4	27,2	26,1	0,28	0,17	0,32
Buritama 2	20,5	27,1	26,1	0,16	0,16	0,38
Buritama 3	20,5	27,1	26,4	0,14	0,12	0,31
Buritama 4	20,4	27,3	26,1	0,13	0,19	0,31
Represa Velha [#]	20	24,8	27	0,09	0,10	0,09
Represa Nova [#]	19,8	24,9	25,7	0,10	ND**	ND**
Pindorama	19,8	28,2	26,9	3,18	0,58	1,39
Felicidade	18,2	23,3	24	ND**	ND**	1,50
IPA ^{##}	21	32,7	26,9	0,34	0,54	ND**
Icém	18,4	26	25,9	0,29	ND**	2,47
Controle do kit				0,82		

Limite de quantificação (LQ): 0,1 µg/L

Limite de detecção (LD): 0,083 µg/L

[#]São José do Rio Preto

^{##}Instituto Penal Agrícola

*Média das triplicatas

**ND = não detectado

O resultado do teste ELISA revelou uma variação média das concentrações de microcistina em amostras entre 0,09 µg/L em SJRP, e 3,18 µg/L em Pindorama, durante o período que diminuiu com o aumento da temperatura da água. Por outro lado, quando a temperatura da água diminui, a concentração de microcistina aumentou de forma significativa ($p < 0,01$). Isto indica que a temperatura mais alta pode diminuir a produção de microcistina, entretanto é prudente verificar este fato mais detalhadamente.

O índice pluviométrico, que também está relacionado negativamente com a temperatura ($p < 0,01$), pode ter influenciado a produção de microcistina, pois no período de amostragem, a concentração da microcistina na água pode ter sido diluída pela chuva, que também contribuiu na queda da temperatura. No último período, o decréscimo da temperatura e pluviosidade contribuíram para o aumento da concentração de microcistina.

A correlação negativa entre a temperatura (°C) e microcistina (52%), com nível de significância de 1%, pode ter ocorrido devido às altas temperaturas encontradas no local (acima de 22°C), que poderia ajudar no crescimento e reprodução de cianobactérias³.

A ocorrência de *bloom* foi observada com muita frequência em Pindorama nos anos anteriores. A concentração máxima de microcistina durante o período

de monitoramento chegou a 3,18 µg/L. Esta concentração é superior ao limite de segurança de 1 µg/L proposto pela OMS para água potável.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos indicaram a presença de cianotoxinas na região noroeste do Estado de São Paulo, em concentrações que apresentaram variação temporal e foram relativamente mais baixas durante as altas temperaturas para aquela região.

Embora o nível de contaminação de microcistina na região noroeste do Estado de São Paulo não tenha sido elevado, os resultados deste estudo indicam que, considerando o risco que a presença de microcistinas oferece ao ecossistema aquático e à saúde da população, é necessário o monitoramento rotineiro da concentração de microcistinas e o controle da taxa de eutrofização da água na região noroeste do Estado de São Paulo.

Apesar da legislação nacional para água potável determinar o valor máximo permitido de microcistina de 1µg/L, não há limites definidos de microcistina para mananciais. Este estudo sugere que tal limite deve ser estabelecido, considerando que essas águas servem para irrigação e outros usos primordiais à humanidade.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Dra. Maria do Rosário Lopes e Dra. Cecília Cristina Marques dos Santos pela guarda das amostras coletadas no presente trabalho e ao Dr. Titan (EUA) por ceder o kit de ELISA.

Este trabalho foi apoiado pelo Instituto de Pesca APTA (Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios) (Projeto nº 2195) e pelo Instituto Adolfo Lutz (projeto CCD-BQ nº 03/05).

REFERÊNCIAS

1. Vieira JMS, Azevedo MT, Azevedo SMFO, Honda RY, Corrêa B. Toxic cyanobacteria and microcystin concentrations in a public water supply reservoir in the Brazilian Amazonia region. *Toxicon*. 2005; 45:901-9.
2. Carmichael WW. Cyanobacteria secondary metabolites-the cyanotoxins. *J Appl Bacteriol*. 1992; 72: 455-9.
3. Kamogae M. Monitoramento de microcistina e estudo de parâmetros que favorecem o seu desenvolvimento em represa de Itaipu, Capivari e Três Bocas [tese de doutorado]. Londrina (PR): Universidade Estadual de Londrina; 2002.
4. Kurmayer R, Christiansen G, Chorus I. The abundance of microcystin-producing genotypes correlates positively with colony size in *Microcystis* sp and determines its microcystin net production in Lake Wannsee. *Appl Environ Microbiol*. 2003; 69(2):787-95.
5. Ferreira RR, Cavenaghi AL, Velini ED, Corrêa MR, Negrisoli E, Bravin LFN et al. Monitoramento de fitoplâncton e microcistina no Reservatório da UHE Americana. *Planta Daninha*. 2005; 23(2):203-14.
6. Aboal M, Puig MA. Intracellular and dissolved microcystin in reservoir of the river Segura basin, Murcia, SE Spain. *Toxicon*. 2005; 45: 509-18.
7. Codd GA, Metcalf JS, Beattie KA. Retention of *Microcystis aeruginosa* and microcystin by salad lettuce (*Lactuca sativa*) after spray irrigation with water containing cyanobacteria. *Toxicon*. 1999; 37(8): 1181-5.
8. Mur LR, Skulberg OM, Utkilen H. Cyanobacteria in the environment. In: Chorus I, Bartram J, editors. *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. London: St Edmundsbury Press; 1999.p.25-54.
9. Sivonen K, Jones G. Cyanobacterial Toxins. In: Chorus I, Bartram J, editors. *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. London: St Edmundsbury Press; 1999.p.55-124.
10. Kuiper-Goodman T, Falconer I, Fitzgerald J. Human Health Aspects. In: Chorus I, Bartram J, editors. *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. London: St Edmundsbury Press; 1999.p.125-160
11. McElhiney J, Lawton LA. Detection of the cyanobacterial hepatotoxins microcystins. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005; 203, 219-30.
12. Kamogae M, Hashimoto H, Pádua CG, Soares FS, Bracarense APFL, Yabe MJS et al. Monitoring microcystin and physicochemical parameters: Role of agricultural-aquaculture activity in the water quality. In: Njapau H, Trujillo S, van Egmond HP, Park DL, editors. *Mycotoxins and phycotoxins. Advances in determination, toxicology and exposure management*. Proceedings of the XIth International IUPAC. EUA: Maryland; 2004.p.17-21.

Eficiência dos métodos microbiológicos e de ATP-bioluminescência na detecção da contaminação de diferentes superfícies

Efficiency of microbiological and ATP-bioluminescence methodologies for detecting contaminants on different surfaces

RIALA6/1316

Talita de OLIVEIRA^{1*}, Antonio Carlos Victor CANETTIERI²

*Endereço para correspondência: ¹Rua Baltazar, 145, Jardim Colonial, São José dos Campos/SP, Brasil. CEP 12234-360. Fone: (12) 3966-1351. E-mail: talitao@gmail.com

²Laboratório de Microbiologia, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP)

Recebido: 08.02.2010 – Aceito para publicação: 05.10.2010

RESUMO

Nos últimos 30 anos, novas técnicas de análise da limpeza de superfícies, como ATP-bioluminescência, têm sido desenvolvidas. Este trabalho comparou a eficácia dos métodos de análise microbiológica de superfície, utilizando-se placas RODAC® e a contagem padrão em placas pela técnica do *swab* com a técnica de ATP-bioluminescência. Analisou-se a contaminação em quatro tipos de material: laminado melamínico, vidro, plástico e aço inox. As coletas das amostras foram realizadas em quatro períodos, e em cada período, após a desinfecção com álcool 70%, e após sete dias de contaminação pela exposição ao ambiente de laboratório de microbiologia. Houve total concordância entre as metodologias após a assepsia com álcool 70%. Após a contaminação da superfície dos materiais no ambiente de laboratório microbiológico, houve 63,6% de concordância entre o método clássico e das placas RODAC® ($p = 0,006$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os materiais analisados quanto à contaminação após a exposição ao ambiente. Ao efetuar a análise de contaminação de superfícies, os métodos microbiológicos (clássico e placa RODAC®) não podem ser substituídos pela técnica de ATP-bioluminescência, apesar desta metodologia ser rápida em indicar se uma superfície está adequadamente limpa.

Palavras-chave. estudos de avaliação, análise microbiológica, contaminação, desinfecção.

ABSTRACT

In the last 30 years new technologies to analysis the surface cleaning procedures based on rapid technique have been developed. This study compared the efficacy of classic methodologies for microbiological analysis on surfaces, using RODAC® plates and swab, and ATP-bioluminescence technique. The microbiological burden was evaluated on four materials: melaminic laminate, glass, plastic and stainless steel. Samples were collected in four different periods, and at each period the samples were collected from the surfaces after applying a cleaning procedure using alcohol 70% and after being exposed to the in a microbiology laboratory for seven days. A concordance of 100% was found between the classic methodologies and the ATP-bioluminescence technique after cleaning procedure; after the atmosphere exposition, 63,6% of agreement was found between the classic methodology and the RODAC® plates technique ($p = 0,006$). No significant differences was observed in CFU among four materials after being exposed to atmosphere for seven days. For conducting contaminants analysis on surfaces the classic microbiological methods cannot be replaced by ATP-bioluminescence technique; although the last one can rapidly indicate whether a surface is clean or not, but it should be used along with classic methodologies.

Key words. validation studies, microbiological analysis, contamination, disinfection.

INTRODUÇÃO

O estudo de organismos bioluminescentes tem trazido avanços muito significativos nas áreas de biotecnologia¹. O sistema de ATP-bioluminescência, para a validação de limpeza em superfícies, é um dos benefícios obtidos através de pesquisas realizadas com organismos bioluminescentes. Esse sistema utiliza a enzima luciferase, derivada de vaga-lumes, que é altamente sensível à presença de ATP².

A contagem padrão em placas pela técnica do *swab* foi muito utilizada de 1900 até a década de 80³. Ainda hoje a técnica de esfregaço em superfície tem se mostrado uma importante ferramenta na validação de limpeza em diversas áreas, como a indústria de alimentos⁴, porém novas técnicas de análise, utilizando métodos mais rápidos, têm sido desenvolvidas desde então³.

Pode-se definir como “rápido” qualquer método destinado à detecção, contagem e caracterização de micro-organismos do qual se obtém resultados de maneira simples, confiável e em menor tempo do que com os métodos convencionais⁵. Estes novos métodos detectam resíduos de matéria orgânica (dejetos alimentares, micro-organismos) oriundos de uma limpeza deficiente, e os resultados são obtidos em tempo real, indicando se a superfície está limpa ou não⁶.

As moléculas de ATP reagem com o complexo enzimático luciferina-luciferase e esta reação irá gerar luz. A intensidade desta luz será medida através de um luminômetro, pois para cada molécula de ATP consumida será gerado um fóton de luz². Portanto, quanto maior a concentração de ATP na superfície, maior será a intensidade de luz emitida, expressa em URL (Unidade Relativa de Luz)⁷.

As placas de contato RODAC® têm sido recomendadas em muitos estudos para quantificar a contaminação microbiana de superfícies, como chão, parede, mesa, cama e pele humana. O seu método de aplicação é simples, rápido e ideal para mensurar a contaminação de grandes áreas onde muitas amostras são necessárias para validação estatística⁸.

Costa et al³ afirmaram que análises microbiológicas tradicionais da água e dos alimentos são trabalhosas e requerem um período de tempo longo, tornando mais difícil controlar procedimentos de limpeza e sanitização. Para atender a demanda das indústrias alimentícias, métodos rápidos e sensíveis têm sido desenvolvidos, estes métodos são baseados em crescimento ou

metabolismo microbiano e utilizam princípios de ATP-bioluminescência, biofísica, radiometria entre outros⁷. A rapidez da leitura dos resultados do método de ATP-bioluminescência é uma das principais vantagens para sua aplicação, conforme relatado por Oliveira et al⁹.

Este trabalho teve como objetivo comparar a eficácia do método microbiológico clássico (contagem padrão em placas pela técnica do *swab*), do método das placas RODAC® e do método de ATP-bioluminescência na análise da contaminação de 4 diferentes superfícies de materiais (laminado melamínico, vidro, plástico e aço inox), geralmente encontrados na composição de bancadas, equipamentos e outros objetos utilizados em análises microbiológicas, expostas ao ambiente de um laboratório de microbiologia, por 7 dias, antes e após a desinfecção das mesmas com álcool 70%.

MATERIAL E MÉTODOS

Todas as amostragens e análises deste trabalho foram realizadas em um laboratório de Microbiologia na cidade de São José dos Campos/SP.

Para comparar a eficiência entre o método de ATP-bioluminescência (utilizando o sistema Lightning® da Biocontrol) e os métodos de análise microbiológica de superfície (contagem padrão em placas pela técnica do *swab*, denominado de método clássico; e com placas RODAC®), foram utilizados quatro tipos de material: 1 placa de laminado melamínico (Formica®) de 20 cm X 60 cm; 1 placa de vidro de 20 cm X 60 cm; 1 placa de aço inox de 20 cm X 60 cm e 3 placas de Petri de plástico (esterilizadas) de 150 mm X 15 mm.

Foram realizadas 4 amostragens, com as mesmas placas de materiais, em intervalos de 3 meses entre as coletas. Em cada amostragem, coletou-se material em duas situações: após desinfecção das superfícies com álcool 70%, e após 7 dias de exposição das mesmas superfícies ao meio ambiente, representando a contaminação dessas superfícies expostas ao ambiente de trabalho de um laboratório de microbiologia.

As placas de laminado melamínico, vidro e aço inox foram divididas em três partes iguais, de 20 cm X 20 cm cada parte, para uma análise de superfície: uma para o método clássico, outra para a análise com placas RODAC® e mais uma para o método de ATP-bioluminescência. O mesmo foi feito com as placas de Petri (plástico esterilizado), uma placa para cada método de análise.

As placas sofreram desinfecção com álcool 70%. O álcool foi borrifado nas placas até que toda a superfície das mesmas estivesse coberta por ele. Deixou-se então o álcool 70% agir durante 15 minutos. Após, amostragens utilizando *swab*, placas de contato RODAC® e *swab* de ATP-bioluminescência foram coletadas em todos os materiais estudados.

Método clássico (contagem padrão em placas pela técnica do *swab*)

A coleta da amostra foi realizada em uma área central de 25 cm² em cada material. Logo após a utilização dos *swabs*, umedecidos em solução salina esterilizada, nas superfícies estudadas, estes foram inseridos em tubo de ensaio, quebrando-se a extremidade que entrou em contato com os dedos. A solução foi homogeneizada em agitador Vortex®, durante 10 a 15 segundos. Em fluxo laminar uma alíquota de 1 mL foi pipetada em placa de Petri estéril e, a seguir, foram vertidos os meios de cultura fundidos e resfriados a 45°C, TSA (Tryptone Soya Agar, OXOID) com o corante TTC (Triphenyl Tetrazolium Chloride), para facilitar a contagem das colônias bacterianas e SDA (Sabouraud Dextrose Agar, OXOID) para pesquisa de bolores e leveduras. As placas foram incubadas a 30-35°C, por 48h, e 20-25°C, por 5 dias, respectivamente. Após a incubação, procedeu-se a contagem de colônias e o cálculo das unidades formadoras de colônia (UFC) foi realizado. O resultado individual foi multiplicado por 4 e expresso em UFC/25 cm², de acordo com Aguiar¹⁰.

Método das placas RODAC®

Em cada amostragem foram utilizadas oito placas RODAC®, duas placas para cada tipo de material, uma placa contendo meio de cultura TSA e outra com SDA, para pesquisa de bolores e leveduras. Cada placa foi submetida ao contato direto de seu meio de cultura com a superfície avaliada através de uma leve pressão por 10 segundos. As placas de TSA e SDA foram incubadas a 30-35°C, por 48h, e a 20-25°C, por 5 dias, respectivamente. Após a incubação, procedeu-se a contagem de colônias e o cálculo das UFC.

Método de ATP-bioluminescência

Nas amostragens com o método de ATP-bioluminescência foi utilizado o sistema Lightning® (BIOCONTROL). O *swab* de bioluminescência foi removido de seu tubo e uma área central de 25cm² foi

avaliada em cada material. Após, o *swab* foi ativado pressionando o êmbolo totalmente para baixo e depois inserido no luminômetro Lightning® e a leitura foi realizada. O resultado da leitura foi exibido após 10 segundos na tela do aparelho. A interpretação dos resultados foi feita e expressa em valores relacionados às zonas de limpeza definidas no aparelho.

Coleta de amostras após exposição ao meio ambiente

Logo após a essa primeira coleta, as superfícies dos 4 materiais foram limpas com uma gaze umedecida em álcool 70% e expostas ao ambiente de um laboratório microbiológico por 7 dias, sem o contato direto dos analistas, mas recebendo todo material particulado gerado durante a rotina de trabalho no laboratório de Microbiologia.

Os materiais estudados foram acomodados em cima de um armário, a 2,30m do chão, e não receberam nenhum tipo de limpeza durante o período em que ficaram expostos. Após os 7 dias de exposição, os materiais foram submetidos as análises microbiológicas descritas anteriormente.

Interpretação dos resultados

As médias de UFC, obtidas após as quatro etapas de coletas, foram comparadas com valores padrões e classificadas em categorias: aceitável, inadequado e inaceitável (Tabela 1). Esses valores de UFC de referência foram baseados em dados obtidos nos últimos 2 anos, em monitoramentos prévios realizados no laboratório (dados não apresentados).

Os resultados obtidos no método de ATP-bioluminescência foram medidos em fótons e convertidos em zonas de limpeza. As zonas de limpeza são expressas em intervalos de 0 a 7,5 URL (Unidade Relativa de Luz). Esta escala é a conversão dos fótons em uma escala logarítmica base 10, que utiliza a fórmula da escala Richter: ML (Magnitude Local) = logA - logAo, onde A representa a amplitude máxima medida no sismógrafo e Ao uma amplitude de referência. Os valores de referência para classificação dos resultados em categorias se encontram na Tabela 1.

O grau de concordância entre as técnicas, após a divisão dos resultados em categorias (aceitável, inadequado, inaceitável), foi medido pelo índice de concordância de Kappa. Utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparar os quatro tipos de materiais em cada uma das três técnicas avaliadas. O intervalo de confiança das análises estatísticas foi de 95% (p < 0,05).

Tabela 1. Valores limítrofes para a classificação em categorias dos resultados obtidos das análises das diferentes superfícies

Método	Aceitável	Inadequado	Inaceitável
Clássico (UFC/25cm ²)	Menor de 25	Entre 25 - 50	Mais de 50
RODAC® (UFC)	Menor de 25	Entre 25 - 50	Mais de 50
ATP-bioluminescência (URL/25cm ²)	Menor de 2,6	Entre 2,6 - 3,0	Mais de 3,0

RESULTADOS

Não houve crescimento de micro-organismos nos meios de cultura após a desinfecção com álcool (método clássico e método da placa RODAC®) e culturas microbianas apenas foram observadas nas análises realizadas após a exposição dos materiais por 7 dias ao ambiente. Apresentamos a contagem total de UFC, representando a somatória das UFC bacterianas e fúngicas.

Para a técnica de ATP-bioluminescência, após a desinfecção, obteve-se que todas as superfícies estavam limpas (menos de 2,6 URL/ cm²). Pôde-se observar nas quatro amostragens, então, que após a desinfecção com álcool 70%, houve concordância total entre o método clássico, método da placa RODAC® e o método de ATP-bioluminescência.

Os resultados numéricos obtidos após exposição dos diferentes materiais ao meio ambiente estão apresentados na Tabela 2, juntamente com a classificação dos dados nas categorias apresentadas na Tabela 1.

Tabela 2. Resultados obtidos pelas técnicas (método clássico, método da placa RODAC® e ATP-bioluminescência) em quatro amostragens, após exposição ao ambiente de laboratório por 7 dias, classificados em categorias (aceitável, inadequado e inaceitável)

Amostragens	Material	Clássico (UFC/cm ²)	RODAC® (UFC)	ATP-biol. (URL/cm ²)
1ª	Laminado	4■	12■	1,6■
	Aço inox	4■	24■	1,6■
	Vidro	8■	24■	3,8•
	Plástico	24■	42◉	3,9•
2ª	Laminado	0■	12■	3,0◉
	Aço inox	8■	17■	3,3•
	Vidro	24■	23■	3,1•
	Plástico	16■	24■	3,6•
3ª	Laminado	60•	70•	2,6◉
	Aço inox	68•	51•	3,0◉
	Vidro	84•	84•	2,8◉
	Plástico	48◉	40◉	3,1•
4ª	Laminado	20■	23■	2,2■
	Aço inox	8■	17■	1,8■
	Vidro	4■	22■	2,2■
	Plástico	24■	24■	1,9■

Categorias: ■ – aceitável; ◉ – inadequado; • – inaceitável

Tabela 3. Concordância entre os métodos clássico, da placa RODAC® e de ATP-bioluminescência

Comparações	Kappa	IC	p
RODAC® / Clássico	63,6%	36,4%	0,006
RODAC® / ATP	-2,9%	29,4%	Não se aplica
Clássico / ATP	-12,7%	21,2%	Não se aplica

A Tabela 3 mostra que existiu 63,6% de concordância estatisticamente significativa entre a técnica Clássica e a de RODAC (p = 0,006). Notou-se que a técnica ATP-bioluminescência discordava dos outros métodos de análise de superfícies, não sendo possível calcular os p-valores com os índices de kappa negativos, não se aplicando o teste de significância

nessas comparações (clássico/ATP-bioluminescência, placas RODAC®/ATP- bioluminescência).

Após a análise estatística de Kruskal-Wallis observou-se que não houve diferença estatística significativa entre os quatro tipos de materiais avaliados, para os métodos clássico, das placas RODAC® e ATP-bioluminescência (p = 0,640; p = 0,498; p = 0,304; respectivamente (tabela 4).

Tabela 4. Comparação entre os resultados obtidos para os quatro tipos de materiais pelo método clássico, da placa RODAC® e de ATP-bioluminescência

Método	Parâmetro	Aço inox	Laminado	Plástico	Vidro
Método clássico	Média	22,0	21,0	28,0	30,0
	Mediana	8,0	12,0	24,0	16,0
	Desvio Padrão	30,7	27,4	13,9	37,0
	N	4	4	4	4
	IC	30,1	26,8	13,6	36,3
	p-valor			0,640	
Placas RODAC®	Média	27,3	29,3	32,5	38,3
	Mediana	20,5	17,5	32,0	23,5
	Desvio Padrão	16,2	27,7	9,8	30,5
	N	4	4	4	4
	IC	15,8	27,1	9,7	29,9
	p-valor			0,498	
ATP-bioluminescência	Média	2,4	2,4	3,1	3,0
	Mediana	2,4	2,4	3,4	3,0
	Desvio Padrão	0,8	0,6	0,9	0,7
	N	4	4	4	4
	IC	0,8	0,6	0,9	0,7
	p-valor			0,304	

DISCUSSÃO

Nesse trabalho procurou-se estabelecer uma relação direta entre os métodos quantitativos microbiológicos e a técnica de ATP-bioluminescência. Oliveira et al⁹ avaliaram a eficiência dos procedimentos de higienização de superfícies de equipamentos através da contagem de micro-organismos em placas e da técnica de ATP-bioluminescência (considerado um método rápido) e concluíram que os resultados obtidos eram comparáveis. Em nosso trabalho também foi observado a praticidade e rapidez da técnica de ATP-bioluminescência, quando comparada aos métodos microbiológicos utilizados.

Obtivemos, também, 100% de concordância nos resultados entre as técnicas utilizadas após desinfecção com álcool 70%, o que demonstrou uma efetiva desinfecção. Costa et al⁷ obtiveram concordância entre os métodos de ATP-bioluminescência e de contagem de mesófilos aeróbios e coliformes totais na análise da qualidade microbiológica da água em uma indústria de laticínios, com ambos dos métodos indicando que a água estava em boa condição de higiene.

De acordo com Griffith⁶, as análises com URL são mais indicadas para refletir como a limpeza foi realizada, indicando se a superfície foi limpa adequadamente. Do mesmo modo, Zottola¹¹ demonstrou que a técnica de ATP-bioluminescência deve ser utilizada como um indicador da condição higiênica, indicando se há matéria orgânica na superfície. Costa et al³ sugeriram que a técnica de ATP-bioluminescência é uma ferramenta apropriada para monitorar a eficiência da limpeza e desinfecção de equipamentos industriais.

Nesta pesquisa, após a exposição das superfícies dos diferentes materiais ao ambiente de trabalho do laboratório, não houve relação direta entre os três métodos (índice de Kappa), o que nos leva a inferir que não se pode relacionar a presença de micro-organismos viáveis com a quantidade de ATP mensurada pelo método de ATP-bioluminescência.

Tal fato foi observado também por Mueller et al¹² que ao compararem o método convencional (contagem em placa) com o de ATP-bioluminescência, dentre outras técnicas, verificaram uma fraca correlação entre ambas, sendo o método com ATP pouco sensível para contagens baixas de UFC.

Uma interferência na técnica de ATP-bioluminescência é a presença de matéria orgânica. Costa et al³ sugeriram que os resíduos de matéria

orgânica presentes em superfícies podem influenciar na reação enzimática que produz o sinal de luz medido pelo luminômetro e que se deve considerar que testes químicos rápidos não são substitutos diretos para os testes microbiológicos convencionais, indicando que não há relação direta entre URL e UFC.

Tal fato foi observado neste trabalho (Tabela 2). Na maioria das vezes, o método ATP-bioluminescência considerou as superfícies como inadequadas ou inaceitáveis. Isso pode ser explicado pela detecção através do aparelho de ATP oriundo de detritos orgânicos e não de micro-organismos viáveis.

Na terceira amostragem, os métodos microbiológicos consideraram as superfícies mais contaminadas que a técnica ATP-bioluminescência, sendo esses resultados discrepantes dos encontrados nas outras observações. Assim como Krysinski et al¹³ analisando superfícies na indústria de laticínios por ATP-bioluminescência e pela contagem de mesófilos aeróbios, demonstraram que o método convencional indicou 44 superfícies com contaminação, contra 17 pelo método ATP-bioluminescência, sendo o método de contagem microbiana considerado mais sensível pelos autores.

Costa et al⁷ relataram também que a técnica de ATP-bioluminescência pode detectar ATP microbiano de células somáticas, de origem vegetal ou animal, porém este método não identifica as espécies microbianas envolvidas na contaminação. Simm et al¹⁴ afirmaram que a determinação de ATP em superfícies deve ser usada como uma técnica auxiliar no monitoramento dos procedimentos de higienização, mas que deve estar associada a outros métodos como o da contagem microbiana.

Sendo assim, a técnica de ATP-bioluminescência deve ser utilizada numa sondagem rápida do nível de limpeza de certa superfície, mas não substitui os métodos microbiológicos clássicos, que devem ser usados num intuito diferente, como por exemplo, no isolamento de espécies patogênicas e determinação de uma cadeia de contaminação cruzada.

Não foi possível comparar quantitativamente o método clássico, a técnica da placa RODAC[®] e o método de ATP-bioluminescência, pois os resultados obtidos nas amostragens geraram dados numéricos, mas em unidades diferentes (UFC/cm², UFC e URL/cm², respectivamente), não comparáveis entre si.

Foi utilizada, então, a categorização em aceitável, inadequado e inaceitável, o que possibilitou a aplicação do índice de concordância de Kappa. Na comparação

da quantidade de UFC obtida em todas as superfícies através do método clássico e da placa RODAC® houve uma concordância de 63,6% ($p = 0,006$) no isolamento da carga microbiana das superfícies, mas deve-se ressaltar que todas as superfícies eram planas, o que possibilitou o uso das placas RODAC®. Esses dados sugerem que se pode utilizar uma ou outra técnica para o estudo microbiológico de um dado material, desde que a superfície seja plana.

Deve-se destacar a diferença que ocorreu entre essas duas técnicas na primeira amostragem com o material plástico, sendo a superfície aceitável pelo método clássico, e a técnica das placas RODAC® indicava que a mesma estava inadequada.

Nesse estudo não encontramos um tipo de material (laminado, aço inox, vidro ou plástico), que permitisse uma maior aderência microbiana. Pelo teste estatístico de Kruskal-Wallis não se observou diferença estatística entre os quatro materiais utilizados, para cada tipo de técnica. Essa análise foi baseada em um teste estatístico não paramétrico, pois, primeiramente, a amostra era pequena e, depois, as suposições iniciais para se utilizar testes paramétricos, como a distribuição de normalidade, não foram consideradas satisfeitas (dados não apresentados).

Jorge¹⁵ citou que o álcool etílico tem sido utilizado, tradicionalmente, na desinfecção das superfícies. Os resultados obtidos com o uso de álcool 70%, neste trabalho, reforçam a importância da desinfecção de superfícies, que devem ocorrer no ambiente de trabalho, assim como, o cuidado que devemos ter com o manuseio de microorganismos em um laboratório de Microbiologia, no intuito de diminuir a geração de aerossóis contaminados que se depositarão nas diversas superfícies de um laboratório, como foi constatado em nosso trabalho, que utilizou quatro tipos de materiais diferentes expostos ao meio ambiente a 2,30 m do solo.

CONCLUSÃO

Após a desinfecção da superfície com álcool 70% houve total concordância entre as três técnicas aplicadas, demonstrando que o método ATP-bioluminescência pode ser utilizado para a validação da limpeza e desinfecção de uma superfície, por se tratar de um método mais rápido que os microbiológicos convencionais.

Álcool 70% foi eficiente na desinfecção de superfícies neste trabalho.

Após a exposição ao meio ambiente por 7 dias, os 4 tipos de materiais analisados não apresentaram diferenças em relação à carga microbiana existente em suas superfícies, baseado na análise das técnicas isoladamente.

Na comparação das técnicas entre si houve apenas concordância (63,6%) entre os resultados obtidos pelo método clássico e de placas RODAC®, e não existiu concordância entre estes e o método ATP-bioluminescência.

REFERÊNCIAS

1. Nunes-Halldorson VS, Duran NL. Bioluminescent bacteria: lux genes as environmental biosensors. *Braz J Microbiol*. 2003;34(2):91-6.
2. SOVNET®. Monitoramento de ATP Lightning®. [Acesso 26 set 2009]. Disponível em: [http://www.sovnet.com.br].
3. Costa PD, Andrade NJ, Brandão SCC, Passos FJV, Soares NFF. ATP-bioluminescence assay as an alternative for hygiene-monitoring procedures of stainless steel milk contact surfaces. *Braz J Microbiol*. 2006;37(3):345-9.
4. Hartmann W. Características físico-químicas, microbiológicas, de manejo e higiene na produção de leite bovino na região oeste do Paraná: ocorrência de *Listeria monocytogenes* [tese de doutorado]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2009.
5. Leotta GA. Métodos rápidos: una herramienta útil y práctica para el análisis microbiológico de los alimentos. *Rev Argent Microbiol*. 2009;41(2):63-4.
6. Griffith C. Improving surface sampling on detection of contamination. In: Lelieveld HLM, Mosterte A, Holah J. *Handbook of hygiene control in the food industry*. Cambridge (UK): Woodhead Publishing; 2005.p.588-618.
7. Costa PD, Andrade NJ, Passos FJV, Brandão SCC, Rodrigues CGF. ATP-bioluminescence as a technique to evaluate the microbiological quality of water in food industry. *Braz Arch Biol Technol*. 2004;47(3):399-405.
8. Andrade D, Angerami ELS, Padovani CR. Condição microbiológica dos leitos hospitalares antes e depois de sua limpeza. *Rev Saude Publica*. 2000;34(2):4-9.
9. Oliveira CAF, Moreno JFG, Mestieri L, Germano PML. Avaliação comparativa das condições higiênicas de equipamentos utilizados na fabricação de embutidos, através das técnicas de bioluminescência de ATP e contagem global de microrganismos. *Hig Aliment*. 1998;12(58):58-63.
10. Aguiar JA. Efetividade de um programa de higiene alimentar implantado em um serviço de alimentação escolar do sistema público [dissertação de mestrado]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo;2003.
11. Zottola EA. Microbial attachment and biofilms formation: a new problem for the food industry? *Food Technol*. 1994;48:107-44.

12. Mueller SA, Anderson JE, Kim BR, Ball JC. Comparison of plate counts, Petrifilm, dipslides, and adenosine triphosphate bioluminescence for monitoring bacteria in cooling-tower waters. *Water Environ Res*. 2009;81:401-6.
13. Krysinski EP, Brown LJ, Marchisello TJ. Effect of cleaners and sanitizers on *Listeria monocytogenes* attached to product contact surfaces. *J Food Prot*. 1992;55:246-51.
14. Simm EM, Andrade NJ, Mendonça RCS, Passos FJV, Chaves, JBP. Interference of some organic substances and microorganisms adhered to stainless steel in ATP-bioluminescence measurement. *Braz Arch Biol Technol*. 2008;51:587-93.
15. Jorge AOC. *Princípios de microbiologia e imunologia*. 1 ed. São Paulo: Santos; 2006.p.281.

Avaliação da resistência de *Salmonella* à ação de desinfetantes ácido peracético, quaternário de amônio e hipoclorito de sódio

The resistance of *Salmonella* strains to the biocides peracetic acid, quaternary ammonium and sodium hypochlorite

RIALA6/1317

Taís Raquel Marcon MACHADO, Patrícia da Silva MALHEIROS*, Adriano BRANDELLI, Eduardo Cesar TONDO

*Endereço para correspondência: Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, 9500, Porto Alegre, RS, Brasil. CEP 91501-970. Fone: 51 3308 6677. E-mail: patimalheiros@yahoo.com.br
Recebido: 20.05.2010 – Aceito para publicação: 29.12.2010

RESUMO

Este estudo avaliou a resistência de três cepas de *Salmonella* frente aos desinfetantes ácido peracético, quaternário de amônio e hipoclorito de sódio. *S. Enteritidis* (SE86), responsável por mais de 90% dos surtos alimentares ocorridos no Rio Grande do Sul (RS), foi comparada com *S. Typhimurium* e *S. Bredeney*, ambas não envolvidas na ocorrência de salmonelose. A resistência aos desinfetantes foi avaliada por meio de teste de suspensão, conforme preconizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Todos os desinfetantes avaliados, nas concentrações indicadas pelos fabricantes, foram capazes de inativar as três cepas de *Salmonella*, entretanto, SE86 apresentou maior resistência ao hipoclorito de sódio a 400 ppm, além de ser a única cepa bacteriana capaz de sobreviver por até 15 minutos de exposição a 200 ppm desse desinfetante. Uma vez que o hipoclorito de sódio, nestas condições, é empregado com frequência como agente de desinfecção em indústrias de alimentos e serviços de alimentação, as características acima mencionadas podem contribuir para que esse microrganismo seja responsável pelos surtos de salmoneloses ocorridos no RS. Em função da importância desses micro-organismos como agentes patogênicos alimentares, cuidados especiais devem ser tomados nos processos de desinfecção e contaminação cruzada por *Salmonella*.

Palavras-chave. *Salmonella*, ácido peracético, hipoclorito de sódio, quaternário de amônio.

ABSTRACT

The resistance of *Salmonella* strains to the biocides peracetic acid, quaternary ammonium and sodium hypochlorite was assessed. *S. Enteritidis* (SE86), which is responsible for more than 90% of food-borne outbreaks occurred in Rio Grande do Sul (RS) was compared to *S. Typhimurium* and *S. Bredeney*, both not related to salmonellosis. The bacterial resistance to biocides was evaluated using the suspension test as recommended by The Brazilian Agriculture Ministry. The three biocides were able to inactivate all of the microorganisms tested, when the concentrations indicated by the manufacturers were used. However, SE86 was resistant to 400 ppm sodium hypochlorite, and survived for up to 15 minutes of exposure to 200 ppm of this biocide, which was not demonstrated by the other bacteria strains. Since the sodium hypochlorite, at such concentration and time of exposure, is frequently used at food industries and food services, and owing to the above cited resistance characteristic, this condition could be contributing for the SE86 with food-borne salmonellosis outbreak occurred in RS. In view of the importance of these microorganisms as alimentary pathogens, special cares in the food disinfection processes and cross-contamination with *Salmonella* must be taken.

Key words. *Salmonella*, peracetic acid, sodium hypochlorite, quaternary ammonium.

INTRODUÇÃO

Salmonella tem sido apontada como a principal causa bacteriana de gastroenterites em diferentes partes do mundo^{1,2}. No Brasil, um significativo aumento na incidência de salmoneloses causadas por *S. Enteritidis* tem sido observado desde a década de 90³⁻⁵. No Estado do Rio Grande do Sul (RS), análises genotípicas de isolados de *Salmonella* revelaram que apenas uma cepa de *S. Enteritidis* (SE86) esteve envolvida em mais de 90% das salmoneloses investigadas entre 1999 e 2006⁶⁻⁹. Embora muitos sorovares de *Salmonella* tenham sido isolados de diferentes alimentos no RS, as razões pelas quais SE86 vem causando a maioria dos surtos alimentares são desconhecidas.

Desinfetantes são substâncias ou preparações químicas capazes de destruir micro-organismos patogênicos, em curto espaço de tempo, quando aplicados em objetos¹⁰. Sua escolha deve ser precedida de uma análise detalhada, levando-se em conta aspectos como uso autorizado do produto pela legislação, grau de toxicidade, poder corrosivo, efeito residual sobre os alimentos, efeito sobre o meio ambiente e o custo¹¹.

O cloro e suas várias formas, provavelmente, são os compostos mais comumente utilizados para a desinfecção em indústrias de alimentos e serviços de alimentação. Tais compostos podem incluir cloro líquido, hipocloritos, compostos clorados orgânicos e inorgânicos e tem apresentado amplo espectro germicida, devido sua ação sobre a membrana celular, inibição de enzimas envolvidas no metabolismo da glicose, danos no DNA e oxidação de proteínas celulares¹². A quantidade de cloro livre que estará presente na solução dependerá do pH. Em pH igual a 8,0, cerca de 22% do cloro estão na forma ativa, enquanto que, em pH igual a 6,0, cerca de 96% do cloro estará na forma ativa¹³.

Os quaternários de amônio (QUAT) são surfactantes catiônicos amplamente utilizados como antissépticos e desinfetantes¹⁰. Como são compostos carregados positivamente, sabe-se que seu modo de ação se dá pela atração por materiais carregados negativamente ou estruturas como as proteínas bacterianas. São ativos em uma ampla faixa de temperatura e apresentam melhor atividade em pH alcalino, não tendo efeito corrosivo sobre superfícies¹².

O ácido peracético (PAA), por sua vez, tem sido amplamente utilizado nas indústrias de alimentos, sendo apontado como um potencial substituto do hipoclorito

de sódio. Uma das vantagens desse desinfetante é a não produção de resíduos tóxicos quando decomposto, não causando danos ambientais¹⁴. O PAA age desnaturando proteínas e enzimas, gerando aumento da permeabilidade da parede celular pela ruptura das pontes sulfúricas e sulfidrilas¹⁵. Para melhor eficácia desse composto, o pH deve variar entre 3 a 7,5¹⁶.

A ocorrência de linhagens resistentes a desinfetantes pode representar desafios econômicos para a indústria de alimentos e trazer implicações para a saúde pública, ainda mais quando se trata de micro-organismos com resistência cruzada a desinfetantes e a antibióticos. A resistência varia de microorganismo para microorganismo e tipicamente resulta de alterações celulares que implicam em acúmulo de biocidas, incluindo alterações do envelope celular que limita a absorção ou a expressão de mecanismos de efluxo. A expressão de genes de efluxo é regulada via plasmídeos que podem sofrer mutações cruzadas. É de extrema importância salientar a adaptação aos desinfetantes que seleciona micro-organismos intrinsecamente resistentes ao composto desinfetante aplicado. A adaptação pode ocorrer em superfícies com enxague deficiente deixando baixas concentrações de desinfetantes nas superfícies^{1,12}.

A resistência de patógenos a desinfetantes amplamente utilizados em empresas e indústrias de alimentos pode ser um dos fatores que contribuem com o envolvimento de micro-organismos específicos em surtos de origem alimentar. Em vista disso, esse trabalho teve como objetivo avaliar a resistência de três cepas de *Salmonella* aos desinfetantes ácido peracético, hipoclorito de sódio e quaternário de amônio. Dentre estas cepas estão SE86 envolvidas em muitas salmoneloses ocorridas no RS, e duas outras cepas não envolvidas em salmoneloses.

MATERIAIS E MÉTODOS

Culturas bacterianas

Foram utilizadas cepas de *Salmonella enterica* de três sorovares distintos. *S. Enteritidis* (SE86) foi isolada de repolho envolvido em um surto de salmonelose ocorrido no Rio Grande do Sul, em 1999, e foi caracterizada primeiramente por Geimba et al⁶. Esta cepa apresentou o mesmo perfil genotípico caracterizado por PCR-Ribotipificação, PFGE e confirmado pelo sequenciamento da região ribossomal de mais de 90% das *S. Enteritidis* isoladas de salmoneloses investigadas pela Vigilância Sanitária do RS, entre 1999 a 2006^{2,7}. As duas outras cepas estudadas nesse trabalho foram de *S. Typhimurium* e *S.*

Bredeney, isoladas em 1999, a partir de fezes de suínos e de um embutido, respectivamente. SE86 foi gentilmente cedida pela Profa. Dra. Mercedes Passos Geimba, da Faculdade de Biociências da PUC/RS, enquanto que *S. Typhimurium* e *S. Bredeney* foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Marisa Itapema Cardoso, do Departamento de Medicina Preventiva da Faculdade de Veterinária da UFRGS.

Durante os experimentos, os micro-organismos foram armazenados em Ágar Nutriente (NA) (Merck, Darmstadt, Alemanha) a 4°C. Para a realização dos inóculos, as três cepas foram cultivadas em Caldo Nutriente (NB) (Synth, São Paulo, Brasil) a 37°C, por aproximadamente 18 horas.

Desinfetantes

Foram avaliados três desinfetantes comerciais com as seguintes características:

- Produto a base de PAA composto de água, peróxido de hidrogênio, ácido acético glacial e ácido peracético (ácido peracético 14,5%);
- Produto a base de cloreto de alquil dimetil benzil amônio, bicarbonato de sódio, carbonato de sódio, EDTA e água (20% de cloreto de alquil dimetil benzil amônio);
- Produto a base de hipoclorito de sódio (4,0% de cloro ativo).

Antes dos experimentos, o valor do pH dos desinfetantes foi medido por meio de pHâmetro TM 125 (Schott) e as concentrações utilizadas estão demonstradas na Tabela 1.

Teste de susceptibilidade aos desinfetantes com as células em suspensão

Os micro-organismos foram incubados em Caldo Nutriente a 37°C, por aproximadamente 18 horas. Em seguida, as culturas foram diluídas em água peptonada 0,1% (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) até atingirem uma concentração de aproximadamente 10⁶ UFC/mL.

Os desinfetantes concentrados foram diluídos em água destilada estéril até a maior concentração indicada pelo fabricante, adicionado de 10%, conforme preconizado pela Portaria 101/93, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento¹⁷. Também foram avaliadas concentrações menores que as indicadas pelos fabricantes, como demonstrado na Tabela 1. Em seguida, 9 mL de cada desinfetante foram colocados assepticamente em tubos de ensaio estéreis, aos quais foi adicionado 1 mL de solução de albumina bovina sérica a 1% (Oxoid, Hampshire, Inglaterra), totalizando 10 mL por tubo. Inóculos de 0,1 mL de cada cultura bacteriana foram adicionados, separadamente, aos tubos contendo cada desinfetante, sendo o tempo cronometrado, a partir desse procedimento. Após 5, 10, 15 e 20 minutos de exposição, uma alíquota de 10 µL das suspensões foi retirada e transferida para tubos contendo meio de cultura BHI (Merck, Darmstadt, Alemanha). Para avaliar a resistência dos sorovares de *Salmonella* frente aos desinfetantes, esses tubos foram incubados por 96 horas, a 37°C, verificando-se a turvação dos mesmos a cada 24 horas. No caso de turvação dos tubos, os micro-organismos foram considerados resistentes, conforme preconizado pela Portaria 101/93/MAPA¹⁷.

Tabela 1. Concentração e pH dos desinfetantes ácido peracético, hipoclorito de sódio e quaternário de amônio utilizados neste estudo

Ácido peracético	pH	Hipoclorito de sódio	pH	Quaternário de amônio	pH
0,1% (150ppm)	3,5	0,05% (20ppm)	6,0	0,1% (200ppm)	5,5
0,2% (300ppm)	3,5	0,1% (40ppm)	6,0	0,2% (400ppm)	5,5
0,3% (450ppm)	3,0	0,3% (120ppm)	6,0	0,3% (600ppm)	6,0
0,5% (750ppm)	3,0	0,5% (200ppm)	6,5	1% (2000ppm)	8,0
1,0% (1500ppm)*	3,0	1% (400ppm)	6,5	2% (4000ppm)*	9,0
-	-	2% (800ppm)*	7,0	-	-

*Concentrações de uso recomendadas pelo fabricante

As concentrações são apresentadas em porcentagens e seu equivalente em ppm encontra-se entre parêntesis

RESULTADOS

Ácido Peracético

Na concentração de uso indicada pelo fabricante (1% ou 1500 ppm) e na metade dessa concentração (0,5% ou 750 ppm), todos os micro-organismos demonstraram sensibilidade nos tempos avaliados. *S. Bredeney* foi sensível a esse composto também nas concentrações de 0,3% (450 ppm) e 0,2% (300 ppm) o que não ocorreu com as cepas de *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*. Na menor concentração testada (0,1% ou 150 ppm), *S. Bredeney* apresentou crescimento apenas até 5 minutos de exposição, enquanto que as demais cepas demonstraram crescimento em todos os tempos avaliados, sendo consideradas resistentes.

Quaternário de amônio

Na concentração indicada pelo fabricante (2% ou 4000 ppm), as três cepas de *Salmonella* foram

sensíveis, bem como com a metade dessa concentração (1% ou 2000 ppm). Nas concentrações de 0,1% (200 ppm), 0,2% (400 ppm) e 0,3% (600 ppm), os três micro-organismos foram resistentes, sobrevivendo ao longo de 20 minutos de exposição.

Hipoclorito de sódio

Na concentração de 2% (800 ppm), recomendada pelo fabricante, todas as cepas de *Salmonella* foram sensíveis ao hipoclorito de sódio. Já na metade da concentração indicada pelo fabricante (1% ou 400 ppm), SE86 demonstrou resistência nos 5 e 10 primeiros minutos, o que não ocorreu com as outras cepas. Na concentração de 0,5% (200 ppm), pode-se observar que todas as cepas apresentaram resistência por algum tempo, porém SE86 permaneceu viável por até 15 minutos de contato. Os demais micro-organismos sobreviveram apenas nos primeiros 5 minutos.

Tabela 2. Suscetibilidade dos três sorovares de *Salmonella* frente aos componentes Ácido Peracético, Hipoclorito de Sódio e Quaternário de Amônio

Concentração dos Compostos	<i>S. Enteritidis</i> (SE86)	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Bredeney</i>
Ácido Peracético			
1% (1500 ppm)	S	S	S
0,5% (750 ppm)	S	S	S
0,3% (450 ppm)	R	R	S
0,2% (300 ppm)	R	R	S
0,1% (150 ppm)	R	R	R
Hipoclorito de sódio			
2% (800 ppm)	S	S	S
1% (400 ppm)	R	S	S
0,5% (200 ppm)	R	R	R
0,3% (120 ppm)	R	R	R
0,1% (40 ppm)	R	R	R
0,05% (20 ppm)	R	R	R
Quaternário de amônio			
2% (4000 ppm)	S	S	S
1% (2000 ppm)	S	S	S
0,3% (600 ppm)	R	R	R
0,2% (400 ppm)	R	R	R
0,1%(200 ppm)	R	R	R

R: resistente; S: sensível

As concentrações são apresentadas em porcentagens e seu equivalente em ppm encontra-se entre parêntesis

DISCUSSÃO

Diferentes tipos de micro-organismos apresentam respostas variadas a ação de antissépticos e desinfetantes¹⁰. Patógenos alimentares ao sobreviver aos processos de desinfecção utilizados em uma indústria de alimentos ou serviço de alimentação podem ocasionar diversos problemas de saúde pública.

O PAA tem sido amplamente utilizado como um eficiente desinfetante hospitalar e no tratamento da água¹³, sendo que, em 1993, a Portaria N°122 da ANVISA¹⁸ autorizou a utilização desse desinfetante também nas indústrias de alimentos. Esse composto, além de ser utilizado como desinfetante para superfícies que entram em contato com alimentos, também pode ser utilizado na desinfecção do próprio alimento¹⁹. Os resultados do presente trabalho demonstraram que, na concentração recomendada pelo fabricante e na metade dessa concentração, o PAA foi eficaz na inativação das três cepas de *Salmonella* avaliadas (Tabela 2). No entanto, as concentrações de 0,3%, 0,2% e 0,1% indicaram maior resistência dos micro-organismos *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*. Kich et al²⁰ obtiveram 4 log de redução de *S. Typhimurium* isoladas de suínos do RS, após 15 minutos de contato com o ácido peracético (composto ativo: 15%, diluição: 1:3000). Kunigk e Almeida¹⁴ avaliaram a ação do ácido peracético sobre as bactérias *E. coli* e *S. aureus* em suspensão. Uma solução de 60 ppm de ácido peracético foi capaz de inativar 8 log de *E. coli*, em 3,1 minutos, e 40 ppm reduziram a suspensão bacteriana de *S. aureus* em 8 log, após 4 minutos de contato.

Segundo Andrade e Macedo²¹, as concentrações de PAA utilizadas nas indústrias de alimentos variam de 300 a 700 ppm. Nas concentrações de 300 e 450 ppm, o presente estudo demonstrou que apenas *S. Bredeney* foi sensível a esse desinfetante. Contudo, na concentração de 750 ppm, todos os micro-organismos avaliados foram inativados.

A Resolução da Diretoria Colegiada RDC N° 14, de 28 de fevereiro de 2007, da ANVISA²², autoriza os QUAT para o uso nas indústrias de alimentos. Segundo Andrade e Macedo²¹ as concentrações comumente utilizadas nessas indústrias variam de 300 a 400 ppm. Entretanto, em ambientes hospitalares, a concentração de uso dos QUAT pode ser de 2000 ppm²³. No presente estudo, na concentração indicada pelo fabricante (2% ou 4000 ppm) e na metade dessa concentração, todos os sorovares foram sensíveis. Borowsky et al²⁴ avaliaram a sensibilidade e resistência de 96 cepas de *S. Typhimurium* isoladas de

suínos no RS, frente ao quaternário de amônio. O teste foi realizado em suspensão e as concentrações utilizadas foram de 0,3 e 0,6 mg/L (15 g/100 mL de composto ativo). No trabalho destes autores foi demonstrado que os isolados de *S. Typhimurium* apresentaram resistência nas duas concentrações, em cinco minutos de exposição. Em 15 minutos de contato, nenhuma amostra foi resistente. É importante salientar que tais resultados foram obtidos sem a adição de matéria orgânica aos tubos avaliados. Por outro lado, Kich et al²⁰ avaliaram a atividade do QUAT frente a amostras de *S. Typhimurium* isoladas de suínos, na presença e ausência de matéria orgânica. Os autores concluíram que na presença de matéria orgânica o QUAT teve prejuízo de sua atividade, uma vez que, na ausência de matéria orgânica esse composto demonstrou ser capaz de inativar *Salmonella*.

O *Food and Drug Administration*¹⁶ recomenda o uso do hipoclorito de sódio como agente desinfetante para superfícies que entram em contato com alimentos em concentrações acima de 200 ppm. Concentrações entre 100 e 200 ppm têm sido recomendadas para desinfecção de utensílios e equipamentos no Brasil²¹ e outros países. No presente estudo, os resultados indicaram que o hipoclorito de sódio foi capaz de inativar as três cepas de *Salmonella* quando concentrações bem maiores foram utilizadas. Entretanto, na concentração de 400 ppm, SE86 foi a única cepa a apresentar resistência. Na concentração de 200 ppm, todos os micro-organismos demonstraram resistência por 5 minutos, sendo que SE86 sobreviveu por até 15 minutos de exposição. A ampla utilização do hipoclorito de sódio pode ser atribuída, dentre várias razões, devido ao seu baixo custo e amplo espectro de ação. Segundo a Portaria 78/2009, que entrou em vigor recentemente no Estado do Rio Grande do Sul²⁵, para desinfecção de alimentos hortifrutigranjeiros, deve-se utilizar solução clorada entre 100 e 250 ppm, por 15 minutos. Concentrações de aproximadamente 200 ppm, por 15 minutos, têm sido recomendadas e utilizadas na desinfecção de panos de limpeza²⁵, equipamentos e utensílios, desde que enxaguadas com água potável, após aplicação do desinfetante. Sendo assim, patógenos alimentares, como SE86, resistentes a tais processos de desinfecção assumem grande importância. Além da maior resistência ao hipoclorito de sódio demonstrado pela SE86 neste trabalho, demais estudos têm ressaltado características importantes dessa cepa. Por exemplo, Malheiros et al¹⁵ demonstraram que SE86 apresentou maior resistência térmica e maior capacidade de adaptação ácida

após exposição a pH subletais. Malheiros et al²⁶ estudaram o crescimento dessa mesma cepa em salada de batata com maionese caseira, alimento considerado como o principal veículo de salmoneloses no RS, e comprovaram crescimento mais rápido nas seis primeiras horas de cultivo do que cepas de *S. Bredeney* e *S. Typhimurium*. Tais características podem estar contribuindo com a permanência de *S. Enteritidis* como patógeno causador de diversos surtos alimentares no RS.

CONCLUSÃO

Os desinfetantes PAA, QUAT e hipoclorito de sódio, nas concentrações indicadas pelos fabricantes, foram capazes de inativar as três cepas de *Salmonella*, embora concentrações menores tenham possibilitado a sobrevivência dos micro-organismos testados. *S. Enteritidis* (SE86) apresentou maior resistência ao hipoclorito de sódio que as demais cepas avaliadas. Uma vez que esse desinfetante tem sido amplamente utilizado no RS, essa resistência pode estar associada ao frequente envolvimento de *S. Enteritidis* em surtos de salmoneloses ocorridos neste Estado.

REFERÊNCIAS

1. Lopalco PL, Germinario C, Di Martino V, Frisoli L, Pagano A, Quarto M et al. Epidemiologic study and cost analysis of an *Salmonella* Enteritidis epidemic. *Ann Ig*. 2000; 12(4): 279-85.
2. Namata H, Méroc E, Aerts M, Faes C, Abrahantes JC, Imberechts H et al. *Salmonella* in Belgian laying hens: An identification of risk factors. *Prev Vet Med*. 2008; 83(3-4): 323-36.
3. Alcocer I, Oliveira KMP, Vidotto MC, Oliveira TCRM. Discrimination of *Salmonella* serovars isolated from chicken meat by REP and ERIC-PCR and phagotyping of Enteritidis sorovar. *Cienc Tecnol Aliment*. 2006; 26 (2): 1-16.
4. Peresi JTM, Almeida IAZC, Lima SL, Marques DF, Rodrigues ECA, Fernandes SA et al. Surtos de enfermidades transmitidas por alimentos causados por *Salmonella* Enteritidis. *Rev Saúde Pública*. 1998; 32(5): 1-13.
5. Tavechio AT, Ghilardi AC, Peresi JT, Fuzihara TO, Yonamine EK, Jakabi M et al. *Salmonella* serotypes isolated from nonhuman source in São Paulo, Brazil, from 1996 through 2000. *J Food Protec*. 2002; 65(6): 1041-4.
6. Geimba MP, Tondo EC, de Oliveira FA, Canal CW, Brandelli A. Serological characterization and prevalence of *spvR* genes in *Salmonella* isolated from foods involved in outbreaks in Brazil. *J Food Protec*. 2004; 67 (6): 1229-33.
7. Oliveira FA, Frazzon APG, Brandelli A, Tondo EC. Use of PCR-ribotyping, RAPD, and antimicrobial resistance for typing of *Salmonella* Enteritidis involved in food-borne outbreaks in Southern Brazil. *J Infect Developing Countries*. 2007; 1 (2):170-6.
8. Oliveira FA, Geimba MP, Pasqualotto AP, Brandelli A, Pasquali G, Silva WP et al. Clonal relationship among *Salmonella enterica* serovar Enteritidis involved in foodborne outbreaks in southern Brazil. *Food Control*. 2009; 20(6): 606-10.
9. Paula CMD. Avaliação da sorologia e susceptibilidade a antimicrobianos de linhagens de *Salmonella* sp envolvidas em surtos alimentares ocorridos no Rio Grande do Sul entre 2003 e 2006 [monografia]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2006.
10. McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. *Clinic Microbiol Rev*. 1999; 12(1):147-79.
11. Rossoni EMM, Gaylarde CC. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitizing agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. *Int J Food Microbiol*. 2000; 61(1): 81-5.
12. Schmidt RH. Basic elements of equipment cleaning and sanitizing in food processing and handling operations. Institute of food and agricultural science. University of Florida, 2003. [acesso em 04 dez 2006.]. Disponível em: [http://edis.ifas.ufl.edu.].
13. Souza JB, Daniel LA. Comparação entre hipoclorito de sódio e ácido peracético na inativação de *E. coli*, colifagos e *C. perfringens* em água com elevada concentração de matéria orgânica. *Eng Sanit Ambient*. 2005; 10(2): 111-7.
14. Kunigh L, Almeida MCB. Action of peracetic acid on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in suspension or settled on stainless steel surfaces. *Braz J Microbiol*. 2001; 32 (1): 38-41.
15. Malheiros PS, Brandelli A, Noreña CPZ, Tondo EC. Acid and thermal resistance of a *Salmonella* Enteritidis strain involved in several foodborne outbreaks. *J Food Safety*. 2009; 29 (2): 302-17.
16. Food and Drug Administration. Sanitization of equipment and utensils. [acesso 04 dez 2006]. Disponível em: [http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fc01-4.html.].
17. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 101, de 17 de agosto de 1993. Métodos de Análise Microbiológica para Alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 17 ago. 1993, Seção I, p. 11937-45.
18. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 122, de 29 de novembro de 1993. Inclui na Portaria nº 15, de 23/08/88, sub anexo 1, alínea I, o princípio ativo ácido peracético, para uso das formulações de desinfetantes/esterilizantes. [acesso 04 abr 2008]. Disponível em: http://legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=5334&word=].
19. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação de Boas Práticas para Serviços de Alimentação: Resolução - RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004. [acesso jul 06]. Disponível em: [http://e-legis.bvs.br/leisref/public].
20. Kich JD, Borowsky LM, Silva VSS, Ramenzoni M, Triques N, Kooler FL et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de seis desinfetantes comerciais frente a amostras de *Salmonella* Typhimurium isoladas de suínos. *Acta Sci Vet*. 2004; 32 (1): 33-9.

21. Andrade NJ, Macedo JAB. Agentes químicos para higienização. In: Higienização na indústria de alimentos. São Paulo: Varela; 53-137, 1996.
22. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 14, de 28 de fevereiro de 2007. Aprova o Regulamento Técnico para Produtos Saneantes com Ação Antimicrobiana harmonizado no âmbito do Mercosul através da Resolução GMC nº 50/06. Diário Oficial [da] União; Brasília, DF, 05 mar. 2007.
23. Penna TCV, Mazzola PG, Martins AMS. The efficacy of chemical agents in cleaning and disinfection. *Infect Dis*. 2001; 1 (16): 1471-9.
24. Borowsky LM, Bessa MC, Cardoso MI, Avancini CAM. Sensitivity and resistance of samples of *Salmonella* Typhimurium isolated in slaughter swines in the state Rio Grande do Sul/Brazil, front to disinfectants quaternary ammonium and iodophor. *Ciênc Rur*. 2006; 36 (5): 1479.
25. Brasil. Secretaria Estadual de Saúde. Portaria nº 78, de 30 janeiro de 2009. Lista de Verificação em Boas Práticas para Serviços de Alimentação, Normas para Cursos de Capacitação em Boas Práticas para Serviços de Alimentação e outras Providências. Diário Oficial [do] Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, 30 jan. 2009. p. 35-40.
26. Malheiros PS, Paula CMD, Tondo EC. Cinética de crescimento de *Salmonella* Enteritidis envolvida em surtos alimentares no RS: uma comparação com linhagens de outros sorovares. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2007; 27(4): 751-5.

Resistência a oxacilina em *Staphylococcus* spp isolado de leite mastítico

Oxacillin-resistance *Staphylococcus* spp isolated from mastitic milk

RIALA6/1318

Cristiane Matoso DINIZ¹, Roberta Torres de MELO^{1,2*}, Eliane Pereira MENDONÇA^{1,2}, Leticia Ríspoli COELHO^{1,2}, Belchiolina Beatriz FONSECA³, Daise Aparecida ROSSI^{1,2}

*Endereço para correspondência: ¹Laboratório de Biotecnologia Animal e Aplicada, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia. Rua Ceará s/n, Umuarama, Uberlândia, MG, Brasil. Tel: 34 3213-2319. Fax: 34 3218-2380. E-mail: roberta-melo@hotmail.com

²Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil

Recebido: 26.08.2010 – Aceito para publicação: 29.12.2010.

RESUMO

A mastite ocupa lugar de destaque entre as doenças que acometem o rebanho leiteiro, em virtude de problemas econômicos e de saúde pública. *Staphylococcus* spp são os agentes infecciosos mais envolvidos na etiologia da doença. *Staphylococcus* spp resistentes à oxacilina, isolados de amostras de leite provenientes de animais com histórico de mastite recorrente, foram analisadas utilizando-se os testes de difusão em gel, ágar de triagem, concentração mínima inibitória (CMI) e pesquisa do gene *mecA*. De 134 amostras de leite analisadas, *Staphylococcus* spp foi isolado em 55,22% das amostras (74/134). O teste de difusão em disco demonstrou que a maioria dos isolados apresentaram multiresistência, sendo 51,35% (38/74) resistentes à oxacilina. Esse perfil foi confirmado em paralelo pela CMI e pelo ágar de triagem. A análise molecular demonstrou que 33,78% dos isolados (25/74) possuíam o gene *mecA*, sendo mais frequentemente isolado em *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coagulase* negativa, com índices de 48% (12/25) e 32% (8/25), respectivamente, seguido de *S. intermedius* com 16% (4/25) e de *S. hyicus* com 4% (1/25). O presente estudo denota o grave problema associado à *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina, bem como no meio rural, o que justifica a dificuldade de tratamento e a recorrência da infecção.

Palavras-chave. oxacilina, mastite bovina, *mecA*, *Staphylococcus* spp.

ABSTRACT

Mastitis is of a major concern among the diseases that affect the dairy herd due to the economic problems and public health concerns. *Staphylococcus* spp has been the infectious bacterium and the etiologic agent of this disease. The oxacillin resistance of *Staphylococcus* spp isolated from milk samples of animals with a history of recurrent mastitis was investigated. This study was performed by means of gel diffusion test, agar screening, minimum inhibitory concentration (MIC), and the *mecA* gene searching. Of 134 milk samples, *Staphylococcus* spp was isolated from 55.22% samples (74/134). By means of disk diffusion test, the majority of the isolates showed multiresistance, and 51.35% (38/74) were resistant to oxacillin. This profile was confirmed in parallel by CMI and the agar screening. By molecular analysis 33.78% of isolates (25/74) revealed the *mecA* gene, being frequently isolated from *Staphylococcus aureus* and coagulase negative *Staphylococcus* at rates of 48% (12/25) and 32% (8/25), respectively, and followed by *S. intermedius* in 16% (4 / 25) and *S. hyicus* in 4% (1/25). The serious problem associated with oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* was found this study, including in rural environment and these findings justify the treatment difficulty and the recurrence of infection.

Key words. oxacillin, bovine mastitis, *mecA*, *Staphylococcus* spp.

INTRODUÇÃO

Dentre as doenças do rebanho leiteiro que comprometem a qualidade do leite, a mastite ocupa lugar de destaque por possuir importância econômica em saúde pública. Apesar de ser a doença mais importante em termos econômicos para a indústria leiteira, é difícil de ser controlada¹.

A etiologia da mastite pode ser de origem tóxica, traumática, alérgica, metabólica ou infecciosa, destacando-se como agentes infecciosos as bactérias do gênero *Staphylococcus*².

Staphylococcus aureus possui vários fatores de virulência que contribuem para a sua persistência no tecido mamário, como produção de toxinas extracelulares e enzimas³⁻⁴. Eles se aderem às células endoteliais por meio de receptores de adesinas e são fagocitados por essas. O ambiente intracelular os protege dos mecanismos de defesa do hospedeiro, assim como dos efeitos dos antibióticos. Estes fatores podem aumentar a sobrevivência bacteriana contribuindo para o desenvolvimento de infecção persistente ou recorrente⁵.

Staphylococcus aureus isolados de leite mastítico bovino também apresentam características de virulência e resistência a diversos antibióticos utilizados rotineiramente no tratamento da doença⁶. De acordo com Fagundes e Oliveira⁷, *S. aureus* é a bactéria causadora de mastite de tratamento mais difícil devido à elevada resistência aos antibióticos. A resistência à oxacilina é um sério problema de saúde pública na área urbana e que também pode estar sendo disseminado no meio rural. Está relacionada a vários fatores como a presença do gene *mecA*, que torna os micro-organismos intrinsecamente resistentes também a outros antimicrobianos⁸.

A resistência à oxacilina é mediada pela produção de uma proteína ligadora de penicilina (PBP) que diminui a afinidade e, assim a susceptibilidade à ação de compostos antimicrobianos betalactâmicos. A resistência aos betalactâmicos resistentes às betalactamases é mediada pelo gene *mecA*, que codifica a produção de uma PBP anômala - PBP2a ou PBP2⁹. O teste laboratorial para detectar resistência para esta droga pode ser realizado com disco de 1 µg de oxacilina¹⁰.

A importância de *S. aureus* metilina ou oxacilina resistente aumentou a partir da década de 80, sendo considerado, atualmente, o maior problema clínico e epidemiológico em infecções hospitalares¹¹. Segundo Chambers¹², a metilina foi preterida para uso em testes

laboratoriais de resistência porque a oxacilina é mais estável ao armazenamento e melhor para identificar as cepas heterorresistentes, embora mantenha-se o termo MRSA (*Staphylococcus aureus* metilino-resistentes) por razões históricas.

Considerando a importância do leite na economia, na alimentação humana e na possibilidade de veiculação de bactérias multiresistentes, objetivou-se com este trabalho a avaliação da resistência à oxacilina de *Staphylococcus* spp isolados de amostras de leite provenientes de animais de oito propriedades rurais com histórico de mastite recorrente, utilizando os testes da difusão em gel, ágar de triagem, concentração mínima inibitória (CMI) e a presença do gene *mecA*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram consideradas, para o estudo, propriedades do município de Uberlândia – MG, Brasil, onde havia relatos de mastite recorrente. Os animais analisados apresentaram recidiva em duas ou mais lactações consecutivas, mesmo quando submetidos à antibioticoterapia. Nos rebanhos estudados, o sistema de criação era semi-intensivo, com os animais ordenhados mecanicamente duas vezes ao dia.

Nas oito propriedades rurais foram selecionadas para estudo 140 vacas leiteiras que se enquadravam dentro do critério adotado, ou seja, histórico de mastite em duas ou mais lactações. Na fazenda, imediatamente antes da ordenha, os animais foram submetidos ao teste da caneca telada e ao Califórnia Mastitis Test (CMT) e o leite dos animais positivos foi classificado como proveniente de mastite clínica e subclínica, respectivamente¹³.

Os animais positivos ao teste foram segregados, tiveram as tetas submetidas à lavagem com água e sabão e secagem com papel toalha estéril e, então, foi coletada amostra de leite para o cultivo microbiológico por ordenha manual em tubo de ensaio estéril.

Para isolamento e identificação dos *Staphylococcus* spp, o leite foi semeado com auxílio de *swab* na superfície de placas de Petri contendo o ágar seletivo e o diferencial, o manitol salgado (DIFCO®) e as placas incubadas a 37°C por 24 a 48 horas¹⁴. Colônias puras foram cultivadas em ágar AN (Ágar Nutriente - DIFCO®) e caldo BHI (Brain Heart Infusion - DIFCO®) por 24 horas, a 37°C e identificados como *Staphylococcus* spp, por meio da coloração diferencial de Gram¹⁵ e produção de catalase¹⁶.

Os espécimes identificados como *Staphylococcus* foram diferenciados em *Staphylococcus* coagulase positiva

ou negativa por meio do teste da coagulase em tubo¹⁷⁻¹⁸. Para diferenciar as espécies coagulase positiva *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hyicus* e *Staphylococcus intermedius* foram utilizados os testes: produção de acetoina, utilização anaeróbica do manitol e produção de β -galactosidase¹⁹⁻²⁰.

Todas as amostras identificadas como *Staphylococcus* spp foram submetidas à avaliação frente a antimicrobianos, utilizando o teste de difusão em ágar, conforme o protocolo recomendado pelo NCCLS¹⁰. Foram testados os seguintes antimicrobianos para os espécimes identificados como *Staphylococcus* spp: oxacilina 5 μ g, ampicilina 10 μ g, cefalotina 30 μ g, clindamicina 2 μ g, cloranfenicol 30 μ g, eritromicina 15 μ g, ciprofloxacina 5 μ g, penicilina G 10U.I., rifampicina 5 μ g, sulfa-trimetropim 25 μ g e tetraciclina 30 μ g. Foi utilizada como controle a cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Em paralelo, todos os espécimes de *Staphylococcus* spp previamente isolados e identificados foram também submetidos ao cultivo em meio de triagem (*screem*) para detecção de amostras resistentes à oxacilina. Os procedimentos foram realizados de acordo com protocolo da NCCLS²¹.

Staphylococcus spp que formaram colônias no ágar de triagem foram submetidos em paralelo às provas de Concentração Inibitória Mínima (CIM) em ágar e e-test (AB Biodisk) para a oxacilina.

A determinação da CIM de oxacilina foi realizada de acordo com técnica do NCCLS²¹, que recomenda o uso do ágar Muller Hinton (MH) (DIFCO®) e inóculos padronizados frente a diferentes concentrações do antibiótico. Em paralelo, a CIM foi realizada também com o uso do e-test (AB Biodisk), de acordo com recomendações do NCCLS²¹. As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas para *Staphylococcus* coagulase positiva e por 48 horas para os espécimes de *Staphylococcus* coagulase negativa.

Os espécimes que apresentaram resistência à oxacilina em algum dos testes utilizados foram selecionadas para o teste de detecção do gene *mecA*, pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR).

A extração do DNA genômico foi feito por lise térmica. Um mililitro de uma cultura pura cultivada em caldo BHI (DIFCO®) por 18 a 24 horas foi centrifugada a 5000 rpm por 4 minutos e o sobrenadante desprezado. O material foi lavado três vezes com tampão TE (Tris EDTA, pH 8,0) e, posteriormente, ressuspenso em 100 μ L de tampão TE e aquecido a 95°C por 10 minutos. Em seguida, foi centrifugado por 20 segundos a 5000 rpm e o sobrenadante preservado para o teste.

A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro (BECKMAN, modelo DU-640B) nos comprimentos de onda de 260 e 280nm (nanômetros), sendo a relação 260/280 calculada.

Os *primers* utilizados para a análise foram os descritos na Tabela 1. O volume final para a reação de amplificação foi de 20 μ L, composto por 30ng do DNA, 2 μ L de tampão 10X (KCl 50mM, Tris-HCL (200 mM, pH 8,4), 0,6 μ L de cloreto de magnésio (4,0 mM), 0,4 μ L de dNTPs (10 mM), 1 μ L de *primer* (25 ng), 0,4 μ L de Taq DNA polimerase (10U/ μ L) e água estéril (Milli-Q) para totalizar o volume da reação. Como controle foram utilizados os mesmos reagentes, exceto o DNA alvo, que foi substituído por água ultrapura.

Tabela 1: *Primers* utilizados na identificação genotípica da resistência a oxacilina em *Staphylococcus*²²

Gene	Primers	Sequência 5' à 3'	Peso molecular (pb)
<i>mecA</i>	<i>mecA1282</i>	AAAATCGATGGTAAAGGGTTGGC	533
	<i>mecA1793</i>	AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC	

A reação de amplificação em termociclador (MJ Research®) obedeceu às seguintes condições: 94°C (2 minutos), 94°C (1 minuto), 40°C (2 minutos), 72°C (2 minutos), seguidos de 39 ciclos, a partir do aquecimento a 94°C, finalizando com aquecimento a 72°C (5 minutos) e manutenção a 5°C, até o momento de serem submetidas à eletroforese.

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%²³, utilizando como marcador de peso molecular o 1kb *ladder* (GIBCO). Os fragmentos de DNA foram visualizados pela incidência de luz UV (ultravioleta) e analisados em fotodocumentador.

As análises dos dados foram realizadas através de estatística descritiva.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 140 animais selecionados para estudo (histórico de mastite recorrente), somente 4,28% (6/140) foram negativos no teste da caneca telada e no CMT, comprovando a endemicidade e recorrência da doença na população estudada, sendo consideradas, então, 134 amostras.

Nestas amostras, após cultivo em ágar manitol salgado (DIFCO®), houve positividade de 59,70% (80/134). Nas demais, 40,29% (54/134), não houve isolamento, estando

de acordo com Freitas et al⁶, que não conseguiram identificar o agente etiológico em 36,70% das amostras positivas pelo CMT ou caneca de fundo escuro. A causa da não identificação do agente etiológico nestes casos é provavelmente devido à presença de um processo inflamatório de etiologia não bacteriana ou bactérias de outros gêneros²⁴.

O uso do ágar de triagem contendo 4% de NaCl e 6µg de oxacilina tem sido utilizado como um dos métodos de confirmação para a resistência à oxacilina em provas de difusão²¹. Neste estudo, 38 espécimes demonstraram resistência na prova de difusão, já no ágar de triagem houve resistência para 28 isolados. O teste de triagem denotou eficiência de 73,68% na confirmação dos resultados encontrados na prova de difusão.

Entre os isolados resistentes a oxacilina, a multirresistência foi o padrão comumente observado,

com a maioria das amostras resistentes a sete, dos onze antibióticos testados. As amostras de *Staphylococcus* spp sensíveis à oxacilina mostraram resistência à penicilina (83,33%), ampicilina (80,55%) e rifampicina (22,22%).

O ágar de triagem demonstrou que é uma ferramenta útil na identificação de *Staphylococcus* resistentes à oxacilina e concorda com os resultados obtidos por Sadoyama²⁵ e Ribas²⁶. Porém, este método não deve ser a única forma de diagnóstico para estes espécimes, já que, quando comparado à CIM em duas ocasiões, este teste não foi capaz de demonstrar o crescimento dos micro-organismos resistentes. Os testes CIM e e-test (AB Biodisk) demonstraram 100% de concordância em todas as espécies de *Staphylococcus* analisadas (Tabela 2).

Tabela 2. Resistência a oxacilina observada nos testes de difusão em discos, ágar de triagem e CIM de 38 espécimes de *Staphylococcus* isolados de mastites recorrentes em oito propriedades rurais

Espécimes isolados	Difusão em disco	Ágar de triagem	CIM ¹ e e-test (≥4µg/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i>	14	12	13
<i>Staphylococcus intermedius</i>	7	6	6
<i>Staphylococcus hyicus</i>	1	0	1
SCN	16	10	10
Total	38	28	30

¹Método da incorporação do antibiótico em ágar

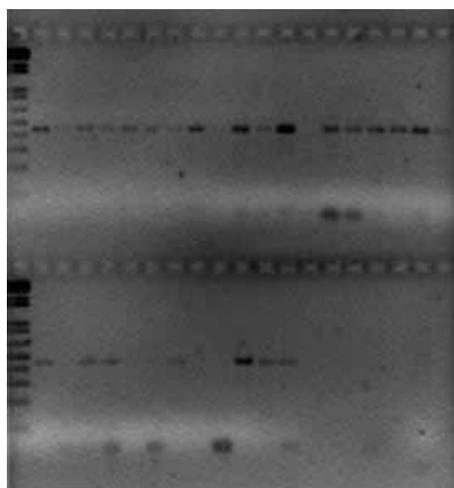


Figura 1. Amplificação do fragmento de 533pb correspondente ao gene *mecA* em 25 espécimes de estafilococos com resistência a oxacilina isolados de mastites recorrentes de oito propriedades rurais da região de Uberlândia-MG, Brasil

A análise molecular demonstrou que dos 30 espécimes de *Staphylococcus* spp previamente identificados como resistentes à oxacilina pelo teste de difusão com disco e confirmada pela CIM, 25 demonstraram possuir o gene *mecA* (Figura 1). Estas amostras representam 33,78% (25/74) de todos os estafilococos isolados. Este resultado é superior ao observado por Lee⁴, que encontrou 3,56% (15/421) cepas MRSA, em estudos realizados com amostras de outras espécies de animais. A Tabela 3 demonstra a presença do gene *mecA*, entre as diferentes espécies de estafilococos e o tipo de mastite.

O gene *mecA* foi mais frequentemente isolado em *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coagulase* negativos (SCN), com índices de 48% e 32%, respectivamente. Esses dados reforçam sua importância epidemiológica e significância na mastite, pois estas estirpes tendem a dificultar o tratamento, mesmo quando são agentes etiológicos secundários, aumentando a tendência

à cronificação da enfermidade e possibilidades de disseminação entre os animais.

A CIM determinada nos testes de incorporação do antimicrobiano em ágar e no e-test (AB Biodisk) mostraram concordância na identificação de espécimes de estafilococos resistentes a oxacilina (Tabela 4). Porém, em cinco destas amostras com CMI > 256µg/mL, o gene *mecA* não foi detectado, provavelmente este fato ocorreu devido a perda do gene. van Griethuysen et al²⁷ realizaram um estudo onde ficou demonstrado a perda do gene *mecA* em amostras mantidas em armazenamento sob congelamento. Neste estudo, os isolados foram mantidos nesta condição até o momento da análise molecular. Este resultado indica que, apesar da alta especificidade, e desta técnica ser considerada definitiva para comprovação da presença do gene, a sensibilidade da mesma pode variar com a forma e tempo de conservação das amostras.

Tabela 3. Distribuição do gene *mecA* em 25 isolados de estafilococos de mastite bovina clínica e subclínica de oito propriedades rurais de Uberlândia-MG com resistência a oxacilina (CMI≥4µg) nos testes de incorporação em ágar e e-test (AB Biodisk)

Espécie Isolada	Mastite clínica		Mastite subclínica	
	Único agente n (%)	Associado n (%)	Único agente N (%)	Associado n (%)
<i>S. aureus</i>	7 (28%)	1 (4%)	3 (12%)	1 (4%)
<i>S. intermedius</i>	0 (0%)	0 (0%)	3 (12%)	1 (4%)
<i>S. hyicus</i>	1 (4%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
SCNs	2 (8%)	3 (12%)	3 (12%)	0 (0%)
Total	10 (40%)	4 (16%)	9 (36%)	2 (8%)

Tabela 4. Comparação entre diferentes testes na detecção de resistência à oxacilina de *Staphylococcus* isolados de mastite em oito propriedades rurais de Uberlândia-MG

Técnicas	Resistente N=30	Suscetível N=44	Sensibilidade	Especificidade
e-Test	30	44	100	100
CIM (incorporação em ágar)	30	44	100	100
Ágar de Triagem	28	44	93,33	100
Difusão com disco	30	36	100	81,8
gene <i>mecA</i>	25	44	83,33	100

CMI = concentração mínima inibitória ≥4µg

O teste de difusão em discos é considerado muito sensível, mas não específico para determinar a resistência à oxacilina em bactérias do gênero *Staphylococcus*. Apesar de este teste ter sido capaz de detectar os *Staphylococcus* resistentes à oxacilina, em oito ocasiões a resistência não foi confirmada pela CIM. Estes números reforçam a necessidade de testes complementares como a CIM e a presença do gene *mecA* para a confirmação da resistência à oxacilina²⁸⁻²⁹⁻³⁰.

CONCLUSÃO

Os resultados comprovaram a alta incidência de *Staphylococcus* spp como agentes etiológicos de mastites recorrentes nos rebanhos estudados e a importância deste micro-organismo nesta enfermidade.

O teste de difusão com disco (antibiograma) realizado para os espécimes do gênero *Staphylococcus* demonstrou um alto nível de resistência aos antimicrobianos testados e, entre estes, a multiresistência foi o padrão comumente observado.

A resistência à oxacilina pela detecção do gene *mecA* foi confirmada em 33,78% (25/74) dos isolados.

A técnica de difusão em discos é adequada para triagem de estafilococos resistentes à oxacilina. Para confirmação destas características devem ser utilizados testes de maior especificidade como a CMI e a detecção do gene *mecA*.

Os resultados evidenciaram presença e possibilidade de veiculação de espécimes multiresistentes por meio do leite mastítico, reforçando a importância epidemiológica da mastite na produção e saúde pública.

REFERÊNCIAS

1. Pyorala, S. New strategies to prevent mastitis. *Rep Domest Anim*. 2002; 37(4):211-6.
2. Cunha AP, Silva LBG da, Pinheiro Júnior JW, Silva DR da, Oliveira AA da, Silva KPC da 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.
3. Santos FGB, Mota RA, Silveira-Filho VM, Souza HM, Oliveira MBM, Johner JM et al. Tipagem molecular de *Staphylococcus aureus* isolados do leite de vacas com mastite subclínica e equipamentos de ordenha procedentes do estado de Pernambuco. *Rev Napgama*. 2003; 6(1):19-23.
4. Lee JH. Methicillin (oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. *Appl Microbiol*. 2003; 69(11):6489-94.
5. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *New Engl J Med*. 1998; 339(8):520-32.
6. Freitas MFL, Pinheiro Júnior JW, Stamford TLM, Rabelo SS de A, Silva DR da, Silveira Filho VM da et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de Pernambuco. *Arq Inst Biol*. 2005; 72(2):171-7.
7. Fagundes H, Oliveira CAF. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. *Cien Rural*. 2004; 34(4):1315-20.
8. Carvalho CE, Berezin EM. Monitoramento microbiológico seqüencial de secreção traqueal de pacientes intubados em UTI pediátrica. *J Pediatr*. 2004; 81(1):23-9.
9. Maranan MC, Moreira B, Boyle-Vavra S, Daum RS. Antimicrobial resistance in *Staphylococci*: epidemiology, molecular mechanisms and Clinical relevance. *Infect Dis Clin North Am*. 1997; 11(4): 813-49.
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard M7-A6, Villanova, PA, 2003.
11. Peresi JTM, Almeida IAZC de, Cardiga EA, Marques DF, Carnicel FA, Hoffmann FL. Susceptibilidade antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp isoladas de alimentos envolvidos em surtos de doenças bacterianas transmitidas por alimentos, ocorridos na região noroeste do Estado de São Paulo, no período de abril de 1990 a dezembro de 2003. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2006; 65(2):112-7.
12. Chambers HF. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerg Infect Dis*. 2001; 7(2): 178-82.
13. Ribeiro MER, Petrini LA, Aita MF, Balbinotti M, Stumpf JRW, Gomes JF et al. Relação entre mastites clínica, subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na região sul do Rio Grande do Sul. *R Bras Agrociência*. 2003; 9(3):287-90.
14. Koneman EM, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Junior NC. Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. 5ª ed. Rio de Janeiro (BR): Médsi; 2001.
15. Tortora GJ, Funke BR, Christine L. Microbiologia. 6ª ed. Porto Alegre (BR): Artmed; 2002.
16. Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA, Taniwaki MH, Santos RFS, Gomes RAR. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. 3ª ed. São Paulo(BR): Varela; 2007.
17. Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. 2ª ed. São Paulo (BR): Varela; 2001.
18. Hirsh DC, Zee YC. Microbiologia veterinária. Rio de Janeiro (BR): Guanabara Koogan; 2003.
19. Kloos WE, Bannerman TL. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA et al. Manual of clinical microbiology. 6ª ed. Washington: American Society for Microbiology; 1995. p. 282-98.
20. Brito MAVP, Campos GMM de, Brito JRF. Esquema simplificado para identificação de estafilococos coagulase-positivos isolados de mastite bovina. *Cien Rural*. 2002; 32(1):79-82.
21. National Committee for Clinical Laboratory Performance Standards (NCCLS). Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Approved Standard M7-A4, Villanova, PA, 2000.

22. Merlino J, Watson J, Rose B, Beard-pegler M, Gottlieb T, Bradbury R et al. Detection and expression of methicillin/oxacillin resistance in multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* in Central Sydney, Australia. *J Antimicrob Chemother*. 2002;49(5):793-801.
23. Sambrook J, Russel DW. Molecular cloning: a laboratory manual. 3ª ed. New York (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
24. Costa EO, Melville PA, Ribeiro AR, Viani FC, Mascolli R, Oliveira PJ. Mastite bovina: CMT *versus* microbiológico. *Hora Vet*. 1996; 15(89):53-4.
25. Sadoyama, G. Aspectos epidemiológicos de infecções relacionadas a cateteres vasculares centrais em pacientes cirúrgicos internados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia [dissertação de mestrado]. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia; 2003.
26. Ribas, RM. Infecções Hospitalares em pacientes idosos: Aspectos epidemiológicos clássicos e moleculares associados a *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus* spp [dissertação de mestrado]. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia; 2003.
27. van Griethuysen A, van Loo I, van Belkum A, Vandenbroucke-Grauls C, Wannet W, van Keulen P. Loss of the *mecA* gene during storage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol*. 2005;43(3):1361-65.
28. Hussain Z, Stoakes L, Massey V, Diagre D, Fitzgerald V, Sayed S el et al. Correlation of oxacillin MIC with *mecA* gene carriage in coagulase-negative Staphylococci. *J Clin Microbiol*. 2000; 38(2):752-4.
29. Brito MAVP, Brito JRF, Silva MAS, Carmo RA. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2001; 53(5):531-7.
30. Lee JH, Jeong Jae-Myung, Park Youn-Ho, Choi Sung-Sun, Kim Yong-Hwan, Chae Joon-Seok et al. Evaluation of the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)- Screen Latex Agglutination Test for Detection of MRSA of Animal Origin. *J Clin Microbiol*. 2004;42(6):2780-2.

Condições higiênico-sanitárias, qualidade microbiológica e teste de susceptibilidade antimicrobiana de cepas isoladas de sanduíches comercializados por ambulantes

Hygienic-sanitary condition, microbiological quality and antimicrobial susceptibility of isolated strains from sandwiches sold in street markets

RIALA6/1319

Luciana FURLANETO-MAIA^{1*}, Marcelo Tempesta de OLIVEIRA², Ana Flávia de OLIVEIRA¹

*Endereço para correspondência: Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Estrada dos Pioneiros, 3131, Londrina/PR, Brasil. CEP 86036-370. Tel: (43) 3315-6100. E-mail: lucianamaia@utfpr.edu.br

¹Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curso de Tecnologia em Alimentos

²Universidade Estadual de Londrina. Pós graduação em Microbiologia

Recebido: 29.03.2010 – Aceito para publicação: 29.12.2010

RESUMO

As condições higiênico-sanitárias e a qualidade microbiológica de locais de venda ambulantes que comercializam sanduíches em Londrina-PR foram investigadas neste estudo; as bactérias isoladas foram testadas por meio de ensaios de sensibilidade a antimicrobianos. As condições higiênico-sanitárias foram analisadas em 47 pontos de venda de sanduíches tipo cachorro-quente e “cheese”, na cidade de Londrina, PR. Foram coletados aleatoriamente 20 sanduíches para análises microbiológicas, em que foi determinada a presença de bactérias mesófilas aeróbias estritas e facultativas, *Staphylococcus aureus*, coliformes a 35°C e coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. Os micro-organismos isolados foram avaliados quanto à sensibilidade a antibióticos. As condições higiênico-sanitárias foram inadequadas em 79,2% dos itens avaliados. Todos os sanduíches estavam contaminados por bactérias mesófilas, coliformes a 35°C e termotolerantes, e 45% por *E. coli*. *S. aureus* foi isolado de 55% das amostras, e em 25% os valores estavam acima do permitido pela legislação. *Salmonella* spp não foi detectada. A maioria dos isolados de *E. coli* e *S. aureus* foi resistente a pelo menos um tipo de antimicrobianos testados. A presença desses micro-organismos pode estar associada com as condições higiênico-sanitárias inadequadas.

Palavras-chave. higiene dos alimentos, análise microbiológica, vigilância sanitária, saúde pública.

ABSTRACT

The hygienic-sanitary and microbiological qualities of sandwiches sold by street-vendors in Londrina-PR were assessed, and the antimicrobial susceptibility testing was carried out on isolated bacteria. Sanitary conditions were evaluated in 47 street-vending places, and 20 samples were randomly collected for analyzing the contamination with Aerobic mesophilic bacteria, *Staphylococcus aureus*, total coliforms and coliforms at 45°C, and *Salmonella*. The isolated microorganisms were identified and their sensitivity to antibiotics was evaluated. The sanitary conditions were inadequate in 79.2% of the evaluated items. All sandwiches (100%) were contaminated with mesophilic bacteria, coliforms at 35°C and fecal coliform, and 45% with *E. coli*. *S. aureus* was found in 55% of samples, and in 25% these values were higher than those allowed by legislation. No *Salmonella* sp was isolated from any of the tested samples. The hygiene practices of many food street-vending places are not adequate, resulting in a high proportion of read-to-eat foods with microbiological quality unsatisfactory for consumption.

Key words. food hygiene, microbiological analysis, health surveillance, public health.

INTRODUÇÃO

É cada vez mais constante o consumo de alimentos fora do âmbito doméstico, crescendo o número de restaurantes e estabelecimentos que comercializam alimentos. Esta mudança de hábito do consumidor tem como consequência o aumento do número de doenças veiculadas por alimentos (DVAs), sendo considerado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), provavelmente, o maior problema de saúde no mundo moderno¹. Os alimentos vendidos nas ruas representam um problema de saúde pública, pois, salvo algumas exceções, são preparados e vendidos sem as mínimas condições de higiene, podendo conter micro-organismos contaminantes e potencialmente patogênicos, colocando em risco a saúde de quem os consome²⁻⁵.

O preparo de tais alimentos requer manuseio excessivo sob condições de higiene insatisfatórias, armazenamento inadequado, além do preparo por pessoas sem capacitação e conhecimento para a manipulação correta, ficando evidentes os riscos para a saúde dos consumidores. Estes riscos estão relacionados com as matérias-primas previamente contaminadas, o armazenamento inadequado em temperatura insatisfatória, bem como, com a contaminação posterior que pode ocorrer durante o manuseio, preparo e venda destes alimentos^{2,3,6}.

Os riscos à saúde do consumidor estão, na maior parte, associados à contaminação, sobrevivência e multiplicação de micro-organismos patogênicos⁷, que podem chegar até o alimento por inúmeras vias, refletindo condições precárias de higiene durante todo o processo^{8,9}.

O comércio de alimento por ambulantes tem aumentado consideravelmente, pois se constitui em atividade econômica alternativa para desempregados. Contudo, no Brasil, a ocorrência de DTAs não é de notificação compulsória, o que compromete a real avaliação do problema¹⁰. Desta forma, os objetivos deste estudo foram caracterizar as condições higiênico-sanitárias de ambulantes que comercializam sanduíches para o consumo humano em Londrina/PR e realizar análises microbiológicas destes produtos.

MATERIAL E MÉTODOS

Tipologia do Estudo, Amostragem e Coleta

Este estudo caracteriza-se como transversal, com abordagem quantitativa. Os dados relacionados às condições higiênico-sanitárias foram coletados no ano de 2007, em

47 pontos de venda de comercialização de sanduíches tipo cachorro-quente e *cheese*, na cidade de Londrina, PR, Brasil. Os ambulantes foram avaliados por meio de observação com auxílio de um questionário do tipo *checklist*.

Dos pontos de venda avaliados foram selecionados aleatoriamente 20 sanduíches constituídos de pão, salsicha, carne bovina, salada e molhos, para realização de análises microbiológicas. As amostras foram coletadas na qualidade de consumidor, acondicionadas em sacos plásticos e caixas isotérmicas, recebendo denominação por letras romanas, e encaminhadas ao laboratório de microbiologia.

Avaliação das condições higiênico-sanitárias

Para análise das condições higiênico-sanitárias foram coletados dados sobre condições de higiene de ambulantes localizados na região central e outros pontos (portas de faculdades e hospitais) da cidade, onde se concentram grande quantidade de ambulantes que comercializam alimentos para consumo humano. Optou-se pela avaliação daqueles que produzem sanduíches, por este alimento envolver maior manipulação e quantidade de matérias-primas, propiciando maior probabilidade de contaminação.

Os resultados de higiene foram agrupados e classificados por meio de um *checklist* adaptado da Resolução RDC nº 275, de 21 de outubro de 2002¹¹, estruturado em três itens: manipulador, vetores e pragas e equipamentos e utensílios, somando, ao todo, 24 itens. Para classificação quanto às exigências mínimas de condições de higiene, cada item foi classificado como ideal quando possuía 76 a 100% de adequação positiva, regular, de 51 a 75%, e ruim se as condições possuísem adequação positiva de 0 a 50%.

Avaliação das condições microbiológicas

As análises microbiológicas constaram da contagem total de aeróbios estritos e/ou facultativos viáveis, *Staphylococcus aureus*, determinação de coliformes a 35°C e termotolerantes, *Escherichia coli* e *Salmonella*, de acordo com as normas da APHA¹². Para tanto, foram pesados 25 gramas de cada amostra e adicionada 225 mL de solução peptonada 0,1%. Foi homogeneizado em *stomacher* e procederam-se diluições seriadas. Para as análises microbiológicas de contagem total de células e *S. aureus* utilizou-se a técnica de *pour plate* em ágar PCA (*plate count agar*) e BP (Baird-Parker), respectivamente. As placas foram incubadas a 37°C por 24-48 horas. Procedeu-se a contagem e cálculo das colônias suspeitas. As análises de coliformes a 35°C e coliformes termotolerantes foram realizadas pela técnica dos tubos múltiplos, utilizando CLVBB (caldo lactosado bile

verde brilhante) e EC (*Escherichia coli*), respectivamente. Dos tubos EC positivos foi retirado uma alíquota e semeado em ágar MacConkey e eosina azul de metileno para confirmação de *E. coli*. O teste de *Salmonella* spp foi precedido de cultura de enriquecimento, seguido de inóculo em ágar Ramback[®]. As colônias suspeitas foram confirmadas com testes bioquímicos de identificação.

Teste de susceptibilidade antimicrobiana

Os isolados confirmados de *E. coli* e *S. aureus* foram submetidos ao teste de susceptibilidade aos antimicrobianos, pela técnica de difusão em ágar, segundo os critérios e recomendações estabelecidos pelo NCCLS¹³. Os antibióticos utilizados foram tetraciclina,

ampicilina, eritromicina, estreptomina, cloranfenicol, gentamicina, norfloxacina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quanto à análise total das condições higiênico-sanitárias observou-se que dos 24 itens avaliados, apenas 5 (20,8%) apresentaram condições ideais de consumo. Os demais itens tiveram classificação regular ou ruim, mostrando condições precárias de higiene nos ambulantes avaliados.

A tabela 1 apresenta os itens analisados nos pontos de venda relacionados ao manipulador. Observa-se que 4 itens foram classificados como ideais entre os ambulantes. Os demais itens apresentaram classificação regular e ruim.

Tabela 1. Disposição dos itens avaliados pelo *checklist* relativos ao manipulador, percentual de adequação positiva e sua respectiva classificação

Itens avaliados (manipulador)	Adequação Positiva (%)	Classificação
Apresenta asseio pessoal?	83,3	ideal
Homens se apresentam sem barba e/ou bigode?	66,7	regular
Estão sem adornos?	40,0	ruim
As unhas estão curtas, sem esmaltes e limpas?	61,1	regular
Os cabelos estão presos?	93,8	ideal
Usa avental?	94,4	ideal
Dos que usam avental, se encontram limpos e asseados?	94,1	ideal
Não fumam, tosse, espirram ou falam sobre os alimentos?	56,3	regular
Não manipulam dinheiro e alimento ao mesmo tempo?	33,3	ruim
Usam máscara durante o preparo?	0,0	ruim
Usam luvas durante o preparo?	38,9	ruim

Os piores itens avaliados pelo *checklist* referem-se às questões com a mão do manipulador. A maioria das doenças de origem microbiana veiculadas por alimentos deve-se à manipulação inadequada dos mesmos, sendo as mãos um dos principais veículos de contaminação, quando não se encontram adequadamente higienizadas. A identificação de manipuladores de alimentos portadores de agentes patogênicos que podem ser propagados para os alimentos é uma ferramenta útil na prevenção da contaminação dos mesmos.

A tabela 2 apresenta os resultados relativos aos vetores e pragas. Observa-se baixa adequação positiva destes itens, ou seja, alto potencial de contaminação devido à presença de vetores e pragas. Uma vez que o comércio é na rua, estes itens não são passíveis de controle pelo ambulante, assim, são possíveis contaminantes dos alimentos que ficam expostos.

Moscas e abelhas são consideradas animais sinantrópicos, contudo, são potenciais transmissores de bactérias patogênicas. Esta transmissão se dá principalmente pelas patas, uma vez que esses animais pousam sobre dejetos e matérias orgânicas em decomposição, seguindo de pouso em alimentos. A presença de moscas pode estar relacionada com o fato de 70% das lixeiras não apresentarem tampas. Este fato pode facilitar o acúmulo de restos de alimento e refrigerantes, conseqüentemente, a atração de insetos. Estudos realizados por Oliveira et al¹⁴ relataram que a matéria orgânica em decomposição acumulada em lixeiras, exala um odor forte atraindo os dípteros e mantendo-os frequentemente ao seu redor. Este fato contribui para a disseminação de micro-organismos e ovos de helmintos pelo ambiente, inclusive para alimentos.

Tabela 2. Disposição dos itens avaliados pelo “check list” relativos a vetores e pragas, percentual de adequação positiva e sua respectiva classificação

Itens avaliados	Adequação Positiva (%)	Classificação
Não tem cão?	47,1%	Ruim
Não tem gato?	47,1%	Ruim
Não tem rato?	47,1%	Ruim
Não tem pássaros e pombas?	61,1%	Regular
Não tem moscas e abelhas?	37,5%	Ruim

Observam-se na tabela 3 os resultados relativos às condições dos equipamentos e utensílios. Com exceção do item “uso de material descartável”, todos os outros itens avaliados encontram-se inadequados na maioria dos ambulantes avaliados. Ações simples como lixeira com tampa não foram encontradas disponíveis na maioria dos pontos de venda.

Os dados referentes aos equipamentos de refrigeração e utensílios foram obtidos por observação. Aparentemente os utensílios apresentavam-se em bom estado de conservação. Contudo, estes dados não refletem a presença de possíveis micro-organismos que possam estar presentes nestes materiais. Há presença de pia em 89% dos locais avaliados, contudo, somente 72% lavavam com frequência os utensílios, corroborando as condições microbiológicas precárias que estes utensílios possam apresentar. Nenhuma das barracas possui água corrente encanada, sendo este fator complicador para manter a higiene local.

Segundo Lucca e Torres¹⁰, equipamentos e utensílios em más condições de higiene, bem como a presença de animais (pombos) e insetos oferecem risco de saúde, se estes entrarem em contato com alimentos. Os mesmos autores verificaram a presença de pombos em 100% dos locais estudados e de insetos (52%), devido a acúmulo de resíduos em torno do ponto de venda de sanduíches e a cestos de lixo destampados. Os utensílios

que se encontram descobertos, favorecem a contaminação por insetos e sujidades trazidas pelo vento.

Rodrigues et al⁵ e Mallon e Bortolozzo¹⁵, em estudos que analisaram as condições higiênico-sanitárias de ambulantes que comercializam alimentos nas ruas, sugeriram que as condições higiênicas dos estabelecimentos não eram adequadas, refletindo uma proporção relativamente alta de sanduíches com qualidade microbiológica insatisfatória para o consumo. Lucca e Torres¹⁰, analisando ambulantes que comercializavam cachorro-quente na região central de São Paulo, encontraram resultados semelhantes ao presente estudo, pois as condições higiênico-sanitárias foram consideradas inadequadas.

Outro problema grave detectado foi em relação ao uso de panos de prato, pois 82% dos panos de prato aparentavam condições inadequadas de limpeza, e em todos os pontos verificados, nenhum deles apresentaram um pano de prato para utensílios diferentes dos que utilizam para a limpeza das mãos. Muitos trabalhos têm mostrado o potencial dos panos de prato e esponjas como disseminadores de micro-organismos e tem notificado a persistência de bactérias nestes ambientes. A análise microbiológica de panos de prato tem revelado a presença de muitos micro-organismos entéricos, como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter*.

Tabela 3. Disposição dos itens avaliados pelo “check list” relativos a equipamentos e utensílios, percentual de adequação positiva e sua respectiva classificação

Itens avaliados	Adequação Positiva (%)	Classificação
Possuem equipamentos de refrigeração?	61,0%	Regular
Utensílios em bom estado de conservação?	62,5%	Regular
Usam material descartável?	76,0%	Ideal
Lixeira com tampa?	28,0%	Ruim
Lavam com frequência os utensílios sujos?	72,0%	Regular
Usam papel toalha?	17,0%	Ruim
Os panos estão limpos?	18,8%	Ruim
O pano que usa nos utensílios é diferente do que usa para enxugar as mãos?	0,0%	Ruim

Na tabela 4 estão representados os resultados obtidos com relação à contagem e enumeração de aeróbios estritos e facultativos, determinação de coliformes totais e fecais, *S. aureus* e pesquisa de *E. coli* e *Salmonella* spp. As amostras denominadas de A a O referem-se ao lanche tipo “cachorro quente”, e as amostras de P a T referem-se ao lanche tipo “cheese”.

Tabela 4. Resultados das análises microbiológicas de amostras de sanduíches comercializados por ambulantes, Londrina, PR, 2007

Amostra	Aeróbios estritos e/ou facultativos viáveis (UFC/g)	Coliformes totais (NMP/g)	Coliformes termotolerantes (NMP/g)	<i>S. aureus</i> (UFC/g)	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> sp em 25 g
A	1,0x10 ⁸	>110x10 ¹	>110x10 ¹	3,0x10 ²	Positivo	Ausência
B	1,0x 10 ⁶	>110x10 ¹	>110x10 ¹	Negativo	Negativo	Ausência
C	>3,0x10 ⁸	>110x10 ¹	>110x10 ¹	Negativo	Positivo	Ausência
D	>3,0x10 ⁸	>110x10 ¹	>110x10 ¹	Negativo	Negativo	Ausência
E	>3,0x10 ⁸	>110x10 ¹	46x10 ¹	Negativo	Negativo	Ausência
F	1,0x10 ⁸	>110x10 ¹	<3	1,0x10 ²	Negativo	Ausência
G	>3,3x10 ⁹	43	<3	2,5x10 ²	Negativo	Ausência
H	>3,0x10 ⁸	<3	46x10 ¹	8,0x10 ³	Positivo	Ausência
I	3,0x10 ⁸	>110x10 ¹	46x10 ¹	5,2x10 ²	Positivo	Ausência
J	>3,0x10 ⁸	43	<3	Negativo	Negativo	Ausência
K	4,2x10 ⁸	<3	46x10 ¹	Negativo	Negativo	Ausência
L	>3,0x10 ⁸	>110x10 ¹	>110x10 ¹	5,2x10 ³	Positivo	Ausência
M	>3,0x10 ⁸	>110x10 ¹	>110x10 ¹	6,0x10 ³	Positivo	Ausência
N	>3,0x10 ⁸	>110x10 ¹	>110x10 ¹	8,7x10 ³	Positivo	Ausência
O	>3,0x10 ⁸	<3	<3	6,2x10 ¹	Negativo	Ausência
P	5,2x10 ⁸	<3	>110x10 ¹	Negativo	Positivo	Ausência
Q	6,1x10 ⁸	>110x10 ¹	>110x10 ¹	Negativo	Negativo	Ausência
R	>3,0x10 ⁸	>110x10 ¹	<3	Negativo	Negativo	Ausência
S	>3,0x10 ⁸	>110x10 ¹	<3	5,2x10 ³	Negativo	Ausência
T	4,2x10 ⁸	<3	>110x10 ¹	5,7x10 ²	Positivo	Ausência

UFC/g – Unidade Formadora de Colônia por grama de produto
 NMP/g – Número Mais Provável por grama de produto

A leitura das contagens de bactérias mesófilas aeróbias estritas e facultativas evidenciou que todas as amostras (100%) analisadas continham populações variando de $1,0 \times 10^6$ a $4,2 \times 10^8$ UFC/g. A presença deste tipo de microrganismo tem relação direta com as condições gerais de preparo, temperatura e armazenamento dos componentes dos sanduíches. Também é um indicativo de patógenos mesófilos de origem humana ou animal que podem se desenvolver no alimento¹⁶.

Todas as amostras analisadas (100%) exibiram contagem de coliformes a 35°C e termotolerantes variando entre 110×10^1 a < 3 NMP/g. Embora as bactérias do grupo dos coliformes sejam facilmente destruídas pelo calor, sua contagem pode ser útil em testes de contaminação pós-processamento¹⁷. Segundo alguns estudos realizados, qualquer microrganismo encontrado em um alimento em concentração superior a 10^6 por grama ou mililitro é potencialmente prejudicial à saúde do homem. Este detalhe é de suma importância quando se trata de medidas preventivas, pois existem inúmeras espécies patogênicas que podem contaminar os alimentos e, em algumas situações, encontrar neles um substrato adequado para a sua proliferação^{18,19}.

Os testes confirmativos para a presença de *E. coli*, indicaram que 9 amostras (45%) apresentavam-se contaminadas com este microrganismo (Tabela 4). A presença de *E. coli* é geralmente procedente do intestino do homem e animais, indicando condições higiênicas insatisfatórias, não garantindo a inocuidade do alimento²⁰.

Os resultados obtidos para *S. aureus* mostraram que 11 (55%) das amostras apresentaram este microrganismo, sendo que 5 (25%) estava em desacordo segundo a legislação²¹, ou seja, encontravam-se fora do padrão estabelecido de no máximo 10^3 UFC/g de produto. Os sanduíches são frequentemente incriminados em surtos de intoxicação estafilocócica, pois tais alimentos podem contaminar-se com o *S. aureus* pelas mãos, pele e secreções oronasais de manipuladores durante as diferentes fases de preparação^{4,7}.

Não foi detectada a presença de *Salmonella* spp nas amostras analisadas. Contudo, um estudo conduzido pela OPS/OMS com alimentos vendidos em via pública, em diversas cidades da América Latina, verificou que os alimentos a base de carne encontram-se entre os de maior risco de transmitir *Salmonella*, seguidos pelas verduras.

Em relação à sensibilidade a antimicrobianos, *S. aureus* apresentaram 27,2% das cepas resistentes a tetraciclina, 9% ampicilina, 9% eritromicina, 18%

estreptomina, 18% cloranfenicol. Nenhuma resistência foi observada para os antibióticos: gentamicina e norfloxacina. *E. coli* apresentaram 33,3% de resistência a tetraciclina, 22,2% eritromicina, 33,3% estreptomina, 11% cloranfenicol, 11% gentamicina, 11% norfloxacina. Não houve isolados resistentes à ampicilina.

Dois isolados de *S. aureus* e um de *E. coli* não apresentaram resistência a pelo menos um dos antibióticos testados, já dois e três isolados, respectivamente, apresentam multirresistência. Nenhuma resistência intermediária foi observada nas análises.

O perfil de resistência apresentado pelo *S. aureus* e *E. coli* neste estudo foi significativo, uma vez que se trata de isolados a partir de alimentos, apresentando riscos ao consumidor. Geornaras e Holy²², ao trabalharem com amostras de *S. aureus* isoladas de aves, observaram que 88,9% dos isolados foram resistentes à penicilina e 22,3% à tetraciclina. Já Lee²³, ao realizar o teste de susceptibilidade de 421 cepas de *S. aureus* isoladas de alimentos de origem animal, obteve 100,0% de resistência à penicilina.

Stephan e Schumacher²⁴ isolaram 82 cepas de *E. coli* de animais e alimentos, e observaram a maior frequência de resistência para cefalotina e tetraciclina. Schroeder et al²⁵ isolaram 472 cepas de *E. coli* em carnes cruas, as quais apresentaram resistência a tetraciclina (59,0%), cefalotina (38,0%). Bactérias resistentes a antimicrobianos isoladas de alimentos podem colonizar populações humanas e até mesmo transferir essa resistência por meio de fontes alimentares contaminadas²⁶. O aumento potencial de resistência na população de isolados susceptíveis deve ser considerado nas ações de vigilância para reduzir a resistência aos antibióticos na cadeia alimentar²⁷.

Observou-se que as condições higiênico-sanitárias dos carrinhos utilizados pelos vendedores são precárias e sem recursos de higiene. Catazoni et al² também constataram e correlacionaram que a presença de micro-organismos potencialmente patogênicos em sanduíches comercializados por ambulantes se deve às precárias condições higiênicas aliadas às condições inadequadas de armazenamento.

Embora muitos parasitas não sejam considerados patógenos, estes dados são alarmantes principalmente porque se trata de grupos de alto risco de transmissão, devido às atividades de manipulação de alimentos que realizam¹⁴. A oferta de alimentos isentos de agentes patogênicos que possam pôr em risco a saúde do consumidor assumiu mundialmente grande relevância em saúde pública. Nas últimas décadas, tem-se observado

aumento das doenças transmitidas por alimentos, relacionadas a vários fatores, tais como o desenvolvimento econômico, a globalização do comércio de alimentos, a intensificação da urbanização e a modificações dos hábitos alimentares dos consumidores, com aumento do consumo de alimentos frescos ou *in natura*, preferência por alimentos prontos ou semiprontos e o consumo de refeições fora do domicílio^{10,28,29}.

CONCLUSÃO

As condições higiênico-sanitárias apresentadas pelos ambulantes foram consideradas precárias. Todos os sanduíches apresentaram contaminação microbiológica insatisfatória e os isolados avaliados, quanto à sensibilidade antimicrobiana, demonstraram resistência a pelo menos um antibiótico testado. A presença destes microorganismos pode ter relação direta com as condições higiênico-sanitárias inadequadas.

Devido à grande importância do comércio ambulante de alimentos, algumas medidas deveriam ser adotadas, como: desenvolvimento e aplicação de normas sanitárias adequadas para a venda ambulante, oferta de cursos de capacitação aos vendedores, estabelecimento de sistema de vigilância e informação epidemiológica de doenças transmitidas por alimentos de rua e controle de qualidade, como estratégia para a prevenção de contaminações; bem como, mobilização da prefeitura para adoção de medidas como: políticas de regularização, concessão de licenças e mecanismos de controle da atividade, visando à saúde da população que consomem estes alimentos.

Com esta avaliação foi possível reunir elementos essenciais para propor o desenvolvimento, junto a órgãos públicos, de treinamento e orientação de manipuladores de sanduíches em vias públicas.

REFERÊNCIAS

1. Rossi CF. Condições higiênico-sanitárias de utensílios, equipamentos, superfícies e mãos de manipuladores de restaurantes comerciais do tipo "self-service" de Belo Horizonte [Dissertação de mestrado]. Belo Horizonte, Minas Gerais: Universidade Federal de Minas Gerais, 2006.
2. Catanozi MPLM, Morelhão GG, Lurcic KM. Avaliação microbiológica de lanches vendidos em carrinhos de ambulantes na cidade de Araraquara, SP. *Hig Aliment*. 1999; 13(66/67): 116-20.
3. Dallari SG, Bravo ES, Ribeiro IA, Oliveira JC, Ferreira JA. Vigilância sanitária de alimentos de consumo imediato no município de São Paulo: a importância da informação para o planejamento. *Hig Aliment*. 2000; 14 (76): 24-6.
4. Nascimento GGF, Romero CEM, Campos MSP, Souza RL, Calçada ML. Avaliação microbiológica de alimentos comercializados em lanchonetes de *campi* universitários. *Hig Aliment*. 2003; 17 (100): 85-9.
5. Rodrigues KL, Gomes JP, Conceição RCS, Brod CS, Carvalho JB, Aleixo JAG. Condições higiênico-sanitárias no comércio ambulante de alimentos em Pelotas-RS. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2003; 23 (3): 447-52.
6. Meyer T, Moreira AS, Piazzetta LS. Importância da higiene pessoal no manipulador de alimentos. [acesso 10 mar 2008]. Disponível em: <http://www.unibem.br>.
7. Germano MIS, Germano PML. Comida de rua: prós e contras. *Hig Alimentar*. 2000; 11 (77): 27-32.
8. Franco BDGM, Landgraf M. Microbiologia dos alimentos. São Paulo (SP): Atheneu; 1996.
9. Hazelwood D, Mclean AC. Manual de higiene para manipuladores de alimentos. São Paulo (SP): Livraria Varela; 1998.
10. Lucca A, Torres EAFS. Condições de higiene de "cachorro-quente" comercializado em vias públicas. *Rev Saúde Pública*. 2002; 36 (3): 350-2.
11. Brasil. Resolução nº 275, de 21 de outubro de 2002. Dispõe sobre o regulamento técnico de procedimentos operacionais padronizados aplicados aos estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos e a lista de verificação das boas-práticas de fabricação em alimentos produtores e industrializadores de alimentos. Diário Oficial [da] União, Brasília, DF, 23 out. 2002, Seção 1, p. 126.
12. APHA. American Public Health Association. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4th ed. Washington (DC); 1992.
13. NCCL. National Committee for Clinical Laboratory Standarts. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests - approved standards M2-A7. Seventh edition. Wayne, Pa: NCCLS; 2000.
14. Oliveira MC, Silva CV, Costa-Cruz JM. Intestinal parasites and commensals among individuals from a landless camping in the rural area of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. *Rev Inst Med Trop*. 2003; 45 (3): 173-6.
15. Mallon C, Bortolozzo EAFQ. Alimentos comercializados por ambulantes: uma questão de segurança alimentar. *Publ. UEPG Ci Biol Saúde*. 2004; 10 (3/4): 65-76.
16. Leite CQF, Valentini SR, Falcão DP. Pesquisa de enteropatógenos em alimentos cárneos crus. *Ciênc Tecnol Aliment*. 1988; 8:155-68.
17. Forsythe SJ. Microbiologia da segurança alimentar. Porto Alegre (RS): Artmed; 2002.
18. Riedel G. Controle sanitário dos alimentos. 2 ed. São Paulo (SP): Atheneu; 1992.
19. Roitman I, Travassos LR, Azevedo JL. Tratado de microbiologia. São Paulo (SP): Manole; 1988.
20. Frasier WC. Microbiologia de los alimentos. 4 ed. Acricbia: Zaragoza; 1993.

21. Brasil. Portaria 326 de 1997 - Regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos. [acesso 15 mar 2008]. Disponível em www.anvisa.gov.br/legis/portarias.
22. Geornaras I, Holy AV. Antimicrobial susceptibilities of isolates of *Staphylococcus aureus*, *Listeria* species and *Salmonella* serotypes associated with poultry processing. *Int J Food Microbiol*. 2001; 70: 29-35.
23. Lee JH. Methicillin (Oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. *Appl Environ Microbiol*. 2003; 69: 6489-94.
24. Stephan R, Schumacher S. Resistance patterns of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains isolated from animals, food and asymptomatic human carriers in Switzerland. *Lett Appl Microbiol*. 2001; 32: 114-7.
25. Schroeder CM, White DG, Meng J. Retail meat and poultry as a reservoir of antimicrobial resistant *Escherichia coli*. *Food Microbiol*. 2004; 21: 249-55.
26. Khan A, Das SC, Sikdar RA, Khanam J, Yamasaki S, Takeda Y et al. Antibiotic resistance, virulence gene, and molecular profiles of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* isolates from diverse sources in Calcutta, India. *J Clin Microbiol*. 2002; 40: 2009-15.
27. Klein G, Bulte M. Antibiotic susceptibility pattern of *Escherichia coli* strains with verocytotoxic *E. coli*-associated virulence factors from food and animal faces. *Food Microbiol*. 2003; 20: 27-33.
28. Arámbulo P, Almeida CR, Cuéllar SJ, Belotto AJ. Street food vending in Latin America. *Bull Pan Am Health Organ*. 1994; 28 (4): 344-54.
29. Borges LJ, Amorim LJM, André MCDPB, Campos MRH, Serafini AB. Qualidade microbiológica de empadão goiano comercializado em uma feira de lazer de Goiânia-GO e teste de susceptibilidade antimicrobiana de cepas isoladas. *Rev Patol Trop*. 2008; 37 (2): 131-42.

***Salmonella* Enteritidis: importância do inquérito epidemiológico, análise de alimentos e coprocultura na elucidação de 167 surtos alimentares**

Salmonella Enteritidis: the significance of the epidemiological investigation, analysis of food and fecal culture for elucidating 167 foodborne outbreaks

RIALA6/1320

Marise SIMÕES¹, Marilu Mendes Moscardini ROCHA², Beatriz PISANI¹, Maria Ângela Garnica PRANDI¹, Eneida Gonçalves LEMES-MARQUES^{2*}

*Endereço para correspondência: Centro de Laboratório Regional de Campinas, Instituto Adolfo Lutz. Rua São Carlos, 720, Vila Industrial. Campinas/SP, Brasil. CEP 13035-420. Fone: 19 3272-7977. E-mail: eglmarques@ial.sp.gov.br

¹Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas, Centro de Laboratório Regional de Campinas, Instituto Adolfo Lutz, Campinas, SP, Brasil

²Laboratório de Bacteriologia Médica, Núcleo de Ciências Biomédicas, Centro de Laboratório Regional de Campinas, Instituto Adolfo Lutz, Campinas, SP, Brasil

Recebido: 15.01.2010 - Aceito para publicação: 29.12.2010

RESUMO

A infecção humana por *Salmonella* Enteritidis está associada ao consumo de ovos crus ou mal cozidos e seus derivados e, a partir de 1993, emergiu como um problema de saúde pública no Brasil. Neste trabalho foram analisados os surtos por *S. Enteritidis* ocorridos entre os anos de 1995 e 2008 na região sudeste do Estado de São Paulo, bem como a importância da elaboração do inquérito epidemiológico para a sua elucidação. A análise conjunta de dados resultantes de análises de alimentos, coprocultura e dos inquéritos recebidos pelo laboratório mostrou a ocorrência de 167 surtos positivos para *S. Enteritidis*, dos quais foram obtidos 59 (35,3%) inquéritos epidemiológicos. Do total de surtos, 48 (28,7%) foram elucidados somente pela análise de alimentos; 25 (15%) pela análise de alimentos e coprocultura, e 94 (56,3%) somente por coprocultura. Dentre os alimentos envolvidos nos surtos, o mais frequente foi a maionese caseira (58,2%). Verifica-se a continuidade no desconhecimento da população em relação ao consumo de alimentos que contenham ovos crus ou mal cozidos e a necessidade de introduzir melhorias na investigação epidemiológica dos surtos, para que se possa identificar a fonte de infecção no maior número possível dessas ocorrências.

Palavras-chaves. *Salmonella* Enteritidis, inquérito epidemiológico, salmonelose, diarreia, surtos.

ABSTRACT

Human illness caused by infection with *Salmonella* Enteritidis associated with egg products increased worldwide beginning as early as the mid-70s, and by 1990 this serovar was the primary cause of salmonellosis in the world. This study reports the foodborne outbreaks caused by *Salmonella* Enteritidis occurred in the southeastern region of São Paulo State, Brazil, from 1995 to 2008. Also, the importance of the epidemiological investigation to elucidate the foodborne outbreaks is considered. The combined analysis on the data from the food culture, the feces culture and the epidemiological inquiries showed the occurrence of 167 *S. Enteritidis*-positive outbreaks, based on 59 (35.3%) epidemiological inquiries only. Of 167 outbreaks, 48 (28.7%) were elucidated by food analysis only; 25 (15%) by food and feces analysis; and 94 (56.3%) by feces culture only. Epidemiological and microbiological investigations showed that the home-made mayonnaise (58.2%) was the most frequent food being as the vehicle of infection. The epidemiological investigation of foodborne outbreaks should be improved by implementing the data, the foods and biological specimens collecting procedures, and also, people should be instructed about the risks of consuming foods containing raw or under cooked eggs.

Key words. *Salmonella* Enteritidis, epidemiological inquiries, salmonellosis, diarrhea, outbreaks.

INTRODUÇÃO

A salmonelose é uma doença infecciosa aguda que atinge, indiferentemente, populações de áreas geográficas desenvolvidas e em desenvolvimento. Na maioria das vezes os sintomas são diarreia, febre e cólicas abdominais, 12 a 72 horas após a infecção, que dura de 4 a 7 dias¹. No entanto, períodos mais prolongados já foram descritos na literatura para surtos, possivelmente, devido a uma baixa dose infectante do agente no alimento contaminado². Embora a maioria das pessoas doentes se recupere sem tratamento, em algumas, a diarreia pode ser tão severa que a hospitalização é necessária. Nestes pacientes, a infecção pode se disseminar dos intestinos para a corrente sanguínea e daí para outras partes do corpo, podendo causar a morte¹. As pessoas idosas, as crianças e as pessoas com o sistema imune comprometido são os mais prováveis de desenvolver a forma mais severa da doença¹.

A partir de 1985, as infecções humanas causadas por *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis (*Salmonella* Enteritidis - SE) aumentaram na América do Norte, América do Sul, Europa e África. Os dados de vigilância de *Salmonella* da Organização Mundial de Saúde, de 1979 a 1987, mostram um aumento nos relatos de isolamento de SE em 24 países (entre eles o Brasil, com cinco isolamentos relatados em 1979, e 29 em 1987)³. A grande incidência de surtos causados por este sorovar chamou a atenção para fontes comuns da infecção. As investigações epidemiológicas identificaram o consumo de ovos mal cozidos ou de alimentos contendo ovos como responsáveis pela maioria dos surtos¹.

Geralmente as aves infectadas com SE não apresentam sinais clínicos⁴. *Salmonella* Enteritidis infecta silenciosamente os ovários de galinhas aparentemente saudáveis e contamina os ovos antes das cascas serem formadas, por transmissão vertical via aparelho reprodutivo. Há também a possibilidade de os ovos se tornarem contaminados após a formação da casca pelo contato com as fezes contaminadas na cloaca ou mesmo no ambiente. Os ovos incubáveis podem se tornar contaminados após a postura, ainda nos ninhos, nos galpões de matrizes, nos caminhões e no próprio incubatório, caracterizando a transmissão horizontal do microrganismo^{5,6,7}.

No Brasil, a explosão da ocorrência de SE deu-se a partir de 1993, tanto de fontes humanas como não humanas, emergindo como um grande problema avícola

e de saúde pública no país⁸. Os estudos epidemiológicos, incluindo a fagotipagem e sonda complementar de rRNA, sugerem a entrada de SE no país via importação de material genético avícola contaminado, provavelmente no final da década de 80⁸. No Estado de São Paulo, no período compreendido entre 1991 e 1995, SE correspondeu a mais de 60% dos sorovares isolados no Estado, passando de 1,2% para 64,9% entre as amostras de fontes humanas, e de zero para 40,7% para as amostras não humanas, com grande aumento a partir de 1993. As investigações epidemiológicas identificaram o consumo de ovos ou alimentos contendo ovos como responsáveis pela maioria dos surtos devidos a SE^{9,10}. Em 2004, Matsuoka et al¹¹ descreveram um surto hospitalar de SE em São Paulo associado à nutrição enteral que continha albumina de ovo liofilizada, envolvendo nove pessoas de 19 a 79 anos, com três óbitos. Este e outros casos semelhantes vêm reafirmar a continuação e a gravidade da infecção por SE.

O objetivo deste trabalho foi fazer um estudo retrospectivo dos surtos de toxinfecção alimentar devidos a SE, ocorridos no período de 1995 a 2008, na região de abrangência do Centro de Laboratório Regional - Instituto Adolfo Lutz (IAL) de Campinas III, Campinas, SP, Brasil, e avaliar a importância da elaboração do inquérito epidemiológico e da realização da coprocultura na sua elucidação.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliados 167 surtos positivos para SE ocorridos no período de 1995 a 2008, na região de abrangência do Centro de Laboratório Regional - Instituto Adolfo Lutz de Campinas III, correspondente a 88 municípios da região sudeste do Estado de São Paulo, com uma população de pouco mais de seis milhões de habitantes (6.107.433 habitantes, segundo dados do Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo)¹². Foram analisados os inquéritos epidemiológicos dos surtos encaminhados e posteriormente relacionados com as coproculturas realizadas em material coletado de indivíduos doentes. Na ausência de inquérito foi considerado surto o achado de duas ou mais pessoas com coprocultura positiva e/ou um alimento positivo para SE.

A metodologia utilizada para a análise dos alimentos foi a recomendada por Flowers et al¹³ com as seguintes modificações: substituição do caldo

de pré-enriquecimento pela água peptonada a 1% tamponada e uso do meio de IAL¹⁴ para identificação presuntiva de *Salmonella*.

Para as coproculturas as amostras foram transportadas em meio de Cary Blair, e posteriormente analisadas segundo o método de Pessoa et al¹⁵, modificado como a seguir: semeadura em placas de ágar *Salmonella-Shigella* (SS), ágar Mac Conkey, e caldo Tetrionato (TT) acrescido de 0,2 mL de solução iodetada. As placas foram incubadas a 36-37°C/18-24 horas e o caldo TT a 42°C/18-24h. Após este período, uma alíquota de 0,1 mL do caldo TT foi semeada em placas de ágar SS e ágar Verde Brilhante que foram incubadas a 36-37°C/18-24h. As colônias suspeitas isoladas nas placas foram repicadas em meio de IAL e incubadas em estufa 36-37°C/18-24 horas. As amostras com identificação presuntiva para *Salmonella* em meio de IAL foram aglutinadas com antissoros polivalentes somático e flagelar específicos. As amostras com soroglutinação positiva foram encaminhadas ao laboratório central do IAL para sorotipagem, de acordo com o descrito por Popoff e Le Minor¹⁶; Popoff¹⁷ e Popoff e Le Minor¹⁸.

Projeto registrado na CCD-LR sob nº 10/2004. Aprovado pela CCD-LR/CEPIAL/CTC-IAL.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em 167 surtos positivos para *S. Enteritidis* foram obtidos 59 (35,3%) inquéritos epidemiológicos, totalizando 1302 pessoas doentes e sete óbitos em 43 (49%) municípios, dos 88 da região em estudo. As informações relativas ao número de doentes e de óbitos foram obtidas nos inquéritos epidemiológicos

ou, na ausência destes, junto às vigilâncias envolvidas nos surtos. Entretanto, não foi possível obter estas informações em todos os surtos analisados, de forma que estes números não representam a totalidade destes casos no período estudado. Dentre estes surtos, somente em 73 (44%), foi realizada a análise de alimentos, prejudicando, assim, o encontro da fonte de infecção na maioria deles, o que aponta para uma falha do sistema de investigação na maior parte da região estudada. As principais causas desta baixa porcentagem foram fatores como: não realização do inquérito epidemiológico, dificuldades das autoridades sanitárias em conseguirem as amostras, falta de informações pelas pessoas doentes e, ainda, o recebimento de informações não confiáveis durante a investigação epidemiológica. Estes dados são semelhantes aos de Kottwitz et al¹⁹, que avaliando surtos de salmonelose ocorridos no Estado do Paraná de 1999 a 2008, relataram que somente em 41% dos surtos foi possível realizar a análise de alimentos.

A identificação e investigação precoce de surtos causados por alimentos é um componente essencial na prevenção e controle das doenças transmitidas por alimentos (DTAs). O conhecimento dos alimentos envolvidos nos surtos é importante para se determinar a causa da infecção e se tomar medidas que impeçam o aparecimento de novos surtos. A falta de elaboração do inquérito epidemiológico prejudica a escolha dos alimentos implicados como possível fonte de infecção.

Quanto ao tipo de análise executada, 48 (28,7%) surtos foram elucidados, somente, por análise de alimentos; 25 (15%) por análise de alimentos e coprocultura, e 94 (56,3%), somente, por coprocultura.

Tabela 1. Frequência de alimentos com resultado de cultura positivos para *Salmonella* Enteritidis recolhidos nos surtos ocorridos no período de 1995 a 2008, na região sudeste do Estado de São Paulo, Brasil

Alimento	Nº de amostras positivas	%
Maionese caseira	46	58,2
Bolo (recheio/cobertura)	21	26,6
Tortas doces/pavês	8	10,1
Derivados de carne ¹	4	5,1
Total	79	100,0

¹Frango assado, hambúrguer e salgadinhos.

Dentre os alimentos envolvidos nos surtos em estudo, o mais frequente foi a maionese caseira (Tabela 1). Da mesma forma, vários autores no Brasil relataram a maionese como a mais comum das fontes alimentares de infecção em surtos de SE^{20,21,22}. Quanto aos outros alimentos envolvidos, no Rio Grande do Sul, Costalunga e Tondo²³ também encontraram carne e derivados de carne (17%) e derivados de pasteleria (17%) como veículo alimentar de infecção nos surtos, além da maionese caseira (42%). De forma semelhante, Kottwitz et al¹⁹ encontraram carne e derivados (34,8%), além de alimentos à base de ovos (bolo, maionese e ovos - 45%) e de alimentos variados (20,2%) em surtos ocorridos no Estado do Paraná. Em outros países, os mesmos tipos de alimentos aparecem associados aos surtos por SE. Patrick et al²⁴, nos Estados Unidos, observaram que 80% deles estavam associados a alimentos à base de ovos. Chávez-de la Peña et al²⁵, no México, apontaram como causa provável de um surto hospitalar, a ingestão de tortas de carne (elaboradas com ovo, batata cozida e pedaços de carne cozidos e desfiados) com uma cocção insuficiente. Para Betancor et al²⁶, no Uruguai, 80% destes surtos, nos últimos 15 anos, tiveram como fonte de infecção ovos ou carne de aves. No Chile, Fica et al²⁷ relataram que 40% dos surtos por SE encontrados na região metropolitana de Santiago do Chile estavam associados ao consumo de alimentos contendo ovos ou derivados deles, e 6% associados a carne de aves. A prevalência da maionese caseira como principal fonte alimentar de infecção por SE alerta para o fato de que a população em geral ainda carece de informações sobre os riscos de consumir alimentos com ovos crus ou mal cozidos havendo necessidade de uma campanha séria neste sentido. Vale ressaltar que, na Bélgica, Collard et al²⁸ observaram uma mudança no veículo alimentar predominante nos surtos, passando de ovos e alimentos preparados com ovos crus (23% em 1999 e apenas 8% em 2005) para carnes e derivados (21% em 1999 e 35% em 2005). Os autores atribuem esta diminuição a uma campanha de prevenção realizada no país realçando a importância da refrigeração adequada de alimentos contendo ovos frescos.

É importante salientar que numa pequena porcentagem dos 167 surtos pesquisados (dados não apresentados) foram encontrados dois ou mais alimentos positivos para SE, sugerindo procedimentos inadequados de manipulação. Esta constatação também foi descrita por outros autores^{19,29,30} demonstrando que, embora produtos de origem avícola sejam os principais envolvidos em surtos por SE, a manipulação inadequada de alimentos

desempenha um papel importante na disseminação da bactéria por proporcionar a contaminação cruzada no ambiente de preparo de alimentos.

A análise cronológica dos surtos (Figura 1) mostra uma diminuição em número, a partir do ano 2000. No entanto, não é possível afirmar que esta queda tenha sido devida a uma diminuição real no número de surtos, considerando-se as informações do próprio Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo, sobre importantes subnotificações de casos, mesmo os internados²². Segundo Kottwitz et al¹⁹, no Estado do Paraná a diminuição no número de surtos foi constatada a partir de 2007, tendo os autores atribuído esta queda a um aumento de subnotificação neste período. Em outros países a diminuição foi relatada a partir de 2005^{26,28} sendo, no entanto, nestes casos, atribuída a campanhas de prevenção na mídia e/ou a campanhas de vacinação em criadouros de aves.

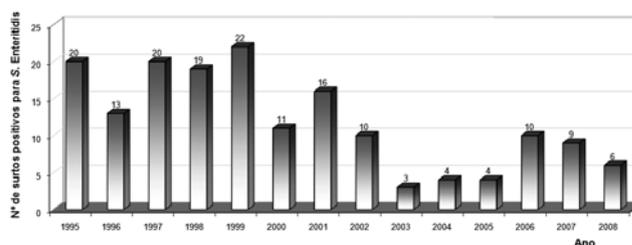


Figura 1. Número de surtos de doenças transmitidas por alimentos positivos para *Salmonella* Enteritidis, por ano, ocorridos no período de 1995 a 2008, na região sudeste do Estado de São Paulo, Brasil

No Brasil, a ocorrência de surtos de DTAs é de notificação obrigatória desde 1999 (Portaria GM/MS N°1461/99)³¹, no entanto, da mesma forma que para o Estado de São Paulo, a sua subnotificação nos demais estados do país é frequente. Segundo dados do Ministério da Saúde³², de 1999 a 2008 foram notificados no Brasil 6062 surtos de DTA, sendo que em 51% deles não foi possível estabelecer o agente etiológico e em 34,3% não foi identificada a fonte de infecção. Estes dados demonstram a carência de um sistema de informação capaz de rastrear e identificar surtos, não apenas na região estudada, mas também em todo o país. Assim, é bem possível que entre os casos esporádicos de adultos com infecções intestinais haja muitos associados com surtos familiares, uma vez que, nem sempre os adultos procuram um médico nos casos de diarreia e que, muitas vezes, por falta de informação, os surtos de diarreia não são notificados pela população.

Em face destas informações e somando-se a isso o fato de que muitos laboratórios locais não enviam as cepas de *Salmonella* isoladas ao laboratório de referência para sorotipagem, acreditamos que nossos resultados podem não representar a totalidade dos casos de infecção isolados ou mesmo de surtos por SE na região estudada.

Em relação aos ovos, além da infecção transovariana, há ainda o problema da sua contaminação durante a estocagem e manipulação no preparo de alimentos de forma a permitir a multiplicação do agente. SE presente na superfície da casca de ovos pode penetrar no seu interior, dependendo da qualidade da casca, condições, tempo e temperatura de estocagem³³. Segundo Barros et al³⁴, o armazenamento de ovos sob refrigeração em temperaturas abaixo de 8°C (preferencialmente a 4°C) é significativo na redução e ausência de SE na casca. A refrigeração pode ainda retardar a penetração ou a replicação bacteriana no interior ou na superfície do ovo, o que permite manter uma baixa dose infectante até o consumo ou cozimento. Recomenda-se ainda a pasteurização dos ovos para uso em enfermarias e outras instituições e alimentos comerciais que podem não ser adequadamente cozidos antes de serem comidos.

Quanto à erradicação desta DTA, a aquisição e produção de lotes de aves livres do agente, além do combate aos roedores, importantes reservatórios ambientais desta bactéria em granjas contaminadas, a limpeza e desinfecção ambiental e vazios sanitários são procedimentos indicados para o controle desta bactéria na avicultura⁸. Um estudo europeu revelou que, além das medidas sanitárias, as principais medidas preventivas contra SE são a vacinação dos animais nos criadouros e o tratamento com antibióticos daqueles contaminados, que devem ser monitorados periodicamente para detectar a presença da bactéria²⁸.

CONCLUSÃO

As infecções humanas por SE são resultado de processos que envolvem etapas produtivas, de distribuição, manipulação, consumo e cozimento de alimentos específicos. A constatação de que 58% dos surtos ocorridos no período estudado foram causados por alimentos elaborados à base de ovos evidencia o risco potencial deste alimento para a saúde pública e a falta de informação da população neste sentido. A combinação da falta de medidas de controle dos criadouros, com a ausência de campanhas educativas junto à população,

assegura a persistência e endemia desta infecção, agravada muitas vezes pela mídia que ainda veicula programas sobre culinária com receitas que utilizam gema e/ou clara cruas. A melhoria e a continuidade da educação em saúde pública, quanto às técnicas de manuseio e preparo de ovos e outros itens alimentícios potencialmente contaminados como hambúrgueres e frangos, são necessárias para a diminuição da doença. O grande número de hospitalizações (dados não apresentados) e os óbitos ocorridos no período estudado reafirmam os riscos e a gravidade da infecção por SE na região estudada. Desta forma, faz-se necessária uma melhoria da investigação epidemiológico-sanitária dos surtos na região, seja através da elaboração dos inquéritos epidemiológicos e do seu preenchimento correto (com uma reciclagem dos profissionais envolvidos na investigação), seja através de uma maior integração entre as vigilâncias epidemiológica e sanitária e laboratório de saúde pública, quanto aos procedimentos de coleta, conservação e transporte de amostras de alimentos e de material biológico. Somente a integração de esforços de controle e prevenção em todas estas etapas permitirá minimizar o risco da infecção por SE na região e no país.

REFERÊNCIAS

1. Centers for Disease Control and Prevention (US); National Center for Zoonotic, Vector-Borne, and Enteric Diseases (ZVED). Salmonellosis; 2008. [acesso em 08 out 2008]. Disponível em: [http://www.cdc.gov/nczved/dfbmd/disease_listing/salmonellosis_gi.html].
2. Bruins MJ, Fernandes TMA, Ruijs GJHM, Wolfhagen MJHM, Rijn-van Berkel JM, Schenk BE et al. Detection of a nosocomial outbreak of salmonellosis may be delayed by application of a protocol for rejection of stool cultures. *J Hosp Infect*. 2003;54:93-8.
3. Rodrigue DC, Tauxe RV, Rowe B. International increase in *Salmonella enteritidis*: a new pandemic? *Epidemiol Infect*. 1990; 105: 21-7.
4. Guard-Petter J. Minireview – The chicken, the egg and *Salmonella enteritidis*. *Environ Microbiol*. 2001; 3(7): 421-30.
5. Hedberg CW, David MJ, White KE, Mac Donald KL, Osterholm MT. Role of egg consumption in sporadic *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* infections in Minnesota. *J Infect Dis*. 1993; 167(1): 107-11.
6. Rocha PT, Mesquita AJ, Andrade MA, Louly PR, Nascimento MN. *Salmonella* spp em forros de caixa de transporte e órgãos de pintos de um dia. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2003; 55(6): 672-6.
7. Silva EN. *Salmonella enteritidis* em aves e saúde pública. *Hig Aliment*. 1995; 9(37): 7-12.

8. Silva EN, Duarte A. *Salmonella* Enteritidis em aves: retrospectiva no Brasil. *Rev Bras Cienc Avic*. 2002; 4(2): 85-100.
9. Irino K, Fernandes AS, Tavechio AT, Neves BC, Dias AMG. Progression of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 strains in São Paulo State, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 1996; 38(3): 193-6.
10. Tavechio AT, Fernandes SA, Neves BC, Dias AMG, Irino K. Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella* Enteritidis in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 1996; 38(5): 315-22.
11. Matsuoka DM, Costa SF, Mangini C, Almeida GMD, Bento CN, Van Der Heijden IM et al. A nosocomial outbreak of *Salmonella enteritidis* associated with lyophilized enteral nutrition. *J Hosp Infect*. 2004; 58: 122-7.
12. Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo. Informações gerais. Abrangências geográficas; 2009. [acesso em 20 mai 2009]. Disponível em: [http://www.cve.saude.sp.gov.br/hm/nive/mapa_info.html].
13. Flowers RS, D'Aoust JY, Andrews WH, Bailey JS. *Salmonella*. In: Vanderzant C, Don F. Splittstoesser editors. *Compendium of methods for the microbiology examination of foods (APHA)* 3 ed. Washington, DC; 1992. p. 371-422.
14. Pessoa GVA, Silva EM. Milieu pour l'identification présumptive rapide des enterobactéries, des Aeromonas et vibrión. *Ann Microbiol. (Inst. Pasteur)*. 1974; 125 A(1): 341-7.
15. Pessoa GVA, Irino K, Calzada CT, Melles CEA, Kano E. Ocorrência de bactérias enteropatogênicas em São Paulo, no septênio 1970-1976. I- Sorotipos de *Salmonella* isolados e identificados. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 1978; 38: 87-105.
16. Popoff MY, Le Minor L. Formules antigéniques des sérovars de *Salmonella*. Paris, Centre Collaborateur OMS de Référence et de Recherche pour les *Salmonella*. 1997.
17. Popoff MY. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars. WHO collaborating centre for reference and research on *Salmonella*. 8 ed. Paris, Pasteur Institute; 2001.
18. Popoff MY, Le Minor LE. The genus *Salmonella*. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT. ed. *Bergey's manual of systematic Bacteriology*. 2 ed. New York, Springer; 2005. v. 2, p. 764-99.
19. Kottwitz LBM, Oliveira TCRM, Alcocer I, Farah SMSS, Abrahão WSM, Rodrigues DP. Avaliação epidemiológica de surtos de salmonelose ocorridos no período de 1999 a 2008 no Estado do Paraná, Brasil. *Acta Sci Health Sci*. 2010; 32(1): 9-15.
20. Tavechio AT, Ghilardi AC, Peresi JT, Fuzihara TO, Yonamine EK, Jakabi M et al. *Salmonella* serotypes isolated from nonhuman sources in São Paulo, Brasil, from 1996 through 2000. *J Food Prot*. 2002; 65(6): 1041-4.
21. Peresi JTM, Almeida IAZC, Lima SI, Marques DF, Rodrigues ECA, Fernandes AS et al. Surtos de enfermidades transmitidas por alimentos causados por *Salmonella* Enteritidis. *Rev Saude Publica*. 1998; 32(5): 477-83.
22. Eduardo MBP, Katsuya EM, Bassit NP, Mello MLR. *Salmonella* Enteritidis – Uma importante causa de surtos bacterianos veiculados por alimentos e a necessidade de uma nova regulamentação sanitária para os alimentos implicados, São Paulo, Brasil, 1999-2003. *BEPA*. 2004; 1(8): 6-11.
23. Costalunga S, Tondo EC. Salmonellosis in Rio Grande do Sul, Brazil, 1997 to 1999. *Braz J Microbiol*. 2002; 33: 342-6.
24. Patrick ME, Adcock PM, Gomez TM, Altekruze SF, Holland BH, Tauxe RV et al. *Salmonella* Enteritidis infections, United States, 1985-1999. *Emerg Infect Dis*. 2004; 10(1): 1-7.
25. Chávez-de la Peña ME, Iglesias AJH, Jiménez MAH, Martínez RB, León JM, Cabello FA et al. Brote por *Salmonella* Enteritidis en trabajadores de un hospital. *Salud pública Méx*; 2001; 43(3):211-16. [acesso 20 mai 2009]. Disponível em: [http://www.scielosp.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342001000300006&Ing=pt doi:10.1590/S0036-36342001000300006].
26. Betancor L, Pereira M, Martínez A, Giossa G, Fookes M, Flores K et al. Prevalence of *Salmonella enterica* in poultry and eggs in Uruguay during an epidemic due to *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis. *J Clin Microbiol*. 2010; 48(7): 2413-23.
27. Fica A, Alexandre M, Prat S, Fernandez J, Heitmann I. Cambios epidemiológicos de las salmonelosis en Chile: desde *Salmonella typhi* a *Salmonella enteritidis*. *Rev Chil Infectol*. 2001; 18 (2): 85-93.
28. Collard JM, Bertrand S, Dierick K, Godard C, Wildemauew C, Vermeersch K et al. Drastic decrease of *Salmonella* Enteritidis isolated from humans in Belgium in 2005, shift in phage types and influence on foodborne outbreaks. *Epidemiol Infect*. 2008; 136: 771-81.
29. Nadvorny A, Figueiredo DMS, Schmidt V. Ocorrência de *Salmonella* spp em surtos de doenças transmitidas por alimentos no Rio Grande do Sul em 2000. *Acta Sci Vet*. 2004; 32: 47-51.
30. Cardoso ALSP, Tessari ENC. *Salmonella* na segurança dos alimentos. *Biológico*. 2008; 70(1): 11-3.
31. Brasil. Portaria nº 1.461, de 22 de dezembro de 1999 do Ministério da Saúde. Dispõe sobre notificação compulsória de doenças, em todo o território nacional. *Diário Oficial da União, Brasil, Brasília, DF*, 23 dez 1999. Seção I, 3: 87 (245-E), p. 34.
32. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. Análise epidemiológica dos surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil. [acesso em 12 fev 2011]. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/surtos.dta.pdf].
33. Kaku M, Peresi JTM, Tavechio AT, Fernandes AS, Batista AB, Castanheira IAZ et al. Surto alimentar por *Salmonella* Enteritidis no noroeste do Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Saúde Pública*. 1995; 29 (2): 127-31.
34. Barros MR, Andreatti Filho RL, Lima ET, Sampaio HM, Crocchi AJ. Sobrevivência de *Salmonella enteritidis* em ovos contaminados artificialmente, após desinfecção e armazenados em diferentes temperaturas. *Rev Bras Cienc Avic*. 2001; 3(3):219-23.

Avaliação microbiológica do preparo de fórmula láctea infantil em lactário hospitalar

Microbiological quality in preparing the infant milk formula in hospital milk dispensary

RIALA6/1321

Pamela ROSSI*, Dirce Yorika KABUKI, Arnaldo Yoshiteru KUAYE

*Endereço para correspondência: Laboratório de Higiene, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Rua Monteiro Lobato nº80, Barão Geraldo, Campinas, SP, Brasil. CEP: 13082-862. E-mail: pamelarossica@yahoo.com.br

Projeto FAPESP 06/56265-9

Recebido: 13.09.2010 – Aceito para publicação: 29.12.2010

RESUMO

As condições higiênico-sanitárias no preparo de fórmulas infantis em lactário hospitalar foram investigadas por meio de análises microbiológicas de amostras do ar ambiental, das superfícies de equipamento e utensílios e da fórmula láctea infantil (FLI) em pó e reconstituída. As coletas foram realizadas em dez pontos amostrais de seis lotes de preparação, um total de 60 amostras, nas quais foram realizadas as determinações de micro-organismos indicadores dos grupos dos coliformes totais e fecais, enterobactérias totais, micro-organismos aeróbios mesófilos e psicotróficos totais e dos micro-organismos patogênicos *Staphylococcus* coagulase positiva, *Bacillus cereus* e *Salmonella*. Uma grande variação nas contagens dos micro-organismos indicadores foi observada, embora nenhum dos micro-organismos patogênicos analisados tenham sido detectados. Todas as amostras da FLI em pó apresentaram-se adequadas para o consumo, de acordo com a resolução vigente, porém as amostras das FLIs reconstituídas apresentaram contagens elevadas para a maioria micro-organismos indicadores. O liquidificador foi identificado como a principal fonte de contaminação das FLIs reconstituídas, apresentando contagens elevadas de micro-organismos indicadores. A não conformidade aos pré-requisitos higiênico-sanitários durante o preparo da FLI reconstituída para lactentes, resulta em um produto microbiologicamente inadequado para crianças em estado de saúde debilitado.

Palavras-chave. fórmula infantil, leite, lactário, higiene, riscos microbiológicos.

ABSTRACT

The hygienic conditions in preparing the infant milk formula used in a public hospital milk dispensary were investigated by microbiological analyses of air, equipment, utensils, powdered and reconstituted infant dairy formula (IDF). Samples were collected from 10 different sampling points of six preparation batches. A total of 60 samples were analyzed for identifying and quantifying the indicative microorganisms as fecal coliforms, total Enterobacteriaceae, aerobic mesophilic and psychrotrophic microorganisms and pathogenic microorganisms as coagulase-positive *Staphylococcus*, *Bacillus cereus* and *Salmonella*. A high variation in the indicative microorganisms counting was observed, although no pathogenic agent was detected. All of the powdered IDF samples were appropriate for consumption according to the regulatory standard. However, the reconstituted IDF samples showed high counts of the majority of indicative microorganisms. Also, this study identified the blender as the main source for reconstituted IDF contamination, and from which the total Enterobacteriaceae and total aerobic mesophilic microorganisms were isolated. Non-compliance with the hygienic prerequisites during the preparation of the reconstituted IDF resulted in an inadequate product for children consumption.

Key words. infant formula, milk, lactary, hygiene, microbiological hazards.

INTRODUÇÃO

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) afetam o bem estar e a saúde de muitas pessoas todos os dias, apresentando maior severidade em pessoas com estado de saúde debilitado, como crianças hospitalizadas.

A maior parte das DTA que ocorrem no Brasil ainda não são notificadas e a identificação do agente etiológico ocorre em poucos dos casos descritos. Quando essas doenças ocorrem em ambiente hospitalar a gravidade é alta, podendo resultar em sérias complicações, sequelas e óbitos¹.

A contaminação dos alimentos servidos nos hospitais pode ocorrer durante o preparo, transporte, armazenamento e administração. A matéria-prima também pode ser uma fonte de contaminação, sendo necessário o controle higiênico sanitário, não apenas nos locais de manipulação, mas também na aquisição das matérias-primas².

As fórmulas infantis à base de leite são produtos, líquidos ou em pó, destinados à alimentação de crianças ou recém-nascidos, em substituição ao leite materno. No hospital, essas fórmulas são geralmente preparadas no lactário, unidade destinada ao preparo, higienização e distribuição das mamadeiras com leite e seus substitutos para alimentação de recém-nascidos e dos pacientes da pediatria³.

Atualmente estão disponíveis no mercado diversos tipos de fórmulas infantis em pó à base de leite, que foram elaboradas, a partir de leite de vaca e de outros mamíferos, visando à substituição do leite humano. Como as fórmulas infantis são, geralmente, as únicas fontes de nutrientes para crianças menores de um ano, internadas em hospitais, é de extrema importância que esses alimentos sejam adequados às necessidades nutricionais da criança e que sejam seguros microbiologicamente, uma vez que as infecções que ocorrem ao longo do primeiro ano de vida são as principais causas da elevação do índice de morbi-mortalidade entre os lactentes⁴.

Segundo a *American Public Health Association* (APHA), a microbiota típica do leite em pó é composta por micrococcos termodúricos, estreptococos termófilos e micro-organismos aeróbios formadores de esporos, como o *Bacillus cereus*. A presença de bactéria do grupo dos coliformes e bactérias psicrotróficas neste produto pode indicar contaminação pós-processamento, transmitida pelo ar, por equipamentos, por utensílios ou pelo manipulador⁵.

Os principais problemas microbiológicos relacionados com leite em pó e produtos derivados, como as fórmulas infantis em pó, ocorrem devido à contaminação acidental durante, ou após a reconstituição do produto⁶. A qualidade higiênico-sanitária das condições

de processamento pode ser monitorada pela análise de micro-organismos indicadores como a contagem de coliformes no produto pronto⁵.

Infecções severas associadas ao consumo de fórmulas infantis por crianças e bebês internados em hospitais e a detecção de micro-organismos da família *Enterobacteriaceae* nestes produtos têm sido relatadas por alguns autores^{7,8}.

O regulamento nº 2073/2005, da Comunidade Europeia, que dispõe sobre critérios microbiológicos aplicáveis aos gêneros alimentícios, destaca *Salmonella* e *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp) como os micro-organismos mais preocupantes em fórmulas para lactentes. A presença destes agentes patogênicos constitui um risco considerável, se as condições após a reconstituição das fórmulas permitirem a sua multiplicação. A análise da presença de membros da família *Enterobacteriaceae*, que inclui os agentes patogênicos citados, pode ser utilizada como um indicador do risco de ocorrência de micro-organismos patogênicos e como controle de rotina⁹.

A avaliação microbiológica do ambiente de preparo do alimento é importante para verificar a efetividade dos processos de higienização, determinar a presença de patógenos no ambiente e a qualidade microbiológica do ar ambiente que entra em contato com os alimentos⁵. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o preparo de FLI reconstituída, desde a sua reconstituição até a distribuição para o consumo, quanto aos aspectos microbiológicos.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada no lactário de um hospital público, onde são preparadas fórmulas infantis e sucos de frutas para bebês e crianças, que podem utilizar o serviço por apenas um dia ou permanecer no hospital por tempo indeterminado.

A FLI reconstituída foi preparada com até 24 horas de antecedência e armazenada sob refrigeração. A reconstituição da FLI em pó foi realizada com água esterilizada e a mistura foi homogeneizada em liquidificador e acondicionada em jarras plásticas para posterior posicionamento em mamadeiras esterilizadas. As mamadeiras prontas foram armazenadas sob refrigeração até o momento da distribuição, quando foram aquecidas em banho-maria. Tanto a temperatura de refrigeração quanto a de aquecimento não foram medidas, pois não eram controladas pelos manipuladores.

Para a coleta das amostras foram realizadas 06 visitas ao lactário e, a cada visita, foram coletadas amostras

do ar ambiente (02), da superfície de equipamentos e utensílios (03) e da FLI em pó e reconstituída (05), totalizando 60 amostras.

As amostras de ar foram coletadas em duplicata, dentro da sala de preparo, sobre a bancada, em dois pontos onde o ar entra em contato direto com o alimento: durante a etapa de mistura e homogeneização, e durante a etapa de envase das porções. Para essa coleta foi utilizada a técnica de sedimentação em ágar, na qual, segundo Evancho et al¹⁰, as placas ficam expostas durante 15 minutos.

O equipamento analisado foi o liquidificador, cuja amostra foi coletada do copo, através da técnica de lavagem com 100 mL de solução tampão fosfato estéril (pH 7,2). A solução foi agitada dentro do equipamento por 15 s visando a amostrar toda a área interna que entra em contato direto com o alimento. Para a coleta de amostras dos utensílios, foi utilizada a técnica de contato por esponja na jarra plástica e a técnica do *swab* na colher, ambas descritas em Evancho et al¹⁰.

As unidades amostrais da FLI em pó foram compostas de aproximadamente 50g, coletadas do mesmo lote utilizado no preparo da fórmula do dia, em sacos de polietileno estéreis, com o auxílio de uma espátula estéril. Para a FLI reconstituída foram coletadas 4 amostras das seguintes etapas de preparo: uma após o envase das porções, uma após o período de 24 horas de armazenamento sob refrigeração, uma após o aquecimento da FLI em banho-maria para a distribuição e uma após 2h da distribuição. As unidades amostrais foram compostas de aproximadamente 80 mL, envasadas em mamadeiras estéreis.

Para avaliar a qualidade microbiológica de todas as amostras foram realizadas contagens de micro-organismos aeróbios mesófilos totais, de acordo com Morton¹¹; contagem de enterobactérias totais, conforme Kornacki e Johnson¹²; e contagem de *Bacillus cereus*, segundo a metodologia descrita por Bennett e Belay¹³. Para as amostras da FLI em pó e da FLI reconstituída, foram realizadas ainda, determinações de coliformes a 35°C e coliformes a 45°C, pela técnica do Número Mais Provável (NMP), segundo Kornacki e Johnson¹²; de micro-organismos aeróbios psicotróficos totais, de acordo com Morton¹¹; de *Staphylococcus* coagulase positiva, conforme Silva et al¹⁴; e da presença de *Salmonella* spp segundo Andrews et al¹⁵. Para a quantificação de enterobactérias totais nas amostras de FLI foi utilizada a técnica do NMP.

Considerando o risco de presença de micro-organismos patogênicos como *E. sakazakii* em fórmulas infantis, colônias características de enterobactérias no ágar vermelho violeta bile glicose (colônias pequenas com centro violeta e halo de

precipitação de sais biliares), foram identificadas através de um sistema padronizado para a identificação de membros da família *Enterobacteriaceae*, o kit API 20E (bioMérieux).

RESULTADOS

Os resultados da análise microbiológica evidenciaram uma grande variação nas contagens dos micro-organismos indicadores, conforme apresentados nas Tabelas 1 e 2, porém *B. cereus*, *Salmonella* spp e *Staphylococcus* coagulase positiva não foram detectados em nenhuma das amostras.

Todas as amostras de ar ambiente apresentaram resultados negativos para as determinações realizadas (*B. cereus*, enterobactérias totais e micro-organismos mesófilos totais).

Na avaliação microbiológica das superfícies, observou-se que a colher foi o único utensílio que se apresentou adequadamente higienizado, com contagens de micro-organismos mesófilos totais abaixo do limite recomendado pelo Serviço de Saúde Pública dos Estados Unidos, que é de no máximo 100 UFC por utensílio¹⁰, e com ausência de enterobactérias totais, como pode ser observado na Tabela 1.

A jarra plástica utilizada para o acondicionamento da FLI reconstituída, apresentou contagens de micro-organismos mesófilos totais acima do limite recomendado pelo Serviço de Saúde Pública dos Estados Unidos (100 UFC/utensílio) na maioria dos lotes analisados, com um valor máximo de $3,1 \times 10^3$ UFC/cm², e contagens variadas de enterobactérias, com valores de até $9,6 \times 10^1$ UFC/cm² (Tabela 1).

As amostras do liquidificador apresentaram contagens de micro-organismos mesófilos totais muito acima do limite recomendado pelo Serviço de Saúde Pública dos Estados Unidos (100 UFC/equipamento), com valores entre $4,7 \times 10^3$ e $6,2 \times 10^7$ UFC/equipamento (Tabela 1). Contagens elevadas de enterobactérias, com valores de até $1,6 \times 10^7$ UFC/equipamento, também foram encontradas.

Os resultados obtidos para a FLI em pó mostraram que todas as amostras estavam adequadas para o consumo, de acordo com os limites especificados pela Resolução RDC nº12, de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)¹⁶, porém todas as amostras das FLI reconstituída apresentaram contagens elevadas em todos os lotes analisados, destacando-se as amostras do lote 5, no qual o maior valor encontrado para micro-organismos mesófilos totais foi de $5,7 \times 10^7$ UFC/mL para a FLI, após 2h da distribuição (Tabela 2).

Tabela 1. Contagem de micro-organismos indicadores nas superfícies do equipamento e dos utensílios utilizados no preparo da Fórmula Láctea Infantil reconstituída

Análises	Lotes de preparação					
	1	2	3	4	5	6
Micro-organismos mesófilos totais						
Colher (UFC/utensílio)	< 10	< 10	4,0 x 10 ¹	< 10	< 10	< 10
Jarra plástica (UFC/cm ²)	3,1 x 10 ²	2,2 x 10 ²	3,1 x 10 ³	< 0,2	< 0,2	4,5 x 10 ¹
Liquidificador (UFC/equipamento)	4,7 x 10 ³	5,9 x 10 ⁶	5,8 x 10 ⁶	9,6 x 10 ⁶	1,1 x 10 ⁷	6,2 x 10 ⁷
Enterobactérias totais						
Colher (UFC/utensílio)	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Jarra plástica (UFC/cm ²)	1,1	0,4	9,6 x 10 ¹	< 0,2	< 0,2	< 0,2
Liquidificador (UFC/equipamento)	< 1	< 1	6,4 x 10 ⁴	6,0 x 10 ⁶	3,7 x 10 ⁶	1,6 x 10 ⁷

UFC = Unidade Formadora de Colônia

Tabela 2. Contagem de micro-organismos indicadores na Fórmula Láctea Infantil em pó e reconstituída

Análises	Lotes de preparação					
	1	2	3	4	5	6
Micro-organismos mesófilos totais						
FLI em pó (UFC/g)	NA	NA	< 10	< 10	< 10	< 10
FLI após envase (UFC/mL)	NA	NA	2,6 x 10 ⁴	2,7 x 10 ⁴	1,1 x 10 ⁵	4,3 x 10 ⁴
FLI após 24h de refrigeração (UFC/mL)	NA	NA	2,8 x 10 ⁴	3,5 x 10 ⁵	4,9 x 10 ⁷	1,6 x 10 ⁵
FLI após aquecimento (UFC/mL)	NA	NA	1,7 x 10 ²	2,7 x 10 ⁵	5,4 x 10 ⁷	1,1 x 10 ⁵
FLI após 2h da distribuição (UFC/mL)	NA	NA	2,1 x 10 ²	2,8 x 10 ⁵	5,7 x 10 ⁷	3,2 x 10 ⁴
Micro-organismos aeróbios psicrotróficos totais						
FLI em pó (UFC/g)	NA	NA	NA	NA	NA	NA
FLI após envase (UFC/mL)	NA	1,6 x 10 ²	2,9 x 10 ²	3,4 x 10 ²	6,4 x 10 ³	1,8 x 10 ²
FLI após 24h de refrigeração (UFC/mL)	1,4 x 10 ⁴	8,0 x 10 ²	1,2 x 10 ⁴	1,2 x 10 ⁴	4,9 x 10 ⁶	2,1 x 10 ⁴
FLI após aquecimento (UFC/mL)	1,2 x 10 ³	< 10	< 10	1,7 x 10 ¹	2,5 x 10 ⁵	< 10
FLI após 2h da distribuição (UFC/mL)	NA	< 10	< 10	1,2 x 10 ¹	4,7 x 10 ⁵	< 10
Enterobactérias totais						
FLI em pó (NMP/g)	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
FLI após envase (NMP/mL)	< 3	> 1100	> 1100	> 1100	> 11000	11000
FLI após 24h de refrigeração (NMP/mL)	> 1100	> 1100	150	> 1100	> 11000	11000
FLI após aquecimento (NMP/mL)	> 1100	> 1100	23	> 1100	> 11000	2400
FLI após 2h da distribuição (NMP/mL)	> 1100	> 1100	43	> 1100	> 11000	2400
Coliformes totais						
FLI em pó (NMP/g)	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
FLI após envase (NMP/mL)	23	> 1100	< 3	> 1100	> 1100	4600
FLI após 24h de refrigeração (NMP/mL)	> 1100	> 1100	< 3	> 1100	> 1100	11000
FLI após aquecimento (NMP/mL)	9	1100	< 3	> 1100	> 1100	23
FLI após 2h da distribuição (NMP/mL)	9	460	< 3	> 1100	> 1100	93

FLI = Fórmula Láctea Infantil NA = Não analisado UFC = Unidade Formadora de Colônia NMP = Número Mais Provável

A quantificação de micro-organismos aeróbios mesófilos totais nas amostras de FLI não foi realizada inicialmente (lotes 1 e 2) por não estar preconizada pela RDC nº12/2001, porém, a partir dos resultados iniciais, consideramos que essa avaliação poderia auxiliar na caracterização microbiológica deste produto.

DISCUSSÃO

Apesar do método de sedimentação ser pouco preciso na avaliação da qualidade do ar de um ambiente, ele reproduz a real deposição dos micro-organismos presentes no ar daquele ambiente durante o tempo em que o alimento fica exposto. Assim, podemos observar que o ar do lactário em estudo apresentou boas condições microbiológicas, uma vez que não apresentou contagem para nenhum dos micro-organismos analisados.

As elevadas contagens de micro-organismos indicadores observadas nas amostras da FLI reconstituída mostram claramente a ocorrência de falhas na manipulação e/ou na higienização dos equipamentos e utensílios utilizados em tal processo, uma vez que a matéria-prima (FLI em pó) mostrou-se microbiologicamente adequada ao consumo.

Os resultados obtidos para as contagens de micro-organismos indicadores nas amostras da jarra plástica, indicam que este utensílio é uma fonte potencial de contaminação. A jarra plástica também foi indicada como um ponto crítico por Alicia et al, citados por Salles e Goulart¹⁷.

O liquidificador se destacou como uma fonte potencial de contaminação, principalmente nos lotes 4, 5 e 6, quando as amostras da FLI reconstituídas também apresentaram as maiores contagens de enterobactérias, como pode ser observado na Tabela 2.

Nossos resultados corroboram com o trabalho realizado em um hospital público de Uberlândia/MG¹⁸, onde foi encontrada uma contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos de $1,7 \times 10^8$ UFC/equipamento, no liquidificador utilizado no preparo dessas FLIs. Almeida et al¹⁹ também encontraram micro-organismos aeróbios mesófilos, com valor médio de $1,3 \times 10^2$ UFC/cm², no liquidificador de um lactário em Salvador/BA.

A Resolução RDC nº12/2001 não estabelece padrão microbiológico para contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos totais para a fórmula infantil estudada. Segundo o *Compliance Program Guidance Manual* da FDA (Food and Drug Administration)²⁰, a quantidade máxima aceitável para mesófilos totais em fórmula infantil é de

10.000 células por g ou mL de alimento. Analisando as contagens da Tabela 2 pode-se verificar que a maioria das amostras da FLI reconstituída apresentou contagens superiores a esse limite.

Em hospitais de Salvador/BA, Almeida et al¹⁹ também observaram um aumento na contagem de aeróbios mesófilos totais, em até dois ciclos logarítmicos, quando a fórmula em pó era reconstituída, e destacaram os utensílios como uma das principais causas desta contaminação.

Para os micro-organismos indicadores do grupo das enterobactérias, dos coliformes totais e dos psicotróficos é possível observar que houve um declínio na contagem após a etapa de aquecimento em banho-maria, e este foi mais acentuado para o grupo dos micro-organismos psicotróficos por serem mais sensíveis ao aumento de temperatura. No entanto, essa redução não foi observada para todos os lotes, o que pode ser explicado pela falta de padronização e controle do tempo e da temperatura de aquecimento da FLI em banho-maria, antes da distribuição. É necessário estabelecer valores de tempo e temperatura adequados para que o tratamento térmico seja eficiente.

Para os micro-organismos psicotróficos totais pode-se observar um aumento na contagem após as 24h de refrigeração. Esse aumento pode ser decorrente do aumento da temperatura do refrigerador, em função da frequente abertura das suas portas, fato que foi observado durante a coleta das amostras. Segundo ANVISA²¹, a temperatura segura indicada para o armazenamento de produtos prontos, sob refrigeração, é de 5°C.

A resolução RDC nº12/2001 estabelece como limite máximo aceitável para o alimento em estudo, o valor de 10 coliformes a 35°C/mL de amostra indicativa¹⁶, porém a maior parte das amostras analisadas apresentou valores superiores ao limite máximo aceitável, mostrando que a FLI reconstituída se encontrava em condições higiênico-sanitárias insatisfatórias em pelo menos uma amostra por lote analisado.

No estudo realizado por Salles e Goulart¹⁷ foi detectado que mais de 50% das amostras de preparações lácteas, de lactários hospitalares, apresentaram contagens de coliforme totais acima dos padrões de referência utilizados pelos autores.

Não existe um padrão estabelecido para a contagem de enterobactérias em produtos como a FLI, mas, considerando a relação direta entre a quantidade de enterobactérias e a de coliformes totais, pode-se dizer que as quantidades encontradas estão bem acima

das quantidades permitidas para coliformes totais, segundo RDC nº12/2001. A presença de enterobactérias e de coliformes totais em uma amostra de alimento processado indica contaminação pós-sanitização ou pós-processamento, evidenciando práticas inadequadas de limpeza e sanitização¹⁴.

Apesar de todas as amostras da FLI reconstituída do lote 3 apresentarem contagem de enterobactérias, essas amostras apresentaram contagens de coliformes totais inferiores a 3 NMP/mL. Isso revela que a contagem de enterobactérias pode ser mais eficiente para a indicação de condições higiênico-sanitárias de alimentos como a FLI. Atualmente, alguns laboratórios preferem quantificar enterobactérias totais ao invés de coliformes, a fim de incluir possíveis patógenos não fermentadores de lactose²².

Um estudo realizado por Estuningsih et al²³ também avaliou a presença de enterobactérias em fórmula infantil e, das 74 amostras analisadas, 35 apresentaram resultado positivo para a presença de enterobactérias.

As culturas de enterobactérias isoladas, tanto de amostras do liquidificador quanto das fórmulas infantis reconstituídas foram identificadas utilizando-se o kit API 20E (bioMérieux), com uma taxa de identificação acima de 80%, como *Enterobacter asburiae* e *Enterobacter cloacae*. A espécie *E. asburiae* foi encontrada nos três primeiros lotes e a espécie *E. cloacae* nos três últimos lotes. O isolamento de *E. cloacae*, tanto da FLI reconstituída quanto do liquidificador, como observado no lote 6, indica que este equipamento é a principal fonte de contaminação da FLI reconstituída. Bar-Oz et al²⁴ verificaram que o liquidificador utilizado na reconstituição de fórmula láctea foi fonte de *E. sakazakii* em infecções de recém-nascidos. Espécies do gênero *Enterobacter* como *E. cloacae* e *E. sakazakii* já foram isoladas de fórmulas infantis por outros autores^{4, 23, 25}.

As bactérias do gênero *Enterobacter* têm sido consideradas importantes patógenos oportunistas nos últimos anos e a espécie *E. cloacae* é uma das espécies mais relacionadas com infecção hospitalar²⁶ e é um dos principais agentes de infecção hospitalar em unidades neonatais²⁷. Kuboyama et al²⁸ reportaram uma elevada taxa de mortalidade, devido à infecção sistêmica causada por *E. cloacae*, em uma unidade de terapia intensiva neonatal. Assim, a presença de *E. cloacae* em alimentos destinados a lactentes como a FLI é preocupante. Nenhuma das amostras analisadas

neste estudo apresentou presença de *Bacillus cereus*, *Salmonella* ou *Staphylococcus* coagulase positiva e a contagem para o grupo dos coliformes a 45°C (fecais ou termotolerantes) foi menor do que 3 NMP/mL.

No trabalho realizado por Salles e Goulart¹⁷, 41,6% das amostras de FLI reconstituída apresentaram contaminação por coliformes fecais, e Rowan et al²⁹ isolaram *B. cereus* de 17% de 100 amostras de fórmula infantil reconstituída, com uma contagem máxima de $4,8 \times 10^2$ UFC/mL.

A não detecção dos micro-organismos patogênicos pesquisados (coliformes com crescimento a 45°C, *Salmonella*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus* coagulase positiva) nas amostras analisadas neste estudo não diminui o risco que as fórmulas lácteas infantis reconstituídas representam, uma vez que as elevadas contagens de micro-organismos indicadores observadas demonstram a possibilidade de contaminação das fórmulas lácteas infantis, com micro-organismos patogênicos durante sua reconstituição.

CONCLUSÃO

As elevadas contagens de micro-organismos indicadores nas FLIs reconstituídas prontas para o consumo, obtidas de FLI em pó microbiologicamente seguras, demonstraram que a contaminação ocorre durante a reconstituição do produto, devido, principalmente, às falhas na higienização de equipamentos. O aumento das contagens de micro-organismos indicadores pode ser favorecido pelo armazenamento da FLI reconstituída em temperaturas inadequadas. As não conformidades, aos requisitos higiênico-sanitários, constatadas pela higienização inadequada de equipamento e utensílios e pela falta de controle de temperaturas durante o preparo da FLI para lactentes, resultou em um produto microbiologicamente inseguro para crianças, principalmente para aquelas em estado de saúde debilitado.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela bolsa de mestrado concedida.
À FAPESP pelo apoio financeiro

REFERÊNCIAS

1. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. Vigilância ativa das doenças transmitidas por alimentos – Normas e instruções. São Paulo: Centro de Vigilância Epidemiológica; 2002.
2. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Pediatria: Prevenção e controle de infecção hospitalar. Brasília: Editora Anvisa; 2006.
3. Mezomo IF. Serviço de nutrição e dietética. São Paulo: União Social Camiliana; 1987. Lactário; p.115-37.
4. Santos RFS. Ocorrência de *Enterobacter sakazakii* em fórmulas infantis para lactentes em hospitais e maternidades da região de Campinas/SP [dissertação de Mestrado]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas – Faculdade de Engenharia de Alimentos; 2006.
5. American Public Health Association (APHA). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of foods. 3ª ed. Washington: APHA; 1992.
6. International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). Microorganisms in Food. 6 v. Maryland: Aspen Publishers; 2000. Microbial Ecology of food commodities; p.541-44.
7. Van Acker J et al. Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter sakazakii* in powdered milk formula. *J Clin Microbiol*. 2001; 39: 293-7.
8. Iversen C and Forsythe S. Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other Enterobacteriaceae from powdered infant formula milk and related products. *Food Microbiol*. 2004; 21: 771-7.
9. Comunidade Europeia (CE). Regulamento Nº 2073/2005 de 15 de Novembro de 2005, Critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. *Jornal Oficial [da] União Europeia*. [acesso em 22 dez.2005]. Disponível em [<http://eur-lex.europa.eu/JOYear.do?year=2005>]. Data de acesso: 25/03/2007.
10. Evancho GM, Sveum WH, Moberg LJ, Frank JF. Microbiological Monitoring of the Food Processing Environment. In: APHA (American Public Health Association). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4 ed. Washington: APHA; 2001. p.25-36.
11. Morton RD. Aerobic Plate Count. In: APHA (American Public Health Association). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4 ed. Washington: APHA; 2001. p. 63-8.
12. Kornacki JL, Johnson JL. Enterobacteriaceae, Coliforms, and *Escherichia coli* as Quality and Safety Indicators. In: APHA (American Public Health Association). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4ª ed. Washington: APHA; 2001. p. 69-82.
13. Bennett RW, Belay N. *Bacillus cereus*. In: APHA (American Public Health Association). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4ª ed. Washington: APHA; 2001. p. 311-6.
14. Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA. Manual de métodos de Análise Microbiológica de Alimentos. São Paulo: Varela; 1997, p.53-8.
15. Andrews HW, Flowers RS, Silikers J, Bailey SJ. Salmonella. In: APHA (American Public Health Association). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4ª ed. Washington: APHA; 2001. p. 357-80.
16. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. *Diário Oficial [da] União*. Brasília, DF, 2 jan 2001. Seção 1.
17. Salles RK, Goulart R. Diagnóstico das condições higiênico-sanitárias e microbiológicas de lactários hospitalares. *Rev Saúde Pública*. 1997; 31(2):131-9.
18. Muniz CK. Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle em dietas enterais manipuladas em Hospital Universitário Público do Brasil [dissertação de Mestrado]. Uberlândia: Biblioteca Digital da Universidade Federal de Uberlândia; 2005.
19. Almeida RCC, Matos CO, Almeida PF. Implementation of a HACCP system for on-site hospital preparation of infant formula. *Food Control*. 1999; 10: 181-97.
20. U.S. Department of Health and Human Service food and Drug Administration (FDA). Compliance Program Guidance Manual. EUA. 2006, 31. Food Composition, Standards, Labeling and Economics. 31 July 2006.
21. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº216 de 15 de setembro de 2004. Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. *Diário Oficial [da] União*. Brasília, DF, 16 set 2004. Seção 1.
22. Franco BDGM, Landgraf M. Microbiologia dos Alimentos. São Paulo: Atheneu; 2008, p.28
23. Estuningsih S, Kress C, Hassan AA, Akineden O, Schneider E, Usleber E. Enterobacteriaceae in dehydrated powdered infant formula manufactured in Indonesia and Malaysia. *J Food Prot*. 2006; 69(12): 3013-17.
24. Bar-Oz B, Preminger A, Peleg O, Block C, Arad I. *Enterobacter sakazakii* infection in the newborn. *Acta Paediatr*. 2001; 90(3): 356-8.
25. Shaker R, Osaili T, Al-Omary W, Jaradat Z, Mahmoud A. Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacter* spp from food and food production environments. *Food Control*. 2007; 18(10): 1241-5.
26. Sanders WEJ, Sanders CC. *Enterobacter* spp.: Pathogens Poised to Flourish at the Turn of the Century. *Clin Microbiology Rev*. 1997; 10(2): 220-41.
27. Talon D, Menget P, Thouverez M, Thiriez G, Gbaguidi HH, Fromentin C et al. Emergence of *Enterobacter cloacae* as a common pathogen in neonatal units: pulsed-field gel electrophoresis analysis. *J Hosp Infect*. 2004; 57(2): 119-25.
28. Kuboyama RH, Oliveira HB, Moretti-Branchini ML. Molecular epidemiology of systemic infection caused by *Enterobacter cloacae* in a high-risk neonatal intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2003; 24(7): 490-94.
29. Rowan NJ, Anderson JG, Anderton A. Bacteriological quality of infant milk formulae examined under a variety of preparation and storage conditions. *J Food Prot*. 1997; 60(9). 1089-94.

Avaliação microbiológica da polpa de cajá conservada por métodos combinados

Microbiological evaluation of the yellow mombin pulp preserved by combined methods

RIALA6/1322

Leônidas Francisco de Queiroz TAVARES FILHO^{1*}, Rossana Catie Bueno de GODOY², Elisa TESHIMA³, Ricardo Luís CARDOSO¹, Paloma Romeiro Sampaio BARBOSA⁴, Dimitri Neiva Lemos de SANTANA⁴

*Endereço para correspondência: Rua Profº Antônio Luiz M. Eloy, 113 A (1º andar), Primavera, Cruz das Almas, BA, Brasil. CEP 44.380-000. E-mail: leonidas76@gmail.com

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias, Centro de Ciências Agrárias, Biológicas e Ambientais, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Cruz das Almas, BA, Brasil

²Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Florestas, Colombo, PR, Brasil

³Departamento de Tecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Feira de Santana, BA, Brasil

⁴Laboratório de Qualidade de Alimentos (LABOTEC II), Departamento de Tecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Feira de Santana, BA, Brasil

Recebido: 28.09.2010 – Aceito para publicação: 29.12.2010

RESUMO

Neste estudo foi avaliada a estabilidade microbiológica da polpa de cajá conservada por métodos combinados e armazenada em temperatura ambiente por um período de 90 dias. A análise foi realizada por meio de determinações do número mais provável (NMP) de coliformes termotolerantes, contagem de bolores e leveduras e pesquisa de *Salmonella* spp. O delineamento foi inteiramente randomizado em esquema fatorial de 4 x 2 x 4 (tratamentos x processamento x tempo) com cinco repetições. Os processamentos de polpa sem pasteurização e polpa pasteurizada (90-93°C/15min) foram combinados aos tratamentos: controle, metabissulfito de sódio (200 ppm), benzoato de sódio (500 ppm) e metabissulfito (200 ppm) + benzoato (500 ppm). O produto mostrou estar de acordo com a regulamentação técnica da legislação brasileira, que estabelece os padrões de identidade e qualidade para polpa de cajá, quanto aos limites microbiológicos. Com exceção das polpas sem pasteurizar, controle e combinada com benzoato de sódio, os demais tratamentos combinados promoveram o controle de bolores e leveduras da polpa durante o período avaliado. Entre estes, a formulação da polpa pasteurizada combinada com metabissulfito de sódio, apresentou maior eficácia no controle da carga fúngica com manutenção do produto apto ao consumo aos 90 dias.

Palavras-chave. *Spondias mombin* L., conservação de alimentos, coliformes, *Salmonella* spp, tecnologia de obstáculos.

ABSTRACT

This work assessed the microbiological stability of the yellow mombin pulp preserved by combined methods stored at room temperature for a storage period of 90 days. The most probable number of thermotolerant coliforms, mould and yeast counting and *Salmonella* spp isolation were carried out. The experiment was in a completely randomized factorial scheme in 4 x 2 x 4 (treatments x processing x time) design with five replicates. Pulp processed without pasteurization and those pasteurized pulps (90-93°C/15 min) were combined to the treatments: control, sodium metabisulfite (200 ppm), sodium benzoate (500 ppm), sodium and metabisulfite (200 ppm) + sodium benzoate (500 ppm). The analyzed product was in agreement with the technical regulation of Brazilian Laws, which establishes the identity and quality standards for yellow mombin pulp regarding to the microbiological limits. Excluding the pulps without pasteurization, the control and the combined with sodium benzoate, all of the other combined treatments promoted the control of mould and yeast in the pulp during the evaluation period. Among them, the formulation of pasteurized pulp combined with sodium metabisulfite showed highest efficacy in controlling fungal loads, maintaining the product for proper consumption at 90 days.

Key words. *Spondias mombin* L., food preservation, faecal coliforms, *Salmonella* spp, hurdle technology

INTRODUÇÃO

O mercado de frutas processadas está em franca expansão. Atualmente, o Brasil é um dos três maiores produtores de frutas do mundo. Sua produção superou 43 milhões de toneladas em 2008, o que representa 5% da produção mundial¹.

Os incentivos ao desenvolvimento da fruticultura nacional surgem da consciência do potencial econômico que o setor encerra, da sua viabilidade e expansão do mercado internacional de frutas frescas e sucos. Além desses fatores, a grande diversificação associada à qualidade dos frutos permite desenvolver pesquisas com vistas à geração de novos produtos².

O cajá (*Spondias mombin* L.), também denominado de taperebá e cajá-mirim, é um fruto nuculânio perfumado com mesocarpo carnoso, amarelo, contendo carotenóides, açúcares, vitaminas A e C. A procura pelos frutos da cajazeira deve-se principalmente às boas características para a industrialização, aliadas ao aroma e seu sabor agrídoce. A polpa de cajá é utilizada na fabricação de sorvetes, geleias, polpas congeladas, produção de bebidas alcoólicas e consumo *in natura*, despertando interesse não apenas para o mercado regional, mas também para outros locais do país, onde a fruta é escassa^{3,4}.

As polpas de fruta têm grande importância como matéria-prima em indústrias de conservas de frutas, que podem produzi-las nas épocas de safra, armazená-las e reprocessá-las para doces em massa, geleias e néctares nos períodos mais propícios, ou segundo a demanda do mercado consumidor⁵.

Para ampliar cada vez mais este mercado é necessário atender o apelo entre os consumidores por produtos funcionais, alimentos práticos e de qualidade. Neste caso, a qualidade engloba os aspectos físicos, químicos, microbiológicos, nutricionais e sensoriais.

A microbiologia é fator essencial na avaliação da qualidade de alimentos processados e, de acordo com Franco e Landgraf⁶, os micro-organismos que desempenham papel importante na produção de alimentos podem ser classificados em deteriorantes (promove alterações sensoriais prejudiciais como consequência da atividade metabólica natural), patogênicos (representam risco à saúde podendo afetar o homem e os animais) e micro-organismos que causam alterações benéficas nos alimentos modificando suas características originais, de modo a transformá-los em um novo alimento.

Dentre os principais micro-organismos potencialmente patogênicos encontrados em vegetais estão a *Salmonella* spp e *Escherichia coli*, ambos associados à contaminação fecal⁷. Para Siqueira⁸, os coliformes diferenciam-se em coliformes totais e coliformes fecais, nos quais o índice de coliformes totais é utilizado para avaliar as condições higiênicas, sendo que altas contagens significam contaminação pós-processamento, limpeza e sanificação deficientes, tratamentos térmicos ineficientes ou multiplicação durante o processamento e estocagem. Já os coliformes fecais/termotolerantes, cujo principal componente é *Escherichia coli*, relacionam-se às condições higiênico-sanitárias e conferem melhor indicação da presença de matéria fecal e da eventual presença de enteropatógenos, quando comparados aos coliformes totais⁶.

A estabilidade e a segurança dos alimentos são baseadas em muitos fatores, os quais visam evitar a multiplicação dos micro-organismos contaminantes, impedindo a deterioração e a veiculação de doenças de origem alimentar^{9,10}. Entre esses fatores podem ser destacados aqueles relacionados com as características do alimento (fatores intrínsecos) e os relacionados com o ambiente em que o alimento se encontra (fatores extrínsecos). São considerados fatores intrínsecos a atividade de água, a acidez (pH), o potencial de oxirredução, a composição química, a presença de fatores antimicrobianos naturais e as interações entre os micro-organismos presentes nos alimentos⁶.

Estes fatores, separada e/ou conjuntamente, funcionam como barreiras para impedir que os micro-organismos encontrem condições favoráveis ao seu desenvolvimento e/ou à produção de toxinas. Deste modo, combinando-se intensidade e tipo de obstáculo com o produto adequado pode-se promover a estabilidade microbiológica necessária para a segura comercialização. Das interações entre os fatores extrínsecos e intrínsecos originou o conceito dos obstáculos de Leistner (Hurdle Technology); a tecnologia dos obstáculos ou dos métodos combinados é um conceito amplamente empregado no processamento de alimentos e consiste em um conjunto de técnicas aplicadas simultaneamente, visando a estabilização bioquímica e microbiológica do produto em escala industrial^{11,12,13}.

A aplicação da tecnologia por emprego de métodos combinados é utilizada como técnica alternativa à refrigeração, congelamento, desidratação e outros procedimentos que, geralmente, necessitam de alto investimento em equipamentos e ainda consomem muita energia¹⁴.

O objetivo do trabalho foi avaliar a estabilidade microbiológica da polpa de cajá conservada por métodos combinados e armazenada em temperatura ambiente por um período de 90 dias.

MATERIAL E MÉTODOS

Matéria-prima

Foram utilizados frutos da cajazeira adquiridos diretamente de produtores do município de Muritiba, Bahia. O processamento foi realizado na Planta-piloto de Processamento de Frutas do Laboratório de Ciência e Tecnologia de Alimentos (LCTA) da Embrapa Mandioca e Fruticultura, em Cruz das Almas, Bahia.

Processamento

A matéria-prima foi encaminhada para a Planta-piloto do LCTA da Embrapa onde iniciou-se o seu processamento, conforme descrito em fluxograma (Figura 1). Foi pré-lavada em água corrente e selecionada, de

acordo com seus atributos de qualidade: grau de maturação e isenção de doenças. Após nova pesagem, realizou-se a sanitização com hipoclorito de sódio (NaOCl) e lavagem por imersão em água clorada a 100 ppm de cloro ativo por 20 minutos. Em seguida, os frutos foram novamente lavados em água corrente para retirar o excesso de cloro, branqueados a 100°C por 60 segundos e despulpados utilizando despulpadeira elétrica.

Após extração da polpa utilizou-se peneira doméstica com malha fina de náilon, visando o refinamento, para a retirada das impurezas (fibras, pedaços de semente etc.), com a finalidade de melhorar o seu aspecto visual.

Foram utilizados dois tipos de processamentos (polpa sem pasteurizar e polpa pasteurizada) combinados aos aditivos químicos que compuseram os quatro tratamentos: controle (testemunha), metabissulfito de sódio, benzoato de sódio e metabissulfito de sódio + benzoato de sódio, resultando em oito formulações. As concentrações dos conservantes utilizados foram estabelecidas conforme legislação brasileira¹⁵.

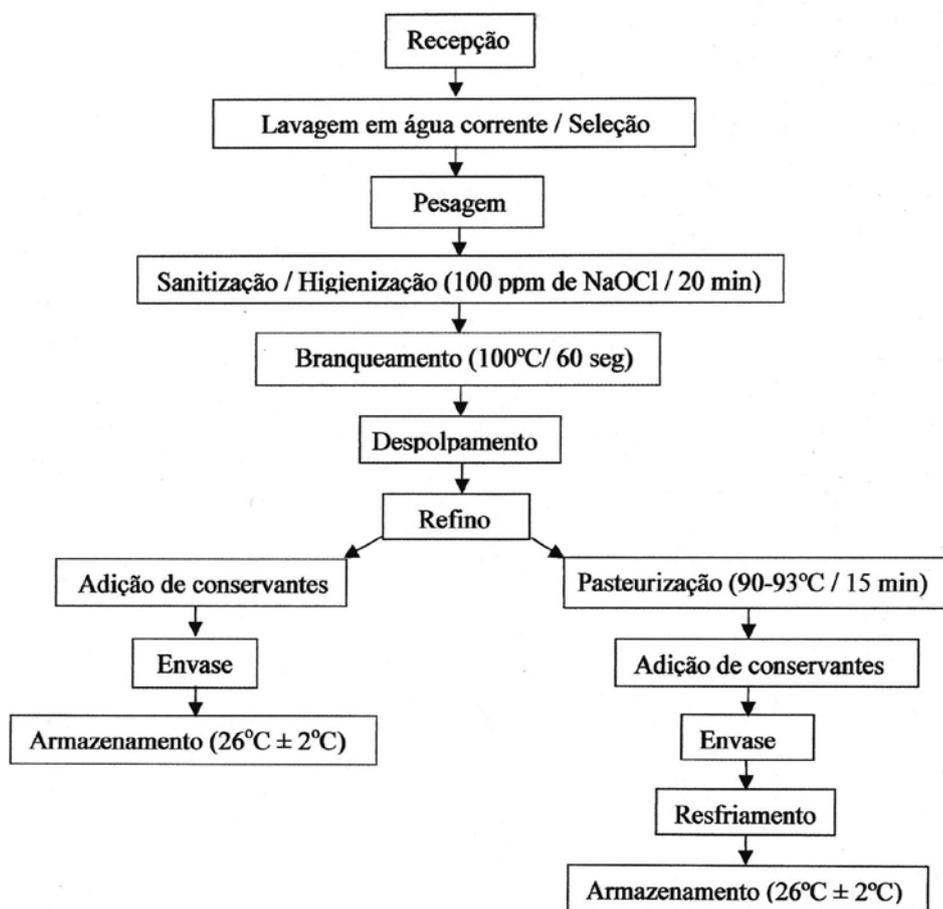


Figura 1. Fluxograma de processamento da polpa de cajá por métodos combinados

No processamento para polpa de cajá pasteurizada utilizou-se tacho aberto, onde a polpa permaneceu em banho-maria até alcançar a temperatura de 90-93°C no centro do tacho, ficando sob essa temperatura por mais 15 minutos. As amostras foram acondicionadas em potes de poliestireno (120 mL), previamente higienizados com solução de cloro (100 ppm) e solução de álcool 70°GL. Posteriormente, as amostras foram pesadas e resfriadas.

Análise microbiológica

As amostras de polpas envasadas foram enviadas para o Laboratório de Qualidade de Alimentos (LABOTEC II) da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), em Feira de Santana, Bahia, onde foram realizadas as análises microbiológicas. As amostras ficaram armazenadas sob temperatura ambiente de 26°C ± 2°C até a realização das análises.

As análises microbiológicas para determinação do NMP de coliformes a 45°C, contagem de bolores e leveduras e pesquisa de *Salmonella* spp foram realizadas de acordo com a metodologia descrita no APHA¹⁶.

Delineamento experimental

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado no esquema fatorial 4 x 2 x 4 (tratamentos x processamento x tempo), tratamentos com cinco repetições para cada variável. As análises foram realizadas por um período de 90 dias em intervalos regulares de 30 dias de armazenamento. Os dados foram submetidos a análises de variância e ajustaram-se equações de regressão linear para as médias dos tratamentos no tempo, utilizando-se o programa estatístico SAS¹⁷. O critério para a escolha do modelo foi definido por meio da significância do teste F ($p < 0,05$) e do maior valor de coeficiente de determinação (R^2), segundo Gomes¹⁸.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Determinação do NMP de coliformes a 45°C e Pesquisa de *Salmonella* spp

A análise microbiológica da polpa de cajá indicou que durante o período de avaliação, o produto estava em conformidade com a legislação vigente, com índices de coliformes fecais ($< 0,3$ NMP g^{-1}) e *Salmonella* spp (ausente) em todos os tratamentos disponíveis, com exceção do tratamento controle sem pasteurizar, conforme Tabela 1.

Os resultados encontrados estão de acordo com os padrões exigidos para a categoria: frutas, produtos de frutas e similares, da Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)¹⁹, e do regulamento técnico geral para a fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para polpa de fruta do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), através da Instrução Normativa nº 01, de 7 de janeiro de 2000²⁰, que estabelecem um número máximo de 2×10^2 NMP/g (ANVISA), e $1.g^{-1}$ (MAPA) de coliformes a 45°C e ausência de *Salmonella* spp $25.g^{-1}$, para polpas de frutas concentradas ou não, com ou sem tratamento térmico, refrigeradas ou congeladas.

Resultados semelhantes foram obtidos por Nascimento et al²¹, que avaliando polpas de frutas comercializadas *in natura* não detectaram a presença de *Salmonella* spp em nenhuma das amostras analisadas. Borges et al²² avaliando polpas de frutas de acerola, goiaba, graviola e manga, também registraram a ausência de *Salmonella* spp e de coliformes fecais durante o período de armazenamento. O resultado dos tratamentos combinados pode ser atribuído às condições higiênico-sanitárias satisfatórias durante o processamento, atestando a sanidade do produto.

Contagem de bolores e leveduras

De acordo com os valores obtidos para bolores e leveduras (Figuras 2a e 2b), com exceção dos tratamentos controle e benzoato de sódio de polpa sem pasteurizar, todas as amostras submetidas aos demais tratamentos se mantiveram dentro dos padrões microbiológicos, exigidos pela Instrução Normativa do MAPA²⁰, que estabelece $2 \times 10^3.g^{-1}$ para polpa conservada quimicamente e/ou que sofreu tratamento térmico, durante o período avaliado. A mais recente resolução da ANVISA que regulamenta os padrões microbiológicos para alimentos, RDC nº 12, não estabelece limites máximos para bolores e leveduras¹⁹. As curvas foram estimadas de acordo com a equação que melhor explicou a variação existente entre os tratamentos (Tabela 2).

O tratamento controle não pasteurizado apresentou contaminação no início das atividades laboratoriais, extrapolando o limite estabelecido pela legislação do MAPA, impossibilitando as análises microbiológicas. Condição contrária foi observada no processamento de polpa pasteurizada, em que as contagens, embora tenham variado ao longo da armazenagem, não ultrapassaram o limite estabelecido.

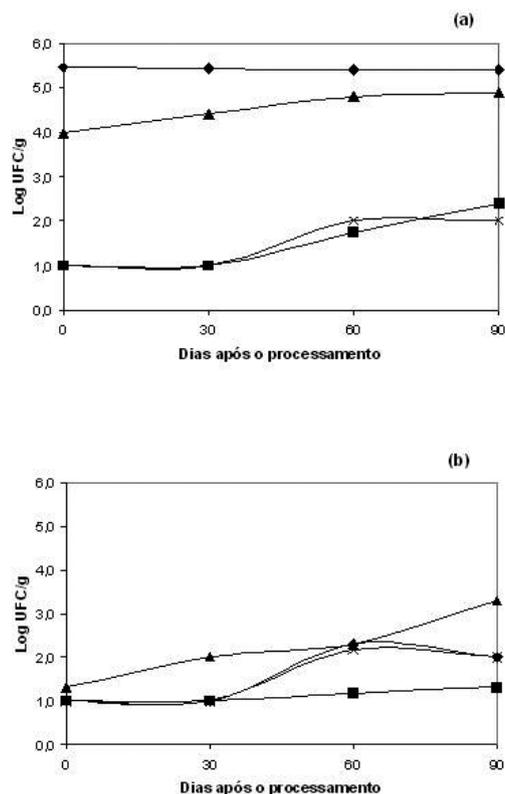
Este comportamento pode ser atribuído à eficácia do tratamento térmico para alguns tipos de fungos sensíveis a temperaturas elevadas. Borges et al²² obtiveram resultados semelhantes com polpa de frutas, para as quais verificaram redução da carga de bolores e leveduras, quando utilizaram o processamento térmico do branqueamento. Da mesma maneira, Furtado et al²³, trabalhando com

polpa de goiaba, observaram a diminuição da quantidade de fungos filamentosos e leveduras com o emprego da pasteurização. Deve-se ressaltar que muitas vezes o uso de temperaturas mais elevadas afeta as características físico-químicas do produto, portanto, devem-se associar outros métodos como os cuidados higiênico-sanitários durante o processamento.

Tabela 1. Qualidade microbiológica das polpas de cajá conservadas em temperatura ambiente por métodos combinados no período de 90 dias de armazenamento

		Tratamento testemunha							
Análises	Dias Após Processamento (DAP)								
	0		30		60		90		
	PSP	PP	PSP	PP	PSP	PP	PSP	PP	
Coliformes a 45°C (NMP g ⁻¹)	ND	< 0,3	ND	< 0,3	ND	< 0,3	ND	< 0,3	
<i>Salmonella</i> spp	ND	ausente	ND	ausente	ND	ausente	ND	ausente	
		Tratamento metabissulfito de sódio (200 ppm)							
Análises	Dias Após Processamento (DAP)								
	0		30		60		90		
	PSP	PP	PSP	PP	PSP	PP	PSP	PP	
Coliformes a 45°C (NMP g ⁻¹)	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	
<i>Salmonella</i> spp	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
		Tratamento benzoato de sódio (500 ppm)							
Análises	Dias Após Processamento (DAP)								
	0		30		60		90		
	PSP	PP	PSP	PP	PSP	PP	PSP	PP	
Coliformes a 45°C (NMP g ⁻¹)	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	
<i>Salmonella</i> spp	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	
		Tratamento metabissulfito de sódio + benzoato de sódio (200 ppm + 500 ppm)							
Análises	Dias Após Processamento (DAP)								
	0		30		60		90		
	PSP	PP	PSP	PP	PSP	PP	PSP	PP	
Coliformes a 45°C (NMP g ⁻¹)	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	
<i>Salmonella</i> spp	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	

PSP - Polpa sem Pasteurizar; PP - Polpa Pasteurizada; ND = Não Determinado.



Figuras 2a e 2b. Contagem de bolores e leveduras para os tratamentos testemunhas (◆), metabissulfito de Na (■), benzoato de Na (▲) e metabissulfito de Na + benzoato de Na (X) em polpas de cajá sem pasteurizar (Figura 2a) e polpa pasteurizada (Figura 2b) armazenadas a 26°C± 2°C por 90 dias. (*significativo, segundo o teste F (p<0,05) da análise de variância)

Tabela 2. Equações de regressão linear das análises de bolores e leveduras para os tratamentos de métodos combinados testemunha, metabissulfito de Na, benzoato de Na e, metabissulfito de Na + benzoato de Na em polpas de cajá sem pasteurizar e polpa pasteurizada

Variável	Equações de Regressão	
	Polpa sem Pasteurizar	Polpa Pasteurizada
Testemunha	$\hat{y} = -0,0007x + 5,4562$ $R^2 = 0,8914^*$	$\hat{y} = 0,0143x + 0,9301$ $R^2 = 0,6756^*$
Metabissulfito de Sódio	$\hat{y} = 0,0165x + 0,7927$ $R^2 = 0,8951^*$	$\hat{y} = 0,0036x + 0,9576$ $R^2 = 0,8999^*$
Benzoato de Sódio	$\hat{y} = 0,0105x + 4,051$ $R^2 = 0,9386^*$	$\hat{y} = 0,021x + 1,2808$ $R^2 = 0,9600^*$
Metabissulfito + Benzoato	$\hat{y} = 0,0133x + 0,9$ $R^2 = 0,8000^*$	$\hat{y} = 0,0139x + 0,9176$ $R^2 = 0,7271^*$

*significativo, segundo o teste F (p < 0,05) da análise de variância

Tanto no processamento de polpa pasteurizada quanto no de polpa não pasteurizada, a concentração de bolores e leveduras na polpa conservada com benzoato de sódio evoluiu durante o período de armazenamento, sendo que a combinação de benzoato e pasteurização contiveram com eficiência a evolução dos bolores e leveduras permanecendo dentro dos padrões estabelecidos, o que não ocorreu no processamento não pasteurizado, possivelmente, devido a alguma contaminação no preparo deste tratamento. Esse resultado diverge dos encontrados por Costa et al²⁴ que obtiveram o controle de bolores e leveduras, em polpa de cupuaçu utilizando o aditivo na concentração de 500 ppm. Já Coelho e Ferreira Neto²⁵ concluíram que na conservação de polpa de caju *in natura*, o benzoato de sódio não mostrou a eficiência esperada, ficando o produto final com alta carga microbiana, possivelmente, pela presença de alguma espécie resistente ao aditivo.

O tratamento de metabissulfito + benzoato apresentou comportamento semelhante em ambos os processamentos, indicando que a ação dos aditivos combinados foi suficiente para o controle dos bolores e leveduras presentes nas polpas de cajá, independente da amostra ser submetida ou não à prévia pasteurização.

Para a polpa pasteurizada, o metabissulfito de sódio foi o aditivo que apresentou melhor comportamento, mantendo certa estabilidade na população de bolores e leveduras durante o período de 90 dias, indicando a eficiência da combinação entre o tratamento térmico e esse aditivo. Da mesma forma, Jorge²⁶ utilizando a concentração de 100 ppm de metabissulfito em polpa pasteurizada de umbu, controlou a população microbiana de forma satisfatória. Até os 30 dias de armazenamento, o metabissulfito controlou de maneira semelhante os bolores e leveduras em ambos os processamentos. A partir desse ponto, houve um aumento da população na polpa não pasteurizada, sem, no entanto, ultrapassar os limites aceitáveis.

CONCLUSÃO

A análise microbiológica da polpa de cajá indicou que o produto estava em conformidade com a legislação vigente, revelando ausência de *Salmonella* spp e índices de coliformes fecais (< 0,3 NMP g⁻¹) dentro dos padrões exigidos para a categoria frutas, produtos de frutas e similares.

Com exceção das polpas sem pasteurizar controle e combinada com benzoato de sódio, os demais tratamentos combinados promoveram o

controle dos níveis de bolores e leveduras da polpa durante o período avaliado.

A formulação da polpa pasteurizada combinada com metabissulfito de sódio apresentou maior eficácia no controle da carga fúngica mantendo o produto apto ao consumo aos 90 dias.

AGRADECIMENTOS

À Capes, ao CNPq, LABOTEC II/UEFS, ao Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias da UFRB e a Embrapa Mandioca e Fruticultura que possibilitaram a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Instituto Brasileiro de Frutas - IBRAF. O Brasil é um dos três maiores produtores de frutas do mundo; 2009 [acesso 14 ago 2009]. Disponível em: <http://www.ibraf.org.br/>.
2. Assis MMM, Maia GA, Figueiredo EAT, Figueiredo RW, Monteiro JCS. Processamento e estabilidade de geléia de caju. *Rev Ciên Agron*. 2007; 38 (1): 46-51.
3. Barroso GM, Morim MP, Peixoto AL, Ichaso CLF. Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 1999.
4. Anselmo GCS, Cavalcanti-Mata MERM, Arruda PC, Sousa MC. Determinação da higroscopicidade do cajá em pó por meio da secagem por atomização. *Rev Biol Ciên da Terra*. 2006; 6 (2): 58-65.
5. Hoffmann FL, Garcia-Cruz CH, Pagnocca FC, Vinturim TM, Mansor AP. Microrganismos contaminantes de polpas de frutas. *Ciën Tecnol Aliment*. 1997; 17 (01): 32-7.
6. Franco BDGM, Landgraf M. *Microbiologia dos Alimentos*. 2 ed. São Paulo: Atheneu; 2005.
7. World Health Organization - WHO. Quality control methods for medicinal plant materials. *Who Farm*. 1992; 71.
8. Siqueira RS, Borges MF. *Microbiologia de frutas e produtos derivados*. In: Torrezan R, editor. Curso de processamento de frutas. Rio de Janeiro: EMBRAPA/CTAA; 1997. p. 2-13.
9. Satin M. *Food Irradiation. A Guidebook*. Lancaster - USA: Technomic Publishing Company, Inc.; 1993. 146p.
10. McNab WB. A general framework illustrating an approach to quantitative microbial food safety risk assessment. *J. Food Prot*. 1998; 61: 1216-28.

11. Leistner L. Shelf stable products and intermediate moisture foods based on meats. *In*: Rockland LB, Beuchat LR, ed. *Water activity: theory and applications to food*. New York: Mercel Dekker; 1987. p. 295-327.
12. Chirife J, Favetto GJ. Some physico-chemical basis of food preservation by combined methods. *Food Res Internat* 1992; 25: 386-96.
13. Leistner L, Gorris LGM. Food preservation by hurdle technology. *Trends Food Sci Technol*. 1995; 6: 41-6.
14. Tapia de Daza MS, Alzamora SM, Welte-Chanes J. Minimally processed high-moisture fruit products by combined methods. Results of a multinational project. *In*: Fito P, Ortega-Rodriguez E, Barbosa-Canovas GV, editors, *Food Engineering 2000*. New York: Chapman & Hall; 1997. p. 161-80.
15. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução nº 04, de 24 de novembro de 1988 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde. Dispõe sobre o regulamento técnico de aditivos intencionais. Aprova a revisão das tabelas referentes a aditivos intencionais e considera alguns aditivos como coadjuvantes da tecnologia da fabricação. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 19 dez 1988. Seção 1, p. 24716-23.
16. American Public Health Association (US) - APHA. *Compendium of methods for the microbiological of foods*. 4 ed. Washington (DC): APHA; 2001.
17. SAS Institute Inc. *Statistical Analysis System*. Release 9.1. [Software]. Cary: Sas Institute Inc; 2002 - 2003.
18. Gomes FP. *Curso de Estatística Experimental*. 14 ed. Piracicaba: Frederico Pimentel Gomes; 2000.
19. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº12, de 02 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Aprova o Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1, p. 45-53.
20. Brasil. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa nº1, de 7 de janeiro de 2000. Aprova o Regulamento técnico geral para a fixação dos padrões de Identidade e qualidade para polpa de fruta. Anexo I e Anexo PIQ para polpa de cajá. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 10 jan. 2000. Seção 1, p. 54-8.
21. Nascimento AR, Mouchrek Filho JE, Marinho SC, Martins AGLA, Sousa MR, Silva WAS et al. Incidência de microrganismos contaminantes em polpas de frutas comercializadas in natura em feiras livres da cidade de São Luís/MA. *Curitiba: B Ceppa*. 2006; 24(01): 249-58.
22. Borges MF, Oliveira MEB, Lemos, EH, Muniz CR, Assunção GB, Oliveira AM. Condições higiênico-sanitárias durante o processamento e a vida de prateleira de polpas de frutas tropicais. 18º Congresso Brasileiro de Ciências e Tecnologia de Alimentos; 2002(1); Porto Alegre: Soc Bras Ciênc Tecnol Alim. p. 2088-91.
23. Furtado AAL, Cabral LMC, Rosa MF, Modesta RCD, Pontes SM. Avaliação microbiológica e sensorial da polpa de goiaba tratada termicamente. *Rev Bras Frutic*. 2000; 22 (especial): 91-5.
24. Costa MC, Maia GA, Souza Filho MSM, Figueiredo RW, Nassu RT. Conservação de polpa de cupuaçu *Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng. Schum) por métodos combinados. *Rev Bras Frutic*. 2003; 25 (2): 213-5.
25. Coelho RRP, Ferreira Neto CJ. Comportamento de aditivos químicos na conservação da polpa de caju *Anacardium occidentale*, Linn. 17º Congresso Brasileiro de Fruticultura; 2002; Belém: Soc Bras Frut. p. 891-7.
26. Jorge EC. Preservação de polpa de umbu (*Spondias tuberosa* Arr. Câmara) verde e madura por métodos combinados [dissertação de mestrado]. Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 2003.

Campylobacter spp em carne de ave crua: avaliação da etapa de resfriamento

Campylobacter spp in fresh meat poultry: chilling step assessment

RIALA6/1323

Lucilla Imbroinise AZEREDO^{1*}, Rosa Helena LUCHESE², Ana Luzia LAURIA-FILGUEIRAS³

*Endereço para correspondência: Rua Oscar Vidal, nº 354, Centro, Juiz de Fora/MG, Brasil. CEP 36016-290.

Email: lucillaia@hotmail.com

¹Instituto Mineiro de Agropecuária – IMA

²Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ

³Laboratório de Zoonoses Bacterianas, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ

Recebido: 28.12.2009 – Aceito para publicação: 08.12.2010

RESUMO

Na obtenção de carcaças, cortes ou carnes desossadas de aves com qualidade assegurada, várias etapas indispensáveis devem ser seguidas de maneira eficiente, desde a granja avícola até a fase do consumo. As carnes de aves são consideradas alimentos que apresentam elevado risco de transmissão de doenças, como a campilobacteriose. Neste estudo, foi analisado o papel da etapa de resfriamento das carcaças na contaminação com *Campylobacter* spp. Para tanto, foram coletadas amostras das carcaças com swabs, após o resfriamento do produto, bem como a amostra da água usada nos tanques para tal finalidade. Das amostras de carcaças analisadas, 27% apresentaram resultados positivos para *Campylobacter* spp. Houve predominância de *Campylobacter jejuni* biotipo I nos isolados identificados e biotipificados, entretanto, essa bactéria não foi detectada na água de resfriamento. Considera-se que o controle da contaminação com essas bactérias deve ser feito ainda no plantel, na ave viva. Visto que a bactéria é sensível ao cozimento, recomenda-se consumir esse alimento bem cozido, tomando-se os devidos cuidados durante o preparo, para que não ocorra contaminação cruzada com alimentos que são ingeridos crus.

Palavras-chave. campilobacteriose, boas práticas de fabricação e preparo, segurança dos alimentos.

ABSTRACT

In order to achieve the assured quality in carcasses, cuts or boneless poultry meat, some fundamental procedures must be followed throughout the poultry chain, from the farm to consumers. Poultry products are considered as foods with high risk for diseases transmission such as campilobacteriosis. As the chicken meat is highly consumed by Brazilian people, this study was conducted to analyze the role of the chilling stage in the poultry processing in inducing the contamination with *Campylobacter* spp. For this purpose, samples from the carcasses were swabbed after chilling, and also the chilling water was analyzed. *Campylobacter* spp positive results were shown in 27% of the analyzed carcasses. The isolates were identified and biotyped, and the predominance of *Campylobacter jejuni* biotype I was showed; however, *Campylobacter* was not isolated from chilling water sample. Considering that neither the chilling in chlorinated water nor any other step in the poultry processing do eliminate and/or inactivate the bacterium, the bacteria contamination control should start just at the breeding stage, in the alive bird. Since the bacterium is heat sensible, it is advisable to consume well-cooked poultry, and to avoid cross contamination with raw foods.

Key words. campylobacteriosis, good practices of attainment and preparation, food safety.

INTRODUÇÃO

Na obtenção de carcaças, cortes ou carnes desossadas de aves, com qualidade assegurada, várias etapas indispensáveis devem ser seguidas de maneira eficiente, desde a granja avícola, até a mesa do consumidor. O consumo da carne de frango é um hábito do povo brasileiro e o Brasil, uma potência mundial na criação de frangos de corte, é o maior exportador de carne de aves do mundo¹.

Os produtos de origem animal destinados ao consumo humano devem estar de acordo com normas sanitárias de segurança de alimentos, e a procura por alimentos seguros segue intensificando-se, principalmente, para atender às exigências do mercado consumidor externo².

No entanto, mesmo com um rigoroso controle de qualidade, tem-se detectado um aumento do número de doenças de origem alimentar³⁻⁷. Porém, em países em desenvolvimento, estas informações ainda são limitadas⁸⁻¹⁰.

Recentemente um grupo chinês desenvolveu um Programa para Registros de Surtos Alimentares que facilmente poderia ser utilizado aqui no Brasil, e que permitiria conhecer o verdadeiro papel das DTAs (Doenças Transmitidas por Alimentos) no território nacional¹¹. Outros estudos sobre a percepção das pessoas sobre o risco no consumo e manipulação de determinados alimentos também estão sendo desenvolvidos^{3,4,12}.

Entre os fatores que têm contribuído para o aumento dos casos de toxinfecções alimentares estão a demanda elevada e constante de alimentos nos grandes centros urbanos, além da introdução de novos tipos de produtos alimentícios e de embalagens, bem como a tendência atual de se consumir alimentos crus ou pouco cozidos, visando à manutenção da qualidade nutricional e sensorial dos mesmos⁶.

Apesar da intensificação das normas sanitárias em todos os níveis e setores da produção avícola, existem patógenos que necessitam de estudos mais aprofundados e constantes, principalmente aqueles com potencial zoonótico, ou de interesse para a saúde pública, como é o caso de *Campylobacter* spp que representa um problema higiênico-sanitário muito importante na linha de produção de carne de aves^{5,7,13-17}.

É consenso que os tecidos de animais sadios não contêm bactérias no momento do abate. Entretanto, estas carnes são contaminadas durante o processamento com diversos tipos de micro-organismos oriundos,

principalmente, da pele, do trato gastrointestinal, das mãos dos manipuladores, dos recipientes e utensílios do ambiente de manuseio e armazenamento, e dos nódulos linfáticos¹⁸. O aparelho gastrointestinal das aves é reservatório da bactéria, podendo haver contaminação da carne durante as etapas de processamento, principalmente durante a evisceração.

Diversos estudos mostram que a carne de aves domésticas está associada frequentemente à transmissão de enteropatógenos, incluindo *Campylobacter* spp¹⁹. Autores apontam até 100% de contaminação de miúdos, como o fígado²⁰. Segundo Jay¹⁸, a presença de *Campylobacter* spp em fígados de frango, mesmo quando resfriados ou congelados, é maior do que qualquer outra carne, incluindo os fígados de outras espécies animais.

Amostras de fígado de frangos, resfriadas e congeladas, adquiridas em diferentes pontos de venda, foram usadas em estudo sobre a irradiação para inativação de *Campylobacter jejuni*. Esta bactéria foi encontrada em todas as amostras de fígado de frango *in natura*, com exceção de uma. De acordo com Azeredo²¹, a irradiação não deve ser utilizada como substituta das medidas de controle da contaminação por enteropatógenos²¹.

Outras fontes de contaminação da carne de frango com *Campylobacter* spp têm sido observadas. A bactéria foi detectada em *swab* de cloaca, na água de lavagem das carcaças, nas gaiolas e nas penas, indicando que estas aves podem ser fontes de infecção com *Campylobacter*, não somente quando ocorre extravasamento do conteúdo gastrointestinal, como também, antes de serem abatidas²². Em outro estudo de análise de água em diversas etapas do processamento de aves foram detectados, em 48% das 288 amostras coletadas, positividade para *Campylobacter jejuni*²³. Resultados semelhantes foram observados por Perko-Makela et al²⁴, que detectaram a bactéria em diversos estágios do ciclo de produção. Os autores concluíram que durante o abate de um lote positivo para *Campylobacter*, este pode persistir e conduzir uma contaminação de lotes negativos, mesmo depois da limpeza e desinfecção diária do frigorífico²⁴.

Segundo Silva e Amstalden²⁰, na detecção de *Campylobacter* spp nos alimentos, geralmente é encontrado um baixo número de células, principalmente se este alimento for congelado. Por outro lado, sua dose infectante é muito baixa, sendo necessárias apenas 500 células por mililitro para que ocorra uma infecção^{14,25}.

Campylobacter jejuni é a maior causa de diarreias humanas, por isso, de grande importância para a saúde

pública. As pessoas infectadas com *Campylobacter* apresentam diarreia, cólicas, dores abdominais e febre, geralmente, de dois a cinco dias após a exposição ao microrganismo, e estes sintomas podem durar até dez dias. A diarreia pode ser aquosa e sanguinolenta e vir acompanhada de náuseas e vômitos. Em pessoas imunodeprimidas, a bactéria pode causar septicemia²⁶.

Nos EUA, estudos comprovam mais de dois milhões de casos da infecção por ano, ou seja, duas vezes mais frequentes que as infecções por *Salmonella*, tendo ainda superado em muito as infecções por *Shigella*²⁷. Jay¹⁸ relata um estudo de 8.097 amostras de fezes humanas submetidas a oito diferentes laboratórios hospitalares, também nos EUA, por um período de 15 meses, onde *Campylobacter jejuni* foi isolado de 4,6% das amostras, superando o percentual de 2,3% de *Salmonella* e 1% de *Shigella*, fazendo das bactérias do gênero *Campylobacter*, reconhecidamente, as mais importantes bactérias enteropatógenicas.

A produção de frango livre de *Campylobacter* ainda não é praticável, e o anseio de um plantel livre, requer trabalho combinado e multidisciplinar. Progressos consideráveis podem ser realizados através da motivação do governo, das indústrias e educação continuada da população, porém o controle da doença só será realmente efetivo se essas ações forem praticadas em todo o processo produtivo²⁸. Para isso, já existem grupos de discussão de inocuidade alimentar da Organização Internacional de Saúde Animal (OIE) e do *Codex Alimentarius* que analisam a viabilidade do controle de *Salmonella* e *Campylobacter* nas aves domésticas.

O processamento de aves cruas envolve várias etapas, sendo o resfriamento uma das últimas antes da expedição. Na etapa de pré-resfriamento as carcaças chegam a uma temperatura aproximada de 35°C e devem ser rapidamente resfriadas, a fim de inibir o desenvolvimento microbiológico. O pré-resfriamento é utilizado para baixar lentamente a temperatura da carcaça e se evitar a rápida contração das fibras musculares, causado, pela queda brusca da temperatura, um fenômeno chamado encurtamento pelo frio. A queda brusca da temperatura da carcaça ocasiona endurecimento muscular, principalmente da musculatura do peito, durante a cocção, embora a musculatura do peito seja quase que exclusivamente composta de fibras musculares brancas, menos propensas ao encurtamento²⁹. Nesta etapa, a temperatura da carcaça declina em aproximadamente 20°C, seguido do resfriamento em outro *chiller*, onde a ave recebe água a 4°C, para que a temperatura na carcaça esteja em torno de 7°C³⁰.

A temperatura final da carcaça é tolerada até 10°C, quando esta for submetida ao congelamento imediato³⁰. Dependendo da velocidade da rotação dos *chillers*, o tempo que a ave leva para ser pré-resfriada e resfriada gira em torno de 40 minutos a 1 hora. A água dos tanques deve ter renovação constante no sentido contrário à movimentação das carcaças (contracorrente), o que confere vantagens sanitárias significativas, uma vez que a carcaça que está saindo do tanque entra em contato com a água mais limpa e mais fria. Devido ao baixo custo, tem aumentado o consumo da carne de frango no Brasil e, sendo conhecida a frequente incidência de *Campylobacter* em carcaça e produtos de carne de aves, a presente pesquisa objetivou analisar a carga microbiológica de *Campylobacter* spp nas carcaças de frango durante o resfriamento, visto que esta é uma etapa potencial de risco de contaminação cruzada. Para tanto, foram coletadas amostras de *swabs* das carcaças após o resfriamento, bem como da água usada nos tanques para tal finalidade.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Amostras de *swabs* das carcaças, após o resfriamento das aves, e amostra da água dos *chillers* foram coletadas em um frigorífico com Serviço de Inspeção Estadual de Minas Gerais (Instituto Mineiro de Agropecuária – IMA). Para entender melhor o fluxograma de obtenção e preparo da carne de aves, e onde foram coletadas as amostras, veja a figura 1. O frigorífico tem capacidade diária de abate de aproximadamente 12.000 aves, divididas em dois turnos de trabalho. No turno da manhã foram abatidas, aproximadamente, 7.000 aves, tendo sido coletados 70 *swabs*, correspondendo a 1% deste total.

Os 70 *swabs* das carcaças foram coletados após os resfriamentos durante a etapa de gotejamento. A coleta do material foi feita esfregando os *swabs* na carcaça, na região da coxa, quando estas estavam penduradas próximas à articulação da tíbia, como demonstrado na figura 2.

As amostras coletadas foram transportadas em caixas térmicas com gelo para o Setor de *Campylobacter*, do Laboratório de Zoonoses Bacterianas, situado no Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, na cidade do Rio de Janeiro, RJ, onde foram realizados todos os procedimentos referentes à semeadura, cultivo destas amostras e posterior isolamento, caracterização fenotípica e biotificação das cepas de *Campylobacter*.

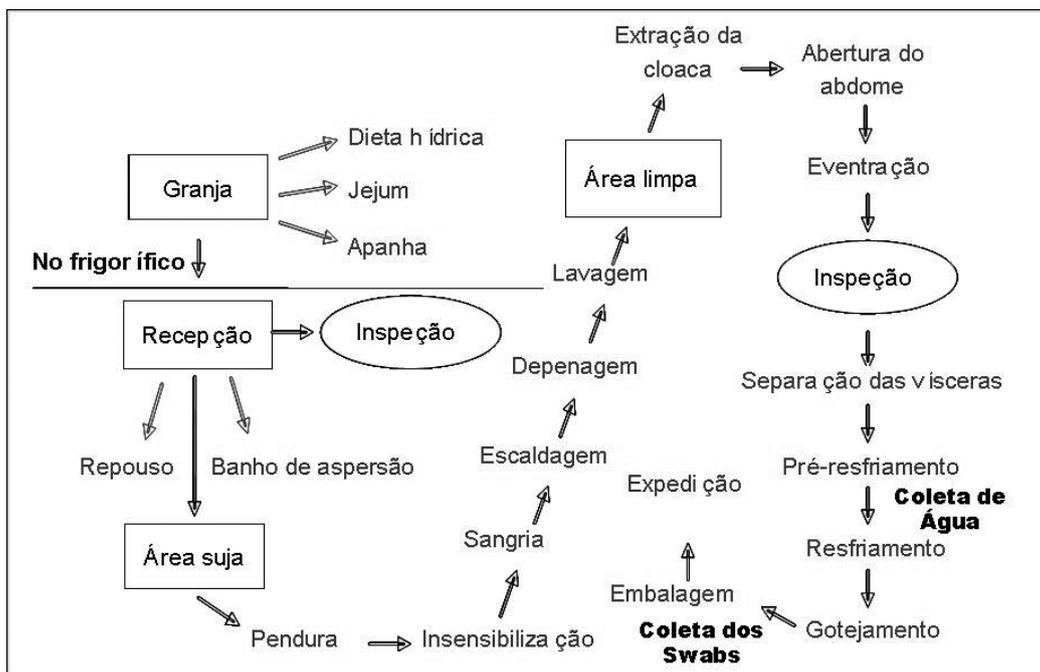


Figura 1. Fluxograma de abate e obtenção da carne de aves, demonstrando o local de coleta das amostras de swabs das carcaças e coleta de água



Figura 2. Coleta de swab das carcaças

Para a coleta da água dos resfriamentos foi feita, previamente, uma mecha com auxílio de gaze. A mecha foi colocada no *pré-chiller*, juntamente com as carcaças, fazendo exatamente o mesmo trajeto no pré-resfriamento e resfriamento destas, e retirada no final destas etapas. O trajeto levou cerca de 50 minutos.

No final do *chiller*, a mecha foi retirada e colocada num recipiente de boca larga com tampa, contendo 225 mL

da própria água dos *chillers* adicionado de 250 mL de meio de cultura previamente preparado. Neste caso, foi colocada uma porção da água do *pré-chiller* e uma porção da água do *chiller* no recipiente, uma vez que estes equipamentos são interligados.

O meio de cultura utilizado foi Caldo Brucella em dupla concentração, ou seja, ao invés de adicionar 28 g em 250 mL, foi adicionado 56 g em 500 mL, mais

50 mL de solução FBP, que é uma solução redutora de oxigênio composta de sulfato ferroso, bissulfito de sódio e piruvato de sódio, e 5 mL de mistura de antimicrobianos. Este meio de cultura é de enriquecimento seletivo para esta bactéria, conforme explicado a seguir. O recipiente coletor foi lacrado, identificado e também armazenado em caixa térmica com gelo até o momento da chegada ao laboratório para processamento³¹.

Determinação de *Campylobacter* spp

Todas as amostras foram submetidas à sementeira em placas em Ágar Columbia (OXOID – Inglaterra) com carvão ativado (0,4 g %), adicionadas de 5 mL de solução redutora de radicais superóxidos (FBP), conforme Filgueiras & Hofer³¹ e 0,5 mL de uma mistura de antibióticos. Os antibióticos são adicionados para evitar o crescimento de outras bactérias e fungos que venham a competir nutricionalmente com o *Campylobacter* no meio de cultura.

As placas semeadas foram incubadas em atmosfera de microaerofilia, gerada pela passivação do cobre a 42°C por 48h e o crescimento bacteriano analisado de forma macroscópica, através do aspecto morfológico das colônias (espraiadas, crescendo ao longo da estria, geralmente com brilho d'água) e a morfologia celular em microscópio ótico¹.

A solução redutora de oxigênio (FBP) foi previamente preparada adicionando para cada 0,5 g de cada droga, sulfato ferroso, bissulfito de sódio e piruvato de sódio, 100 mL de água destilada estéril. Após esterilização por filtração, a solução foi colocada em frasco âmbar e mantida por 30 dias em geladeira (4°C)¹⁰.

A solução mãe de antimicrobianos continha: 11 mg de cefalotina (Sigma), 50 mg de lactato de trimetoprim (Roche), 91 mg de vancomicina (Sigma), 20 mg de actidiona (Upjohn), 22 mg de colistina (Sigma), diluídas em 50 ml de água destilada estéril. A esterilização foi feita por filtração e a manutenção em freezer (-20°C)¹⁰.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As carcaças foram analisadas na etapa de gotejamento, após resfriamento e, portanto, prontas para expedição. Dezenove amostras (27%) revelavam-se positivas para *Campylobacter* spp; vinte e oito amostras apresentaram-se negativas, ou seja, sem células típicas de *Campylobacter* (40%) e vinte e três (33%) sem qualquer crescimento, nem de bactérias nem de leveduras, no procedimento de isolamento. As amostras positivas foram identificadas no laboratório,

sendo seis (32%) caracterizadas como *Campylobacter jejuni*, oito (42%) foram biotipificadas, na metodologia de Lior³¹ como *Campylobacter jejuni* biotipo I e cinco isolados (26%) se tornaram inviáveis, tendo o seu processo de identificação interrompido e, por este motivo, foram classificadas como *Campylobacter* spp.

Assim sendo, constatou-se nesta pesquisa que as bactérias do gênero *Campylobacter* foram capazes de sobreviver a este processo e mantiveram-se viáveis, mesmo em baixas temperaturas, próximas de 4°C, quando aderidas às carcaças. Por outro lado, não foi detectada presença de *Campylobacter* na água dos resfriamentos. É sabido que células estressadas podem estar em estado viável, mas não cultivável e, portanto, ainda com potencial de infectar carcaças onde a bactéria estaria mais protegida da ação do cloro e do frio. Neste estudo mesmo, entre os isolados das carcaças, verificou-se que 26% tornaram-se inviáveis. De acordo com Fernandes¹⁴, o emprego de técnicas moleculares como as de PCR, em substituição às de cultivo, seriam mais adequadas.

Rossi et al³³ afirmam que *Campylobacter* pode sobreviver durante quatro semanas ou mais em água a 4°C, e, embora não se multiplique, permanece viável e infectante para homens e animais.

Depreende-se que a contaminação inicial da ave, bem como a possibilidade desta se contaminar durante o processo, são fatores fundamentais para a segurança do produto.

O resfriamento é uma etapa crítica para a contaminação cruzada entre as carcaças, e não pode ser considerado como uma etapa para a redução de carga microbiológica, sendo com finalidade exclusiva de redução da temperatura das carcaças³⁴. Visto que a bactéria é sensível ao cozimento, este é o modo mais seguro de consumir o alimento, tomando ainda os devidos cuidados durante o preparo, para que não ocorra contaminação cruzada com outros alimentos que serão ingeridos crus.

Na indústria, um sistema de gestão de segurança dos alimentos complementa a obtenção de um alimento seguro. Análises de perigos e pontos críticos de controle devem ser implementadas juntamente com boas práticas agropecuárias e de fabricação e manipulação¹⁹.

Embora o consumo destas carnes e subprodutos no nosso país seja elevado, o risco para o consumidor é considerado moderado, pois são consumidas apenas após tratamento térmico ou cozimento, porém, em países com costumes de ingerir produtos e subprodutos de carne de aves crus ou mal cozidos, o risco passa a ser considerado elevado³⁵.

Dados estes já tinham sido ressaltados por Uyttendaele et al³⁶, em um estudo realizado na Bélgica de análise de risco e critérios microbiológicos em produtos elaborados de carne de aves, no qual o autor afirma que o consumidor tem um risco 1010 vezes maior de se contaminar com *Campylobacter* ao ingerir uma carne crua ou mal cozida, do que ao ingerir carne cozida.

Segundo Allen et al³⁷, a refrigeração através da imersão em água inibe a contaminação microbiana da carcaça. A grande desvantagem do sistema de pré-resfriamento e resfriamento nos tanques de imersão é a contaminação cruzada, principalmente por patógenos como *Salmonella* e *Campylobacter*. Embora se saiba que a cloração da água tem pouca ou nenhuma atividade sobre a *Salmonella* na carcaça, a água hiperclorada dos chillers previne o acúmulo de micro-organismos como um todo²⁹.

CONCLUSÃO

O preparo e obtenção da carcaça de aves é um processo com potencial risco de contaminação em todas as suas etapas e ainda ineficaz para eliminação e/ou inativação de micro-organismos patogênicos, como *Campylobacter*. Considerando a elevada proporção de carcaças positivas encontrada para *Campylobacter*, mesmo após resfriamento, praticamente prontas para expedição, conclui-se que a obtenção de carne mais segura, deve incluir o controle da bactéria ainda no plantel, na ave viva, uma vez que, a presença de *Campylobacter* nestes animais, interfere diretamente na sua prevalência também na carcaça, após o processamento.

A segurança do alimento se dá durante todo o processo da cadeia produtiva. Deve ser levado em conta que, mesmo depois de embalada, a carcaça ainda passa por diferentes condições de transporte e armazenamento. Se o produtor, bem como o mercado varejista, descumprirem as normas preconizadas de segurança dos alimentos, nestas etapas subsequentes, estarão propiciando a multiplicação do patógeno em amostras positivas e aumentando o risco de doença alimentar. Desta forma, as amostras que antes não tinham o número de células suficientes para infecção, podem vir a ter, devido condições inadequadas que propiciarão o processo de multiplicação.

A bactéria não foi encontrada na água em duas diferentes etapas em que é utilizada. Esta é sensível ao cloro e, em ambas etapas, a água estava clorada. Ademais, *Campylobacter* é capaz de formar biofilmes e, desta forma, se torna mais resistente que na forma planctônica.

Os resultados indicam a necessidade de melhorar os padrões higiênico-sanitários na linha de obtenção e preparo da carne de aves, assim como, educação sanitária continuada para os manipuladores, funcionários e consumidores a respeito dos perigos e riscos aos quais estão submetidos.

REFERÊNCIAS

1. Associação Brasileira de Produtores e Exportadores de Frango. Brasil (ABEF). Food Ingredients Brasil. Notícias. [acesso em 11 mar 2009]. Disponível em: www.abef.com.br.
2. União Brasileira de Avicultura. Brasil (UBA). Atualização e Harmonização em Defesa Sanitária Avícola. Relatório Anual. Belo Horizonte. [acesso 29 set 2009]. Disponível em: www.uba.com.br.
3. Broner S, Torner N, Dominguez A, Martínez A, Godoy P. The Working Group for the Study of Outbreaks of Acute Gastroenteritis in Catalonia. Sociodemographic inequalities and outbreaks of foodborne diseases: an ecologic study. *Food Control*. 2010;21:947-51.
4. Mullan B, Wong C. Using the Theory of Planned Behaviour to design a food hygiene intervention. *Food Control*. 2010;21:1524-9.
5. Meremäe K, Elias P, Tamme T, Kramarenko T, Lillenberg M, Karus A et al. The occurrence of *Campylobacter* spp in Estonian broiler chicken production in 2002-2007. *Food Control*. 2010;21:272-5.
6. Habib I, Sampers I, Uyttendaele M, Berkvens D, Zutter L. Baseline Data from a Belgium-Wide Survey of *Campylobacter* Species Contamination in Chicken Meat Preparations and Considerations for a Reliable Monitoring Program. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74(17):5483-9.
7. Bull SA, Allen VM, Domingues G, Jorgensens G, Frost JA, Une R et al. Sources of *Campylobacter* spp. Colonizing Housed Broiler Flocks during Rearing. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72(1):645-52.
8. Dallal MMS, Doyle MP, Rezadehbash M, Dabiri H, Sanaei M, Modarresi S et al. Prevalence and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* serotypes, *Campylobacter* and *Yersinia* spp isolated from retail chicken and beef, Tehran, Iran. *Food Control*. 2010;21:388-92.
9. Rahimi E, Momtaz H, Bonyadian M. PCR detection of *Campylobacter* sp. from turkey carcasses during processing plant in Iran. *Food Control*. 2010;21:692-4.
10. Lauria-Filgueiras AL. 2000. Circulação de espécies termofílicas de *Campylobacter* em primatas não humanos mantidos em cativeiro. [tese de doutorado]. Fiocruz (IOC): Rio de Janeiro; 2000.
11. Wang L, Xu Y, Wang Y, Dong S, Cao Z, Zhou W et al. The Epidemiological Investigation and Intelligent Analytical System for foodborne disease. *Food Control*. 2010; 21:1466-71.

12. Behrens JH, Barcellos MN, Frewer LJ, Nunes TP, Franco DGMB, Destro MT et al. Consumer purchase habits and views on food safety: a Brazilian study. *Food Control*. 2010;21:963-9.
13. Evers EG, Post J, Putirulan FF, Wal FJ. Detection probability of *Campylobacter*. *Food Control*. 2010; 21:247-52.
14. Fernandes M, Mena C, Silva J, Teixeira P. Study of Cytolethal Distending Toxin (*cdt*) in *Campylobacter coli* Using Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay and its Distribution Among Clinical and Food Strains. *Foodborne Pathog Dis*. 2010;7(1):103-6.
15. Lasica AM, Wyszynska A, Szymanek K, Majewski P, Jagusztyn-Krynicka EK. *Campylobacter* protein oxidation influences epithelial cell invasion or intracellular survival as well as intestinal tract colonization in chickens. *J Appl Genet*. 2010;51(3):383-93.
16. Van Deun K, Pasmans F, Ducatelle R, Flahou B, Vissenberg K, Martel A et al. Colony strategy of *Campylobacter jejuni* results in persistent infection of the chicken gut. *Vet Microbiol*. 2008;130:285-97.
17. Rozynek E, Zierzanowska-Fangrat K, Jozwiak P, Popowski J, Korsak D, Dzierzanowska D. Prevalence of potential virulence markers in Palosh *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from hospitalized children and from chicken carcasses. *J Med Microbiol*. 2005;54:615-9.
18. Jay JM. *Microbiologia de Alimentos*. 6 ed. São Paulo: Artmed, 2005.
19. Cox JM, Pavic A. Advances in enteropathogen control in poultry production. *J Appl Microbiol*. 2009; 108(3):745-55.
20. Silva N, Amstalden VC. Detecção de *Campylobacter*. Manual de métodos de análise microbiológica. São Paulo: Livraria Varela. 2007. p. 142-8.
21. Azeredo LI. Irradiação de fígados de frango contaminados in natura e in vitro com *Campylobacter jejuni*. [Monografia de conclusão de pós-graduação]. Universidade Federal Fluminense. Niterói. 2007.
22. Batista CRV, Aidoo KE, Franchin PR. Sources of poultry meat contamination with thermophilic *Campylobacter* before slaughter. *Braz J Microbiol*. 2005;36:157-62.
23. Cortez ALL, Carvalho ACFB, Scarcelli E, Miyashiro S, Martins AMCV, Burger KP. Survey of chicken abattoir for the presence of *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2006; 48:307-10.
24. Perko-Makela P, Isohanni P, Katzav M, Lund M, Hanninen ML, Lyhs U. A longitudinal study of *Campylobacter* distribution in a turkey production chain. *Acta Vet Scandinav*. 2009;51:18.
25. Mena C, Rodrigues D, Silva J, Gibbs P, Teixeira P. Occurrence, Identification, and Characterization of *Campylobacter* Species Isolated from Portuguese Poultry Samples Collected from Retail Establishments. *Poultry Sci*. 2008;8:167-90.
26. Butzler JP, Oosterom J. *Campylobacter* pathogenicity and significance in foods. *Int J Food Microbiol*. 1991;12:1-8.
27. Scarcelli E, Miyashiro S, Piatti RM, Campos FR, Castro AGM, Cardoso MV et al. Emprego da técnica do polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP) do produto obtido pela reação da polimerase em cadeia (PCR) do gene *FLA* na subtipagem de amostras de *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* isoladas de frangos de corte e humanos. *Arq Inst Biolog*. 2001;70(3):1-5.
28. Skirrow, MB. Epidemiology of *Campylobacter enteritis*. *Int J Food Microbiol*. 1990;12:9-16.
29. Gomide LAM, Ramos EM, Fontes PR. Tecnologia e tipificação de carcaças. 2 ed. Editora da UFV. Viçosa. 2006.
30. Brasil. Portaria nº 210, de 10 de novembro de 1998. Aprova o regulamento técnico da inspeção tecnológica e higiênico-sanitária da carne de aves. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília. 1998.
31. Filgueiras ALL, Hofer E. Ocorrência de *Campylobacter* termofílico em diferentes pontos de uma estação de tratamento de esgotos na cidade do Rio de Janeiro, RJ. *Rev Microbiol*. 1989;20(3):303-8.
32. Lior H. A new, extend biotyping scheme for *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and "*Campylobacter laridis*". *J Clin Microbiol*. 1982;20:636-40.
33. Rossi DA, Soncini RA, Antunes RC. Transmissão vertical de *Campylobacter* sp. em um sistema de produção avícola [dissertação de mestrado]. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia; 2006.
34. Azeredo LI, Luchese RH, Dias SS. Relação entre absorção de água e temperatura do *pré-chiller* e *chiller* no processamento de carcaças resfriadas de aves. *Rev Hig Alim*. 2009;23:507-8.
35. Mataragas M, Skandamis PN, Drosino SEH. Risk profiles of pork and poultry meat and risk ratings of various pathogen/product combinations. *Iera Odos*. 2008;75:118.
36. Uyttendaele M, Baert K, Ghafir Y, Daube G, Zutter L, Herman H et al. Quantitative risk assessment of *Campylobacter* spp in poultry based meat preparations as one of the factors to support the development of risk-based microbiological criteria in Belgium. *Int J Food Microbiol*. 2006;111:149-63.
37. Allen VM, Corry EL, Burton CH, Whyte RT, Mead GC. Hygiene aspects of modern poultry chilling. *Int J Food Microbiol*. 2000;58:39-48.

Alimentos embalados que compõem as cestas básicas: avaliação microscópica e da rotulagem

Packaged foods composing the “basic baskets”: microscopic and labeling assessment

RIALA6/1324

Vilma dos Santos Menezes Gaiotto DAROS^{1*}, Sonia de Paula Toledo PRADO², Maria Helena MARTINI³, Rejane Alexandre Silva GRACIANO⁴, Regina Célia Arantes STANCARI⁵, Zenaide Martins GONZAGA⁶, Paulo Flávio Teixeira CHIARINI³, Isabel Tacaco YAMAMOTO⁷, Maria de Lourdes Paixão SILVA⁸, Augusta Mendes da SILVA⁹, Maria Aparecida Moraes MARCIANO⁹, Márcia Dimov NOGUEIRA⁹, Márcia Bittar ATUI⁹

*Endereço para correspondência: ¹Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas, Centro de Laboratório Regional de Santo André, Instituto Adolfo Lutz, Avenida Ramiro Colleoni, 240, CEP 09040-160, Santo André/SP, Brasil. Fone: (11) 4990-1267. E-mail: daros@ial.sp.gov.br

²Centros de Laboratórios Regionais de Ribeirão Preto², Campinas³, São José do Rio Preto⁴, Bauru⁵, Presidente Prudente⁶, Marília⁷, Santos⁸

⁹Núcleo de Microscopia e Morfologia, Centro de Alimentos, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo/SP, Brasil

Recebido: 01.04.2010 – Aceito para publicação: 29.12.2010

RESUMO

Cesta básica é um conjunto de bens, composto de gêneros alimentícios e produtos de higiene pessoal e de limpeza, suficientes para determinada família pelo período de 30 dias. No presente trabalho as condições higiênicas e da rotulagem foram analisadas em 130 produtos alimentícios embalados e componentes das cestas básicas comercializadas nas regiões de abrangência do Instituto Adolfo Lutz Central e Regionais. Foram identificados os elementos histológicos, cascas e paus, assim como matérias estranhas e filamentos micelianos. As Resoluções RDC nº 259/2002, 359 e 360/2003, da ANVISA/MS e Lei nº 10.674/2003 foram utilizadas para a avaliação da rotulagem. Nas análises histológicas, 6,1% foram insatisfatórias e 71,0% apresentaram matérias estranhas, cujos achados estão em desacordo com a Resolução RDC nº 175/2003 da ANVISA/MS e Portaria nº 326/1997 da SVS/MS. Ademais, 100% estavam em desacordo com pelo menos uma das legislações utilizadas para avaliar os rótulos das embalagens. Os dados obtidos poderão subsidiar as ações das Vigilâncias Sanitárias, contribuir na melhoria dos produtos e, conseqüentemente, proteger a saúde da população.

Palavras-chave. cesta básica, identificação histológica, matérias estranhas, rotulagem, legislação.

ABSTRACT

A “basic basket” is a kit of commodities including food items and products for personal hygiene and cleaning, sufficient for a determined family for a period of 30 days. This study evaluated the hygienic conditions and labeling of 130 packaged food products assembled in the “basic baskets”, which are marketed in the regions comprised by the Central & Regional Laboratories of Adolfo Lutz Institute. Histological elements, skins and sticks, and also foreign matter and mold were found. The labeling assessment was based on Resolutions RDC nº 259/2002 and nº 359 & 360/2003 of ANVISA/MS (Sanitary Surveillance Agency/Ministry of Health/Brazil) and the Law nº 10,674/2003 recommendations. On histological analyses 6.1% were unsatisfactory, 71% presented foreign matter, which did not comply with Resolution RDC nº 175/2003 of ANVISA/MS and Decree nº 326/1997 of SVS/MS; 100% failed to comply with at least one of the legislations used for evaluating the information contained on the label. These findings will provide subsidy for the regulatory actions, contributing to improve the products quality, and consequently to protect the health of population.

Key words. “basic basket”, histological identification, foreign matter, labeling, legislation.

INTRODUÇÃO

Cesta básica é um termo genérico utilizado para designar um conjunto de bens, incluindo gêneros alimentícios e produtos de higiene pessoal e de limpeza, que atendem às necessidades elementares de uma família pelo período de um mês. Todavia, não existe um padrão, ficando a cargo de cada estado ou instituição estabelecer a sua cesta básica.

O conceito de cesta básica foi instituído no Brasil na década de 30, durante o governo Getúlio Vargas, devido à política social iniciada¹. Dentro do contexto da política trabalhista de Vargas que implantou o salário mínimo, o valor deste levava em conta a garantia de compra da cesta básica¹. Esta não deveria ultrapassar o percentual de 20% do salário mínimo e considerava também os demais itens de despesas que segundo o IBGE são os seguintes: educação 5%, vestuário 8%, lazer 7%, habitação 30%, saúde 9%, transporte 10%, reserva 5%, imposto 6%¹.

No Brasil destacam-se três propostas de cestas básicas: a do Decreto 138/38, a do PROCON/DIEESE (Departamento Intersindical de Estatística e Estudos Sócio-Econômicos) e a do Estudo Multicêntrico realizado pelo Ministério da Saúde.

Em 1989, o Centro de Estudos e Pesquisas da Secretaria de Defesa do Consumidor do Estado de São Paulo, em parceria com o DIEESE, iniciou o Projeto Cesta Básica PROCON - DIEESE, com o objetivo de oferecer ao consumidor paulistano um instrumento para auxiliar as compras mais racionais do ponto de vista do preço para os gêneros alimentícios, de higiene pessoal e limpeza. Desde então, a variação de preços tem sido usada como um indicador econômico em órgãos públicos, associações, sindicatos, bancos e empresas de consultoria, ultrapassando as fronteiras do objetivo inicial, propiciando comparações de dados e análises econômicas. Atualmente esses valores constituem referência para as autoridades governamentais estabelecerem políticas salariais, uma vez que retratam a renda mínima necessária para garantir o acesso ao consumo de bens como alimentos, produtos de higiene pessoal e de limpeza doméstica².

Considerando o conceito de Segurança Alimentar e Nutricional – garantia ao acesso a alimentos básicos de qualidade, de modo permanente, a preços adequados, que não comprometam outras necessidades essenciais, com base em práticas alimentares saudáveis, contribuindo para o desenvolvimento integral e uma existência digna³ – a verificação das condições sanitárias de alimentos contidos nas cestas básicas é de suma importância.

A análise microscópica é uma das técnicas utilizadas para aferir a qualidade dos alimentos e tem como objetivos identificar os elementos histológicos característicos, de acordo com a lista de ingredientes do rótulo, bem como, pesquisar a presença de matérias estranhas. Pela identificação dos elementos histológicos característicos é possível evidenciar fraudes em alimentos, comprovando a presença de adulterantes acidentais e/ou intencionais^{4,5}. A pesquisa de matérias estranhas permite verificar a qualidade da matéria-prima e as condições higiênico-sanitárias empregadas no processo de fabricação e armazenamento dos alimentos^{6,7,8}.

Atualmente a Resolução RDC nº 175/2003, da ANVISA/MS⁹, considera como matérias estranhas prejudiciais à saúde humana, os insetos e outros animais reconhecidos como vetores mecânicos de patógenos; os excrementos de insetos ou de outros animais; os parasitos e os objetos rígidos, pontiagudos e/ou cortantes. A presença de outras matérias estranhas nos alimentos tais como insetos e seus fragmentos, ovos e larvas, principalmente de coleópteros e lepidópteros, ácaros, fungos filamentosos, areia, terra, partículas carbonizadas e inúmeras outras sujidades é considerada indicativa da não adoção e/ou manutenção das Boas Práticas de Fabricação e, portanto, está em desacordo com a Portaria SVS/MS nº 326/1997¹⁰ e também com o Código de Defesa do Consumidor (artigo 18, parágrafo 6º)¹¹.

Além dos aspectos higiênicos verificados pela avaliação microscópica, outro importante item a ser considerado é a rotulagem, cujas informações permitem comparar alimentos no momento da compra, verificar a relação entre qualidade e preço, bem como possibilitar aos consumidores evitarem o consumo de ingredientes que desejam reduzir ou abolir por motivos de saúde¹². As normas básicas de rotulagem foram inicialmente instituídas pelo Decreto-Lei Federal nº 986, de 21/10/1969¹³, as quais foram posteriormente reforçadas e ampliadas pelo Código de Defesa do Consumidor – Lei nº 8.078, de 11/09/1990¹¹.

Por determinação da legislação em vigor, Resolução RDC nº 259/2002¹⁴, todo rótulo deve ser fiel ao produto que o contém, ser escrito de forma clara e legível, não induzir o consumidor a equívoco, confusão ou engano, além de conter todas as informações obrigatórias previstas na legislação. Devido à importância das cestas básicas e escassez de dados a respeito da qualidade das mesmas, este estudo teve por objetivos avaliar os aspectos microscópicos e de rotulagem dos produtos que integram as cestas básicas comercializadas em diferentes cidades do Estado de São Paulo.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Foram analisadas 130 amostras de diferentes produtos, sendo 10 amostras de cada tipo: açúcar, arroz, biscoito recheado, biscoito salgado, café torrado e moído, doce em pasta, extrato de tomate, farinha de mandioca, farinha de trigo, feijão, fubá, macarrão e sal, provenientes de 10 cestas básicas. As amostras foram adquiridas no período de agosto a dezembro de 2006, em estabelecimentos comerciais de cidades do estado de São Paulo: Ribeirão Preto, Santo André, Campinas, São José do Rio Preto, Bauru, Presidente Prudente, Marília, Santos e São Paulo.

Métodos

Os procedimentos analíticos foram realizados nos Laboratórios de Microscopia de Alimentos dos Centros de Laboratórios Regionais e do Centro de Alimentos, do Instituto Adolfo Lutz.

Identificação dos elementos histológicos

Foi realizada através da técnica descrita por Rodrigues et al¹⁵. Após preparação das lâminas, os materiais foram observados ao microscópio óptico (10X e 40X).

Determinação de matérias estranhas

Foram utilizados os métodos descritos pela *Association of Official Analytical Chemists (AOAC)*¹⁶ para determinação de sujidades leves e pesadas. As análises foram realizadas em duplicata e os resultados expressos como a média aritmética das determinações.

Contagem de filamentos micelianos

A metodologia nº 984.29 A-B (16.17.01) da *Association of Official Analytical Chemists (AOAC)*¹⁶ foi empregada para a contagem de filamentos micelianos em polpa e extrato de tomate, pelo método de Howard.

Quantificação de cascas e paus

A técnica descrita por Rodrigues et al¹⁵ foi empregada em amostras de café torrado e moído para a obtenção da porcentagem de cascas e paus.

Avaliação da rotulagem

As informações contidas na rotulagem foram analisadas considerando as legislações em vigor: RDC nº 259/2002¹⁴, nº 359/2003¹⁷ e nº 360/2003¹⁸, da ANVISA/MS, e Lei nº 10.674/2003¹⁹. Foram verificadas as informações

obrigatórias, tais como: denominação de venda, lista de ingredientes, conteúdo líquido, identificação da origem e do lote, prazo de validade e modo de conservação; além daquelas consideradas úteis como telefone, e-mail e/ou site e caixa postal, quando presentes. Observou-se também a presença das expressões “Contém glúten” ou “Não contém glúten” e a conformidade da informação nutricional.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total de 130 amostras analisadas 6,1% estavam insatisfatórias quanto às análises histológicas (histologia, fraudes e impurezas no café) e 71,0% apresentaram matérias estranhas de diversas origens, portanto, em desacordo com a Resolução RDC nº 175/2003⁹ e Portaria nº 326/1997¹⁰.

Todos os produtos das cestas básicas, com exceção do sal, revelaram a presença de elemento histológico vegetal característico. Entretanto, outros elementos também foram identificados em amostras de sal (20%), açúcar (10%) e café torrado e moído (10%), que sugerem uma contaminação acidental e/ou fraude, indicando, deste modo, falhas no processo de fabricação ou adulteração intencional do fabricante (Tabela 1).

O item 7.3 da Portaria nº 377/1999, da SVS/MS, estabelecia o limite de tolerância de 1,0% para a presença de impurezas em café torrado e moído, entretanto, este item foi revogado pela Resolução nº 175/2003 da ANVISA/MS. Embora estas impurezas em café não sejam consideradas riscos à saúde, a presença em quantidades superiores a 1,0% poderá interferir na qualidade do produto, conforme a Instrução Normativa nº 8/2003/MAPA²⁰, a qual considera este o percentual máximo para matérias estranhas e impurezas no grão cru. Neste estudo, verificou-se que 80,0% das amostras de café continham impurezas (cascas e paus) e, 40,0% delas, apresentaram níveis acima de 1,0%.

Em relação às matérias estranhas encontradas (Tabela 2), apenas quatro amostras (uma de arroz, uma de farinha de mandioca e duas de biscoito recheado) continham pelos de roedor, considerados uma das matérias estranhas prejudiciais à saúde humana por serem veiculadores de micro-organismos patogênicos, segundo a RDC nº 175/2003. Em todos os tipos de alimentos foram encontradas outras matérias estranhas não prejudiciais à saúde, indicando falhas na adoção das boas práticas de fabricação estando, portanto, em desacordo com a Portaria nº 326/1997 da SVS/MS.

Tabela 1. Elementos histológicos identificados nas amostras que compunham as cestas básicas analisadas

Produtos	Elemento característico	Outros elementos	
		Tipo	% de amostras positivas
Sal	--	Substância amorfa	10%
		Pontos pretos	10%
Açúcar	<i>Saccharum officinarum</i>	<i>Triticum</i> sp	10%
Arroz	<i>Oriza sativa</i>	--	--
Feijão	<i>Phaseolus vulgaris</i>	--	--
Farinha de trigo	<i>Triticum</i> sp	--	--
Fubá	<i>Zea mays</i>	--	--
Farinha de Mandioca	<i>Manihot utilissima</i>	--	--
Biscoito Recheado	<i>Triticum</i> sp	--	--
Biscoito Salgado	<i>Triticum</i> sp	--	--
Café	<i>Coffea</i> sp	Cascas e Paus < 1%	30%
		Cascas e Paus > 1%	40%
		<i>Glycine soja</i>	10%
Goiabada	<i>Psidium guajava</i>	--	--
Extrato de Tomate	<i>Lycopersicum</i> sp	--	--
Macarrão	<i>Triticum</i> sp	--	--

Tabela 2. Matérias estranhas identificadas em amostras de alimentos (N=130) que compunham as cestas básicas analisadas

Produtos	Tipos de Matérias Estranhas											
	Inseto					Ácaro	Pelo		Partículas		Areia	Cristais
	Vivo	Morto	Fragmento	Larvas	Ovo		Animal	Roedor	Carbonizadas	Metálicas		
Sal	-	-	P	-	-	-	P	-	-	P	P	P
Açúcar	-	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arroz	-	P	P	-	P	P	P	P	-	P	P	-
Feijão	P*	-	P	-	-	-	-	-	-	P	P	-
Farinha de trigo	-	P	P	-	-	P	-	-	-	-	-	-
Fubá	P**	-	P	P	-	P	P	-	P	-	-	-
Farinha de mandioca	-	P	P	-	-	P	-	P	P	-	-	-
Biscoito recheado	-	P	P	-	-	-	-	P	-	-	-	-
Biscoito salgado	-	-	P	-	-	P	P	-	-	-	-	-
Café	-	-	P	-	-	P	P	-	-	-	-	-
Doce em pasta	-	P	-	-	P	P	P	-	-	-	-	-
Extrato de tomate	-	-	P	-	-	P	-	-	-	-	-	-
Macarrão	-	P	P	-	-	P	-	-	-	-	-	-

P = presença

* = inseto pertencente à Ordem Coleoptera

** = inseto pertencente à Ordem Psocoptera

Entre os produtos analisados, o açúcar apresentou a menor porcentagem de matérias estranhas por amostra (30,0%), enquanto a farinha de trigo e biscoito apresentaram 90,0%. A matéria-prima principal desses dois produtos, o trigo, é considerada bastante vulnerável ao ataque de pragas, desde o campo até o armazenamento do produto final²¹.

Na contagem de filamentos micelianos, os valores de campos positivos obtidos pelo método de Howard foram de 3,5%, 10,7%, 16%, 34% e 37%. Nenhuma amostra de extrato de tomate apresentou filamentos micelianos acima de 40,0%, limite este aceitável até 2003 para produtos derivados de tomate. Embora este parâmetro tenha sido revogado pela Resolução RCD n° 175/2003, que não considera a presença de fungos filamentosos em alimentos como prejudicial à saúde humana, a presença destes indica a utilização de matéria-prima deteriorada.

As evidências da presença tanto de elementos histológicos não característicos, como de matérias estranhas, demonstram a necessidade de um rigoroso controle durante as etapas de fabricação, transporte e armazenamento de alimentos para a garantia da integridade do produto e da saúde do consumidor.

Em relação à avaliação dos dizeres da rotulagem verificou-se que todas as amostras estavam em desacordo com pelo menos uma das legislações em vigor no presente estudo, sendo que 4,6% das amostras analisadas estavam em desacordo com duas legislações e, 3,1%, em desacordo com todas as legislações.

Considerando a Resolução RDC n° 259/2002, 20,0% dos rótulos avaliados estavam em desacordo quanto à apresentação das informações obrigatórias (Figura 1). De acordo com esta legislação, todo rótulo deve apresentar impresso, gravado ou marcado de forma visível, legível e indelével uma indicação em código ou linguagem clara que permita identificar o lote do alimento. Pode-se utilizar um código chave precedido da letra “L” ou a data de fabricação, embalagem ou de prazo de validade, ficando a critério do fabricante essa definição. Outra importante informação obrigatória diz respeito à identificação de origem. Todos os rótulos devem indicar a razão social do fabricante, o endereço completo, incluindo município e país de origem, número de registro ou CNPJ, além das expressões “indústria...”, “fabricado em...” ou “produto...”, para identificar a origem. Em nosso estudo essas duas informações obrigatórias apresentaram as maiores porcentagens de não conformidades, dificultando a identificação do fabricante para a aplicação das sanções legais cabíveis e a rastreabilidade do produto para a retirada do lote do mercado.

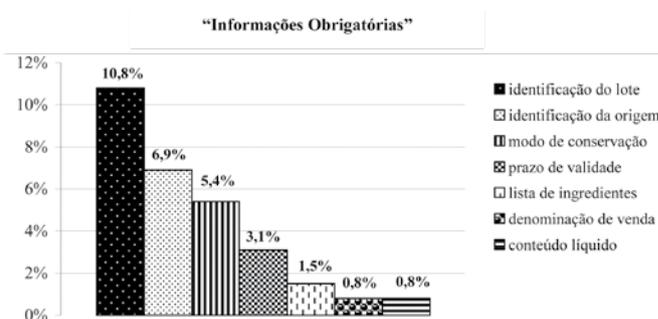


Figura 1. Porcentagens de rótulos com informações obrigatórias em desacordo com a Resolução RDC n° 259/2002 da ANVISA/MS

Barcelos e Fatel²² avaliaram alimentos contidos em cestas básicas comercializadas nos supermercados do município de Cascavel – PR e concluíram que 65,8% dos 41 rótulos apresentaram não conformidades com relação às informações obrigatórias e nutricionais.

Em 2003, a ANVISA/MS aprovou o “Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional Alimentos Embalados” tornando obrigatória a declaração do valor energético, carboidratos, proteínas, gorduras totais, gorduras saturadas, gorduras trans, fibra alimentar e sódio. Com relação à informação nutricional, os resultados obtidos indicaram que 70% das amostras estavam em desacordo com as Resoluções RDC n° 359 e 360/2003 da ANVISA/MS.

A Lei Federal n° 10.674/2003 padronizou a rotulagem de alimentos quanto à presença ou ausência de glúten (conjunto de proteínas presentes no trigo, aveia, cevada, malte e centeio), tornando obrigatória a apresentação das expressões “Contém Glúten” ou “Não Contém Glúten”. Tais caracteres devem estar em destaque, nítidos e de fácil leitura, como medida de alerta aos portadores da doença celíaca, causada pela intolerância permanente ao glúten. No presente estudo 7,7% dos rótulos de alimentos como arroz, feijão, café torrado e moído, farinha de mandioca, fubá e doce em pasta não apresentavam tais expressões, estando, portanto, em desacordo com a legislação em vigor.

Outras informações importantes e úteis para a comunicação direta do consumidor com a indústria, conhecido por Serviço de Atendimento ao Consumidor (SAC), também foram constatadas. Do total de rótulos avaliados 94,6% apresentavam número de telefone, 48,5% caixa postal e 70,8% possuíam e-mail e/ou site da empresa.

O não cumprimento das legislações quanto aos dizeres de rotulagem evidenciou que ainda existem falhas na adequação dos rótulos dos alimentos das cestas básicas, apesar das legislações terem sido publicadas há anos.

CONCLUSÃO

Os dados obtidos neste estudo servem de subsídio às ações das Vigilâncias Sanitárias para garantir a qualidade dos produtos alimentícios que compõem as cestas básicas comercializadas nos municípios do estado de São Paulo e contribuem para promover discussões e ações relacionadas às necessidades de mudanças nas legislações vigentes, com vistas a garantir o acesso a alimentos seguros e saudáveis.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a colaboração dos bolsistas do PAP/SES-SP IAL São Paulo: Juliane dos Santos Soares, Paulo Hardt Constanzo e Lídia Berenice Chasin.

REFERÊNCIAS

1. Escoda MSQ. Segurança, cesta básica e planejamento. [acesso em 10 abr 2007]. Disponível em: [<http://www.ufrnet.br/~scorpius/39-cesta%20%basica%20e%20seg%20alim.htm>].
2. Cesta básica Procon – Histórico. [acesso em 15 mar 2007]. Disponível em: [<http://www.procon.sp.gov.br/categoria.asp?id=111>].
3. Menezes F. O conceito de segurança alimentar. [acesso 18 abr 2007]. Disponível em: [http://www.actionaid.org.br/img/publics/faces_cap3.pdf].
4. Beaux MR. Atlas de microscopia alimentar: identificação de elementos histológicos vegetais. 1 ed. São Paulo: Livraria Varela; 1997.
5. Fontes EAF, Fontes PR. Microscopia de Alimentos: Fundamentos Teóricos. Viçosa: Editora UFV; 2005.
6. Rodrigues RMMS, Martini MH, Chiarini PFT, Prado SPT. Matérias estranhas e identificação histológica em manjeronna (*Origanum majorana* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.) e salsa (*Petroselinum sativum* Hoffm.), em flocos, comercializados no Estado de São Paulo. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2005; 64(1): 25-30.
7. Prado SPT, Franco AR, Souza L, Oliveira MA, Correia M. Contaminação por matérias estranhas e microrganismos em farináceos comercializados em Ribeirão Preto, SP. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2005; 64(2): 237-44.
8. Graciano RAS, Atuí MB, Dimov MN. Avaliação das condições higiênico-sanitárias de cominho e pimenta do reino em pó comercializados em cidades do Estado de São Paulo, Brasil, mediante a presença de matérias estranhas. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2006; 65(3): 204-8.
9. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 175, de 08 de julho de 2003. Aprova o Regulamento Técnico de Avaliação de Matérias Macroscópicas e Microscópicas Prejudiciais à Saúde Humana em Alimentos Embalados. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 09 jul 2003. Seção 1.
10. Brasil. Secretaria de Vigilância Sanitária (SVS) do Ministério da Saúde. Portaria nº 326, de 30 de julho de 1997. Aprova o Regulamento Técnico sobre Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 01 ago 1997. Seção 1.
11. Brasil. Presidência da República, Casa Civil. Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1990. Presidência da República, Casa Civil. Dispõe sobre a proteção do consumidor e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, nº 176, 12 set 1990. Suplemento, p. 1-12.
12. Brígido BM, Freitas VPS, Mazon EMA, Martini MH, Passos MHCR. Avaliação da rotulagem e da qualidade físico-química de vegetais em conserva: alcachofra, aspargo e palmito. *Hig Aliment*. 2008; 22(165): 107-15.
13. Brasil. Decreto - Lei Federal nº 986, de 21 de outubro de 1969. Institui normas básicas sobre alimentos. Diário Oficial [da] União. Brasília, 21 out 1969, Seção 1, Parte I.
14. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 259, de 20 de setembro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico para Rotulagem de Alimentos Embalados. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 23 set 2002, p. 33-34.
15. Rodrigues RMMS, Atuí MB, Correia M, editores. Métodos de Análise Microscópica de Alimentos – Isolamento de elementos histológicos. São Paulo: Letras & Letras; 1999.
16. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Official Methods of Analysis of AOAC International, 18 ed., Gaithersburg; 2005. cap. 16. (1 CD-Rom)
17. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 359, de 23 de dezembro de 2003. Aprova o Regulamento Técnico de Porções de Alimentos Embalados para Fins de Rotulagem Nutricional. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 26 dez 2003.
18. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Aprova o Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 26 dez 2003.
19. Brasil. Lei nº 10.674, de 16 de maio de 2003. Obriga a que os produtos alimentícios comercializados informem sobre a presença de glúten, como medida preventiva e de controle da doença celíaca. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 19 maio 2003. p.1.
20. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 8, de 11 de junho de 2003. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e de Qualidade para a Classificação do Café Beneficiado Grão Cru. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 13 jun 2003. Seção 1, p. 4.
21. Athié I, Paula DC. Insetos de grãos armazenados aspectos biológicos e identificação. 2 ed. São Paulo: Varela Editora e Livraria Ltda; 2000.
22. Barcelos DC, Fatel ECS. Avaliação dos rótulos de alimentos contidos em 3 cestas básicas comercializadas nos supermercados do município de Cascavel-PR. [acesso em 14 jan 2009]. Disponível em: [http://www.fag.edu.br/tcc/2006/nutricao/avalia_307ao%20dos%20rotulos%20alimentos%20contido].

Qualidade proteica e eficiência alimentar de farinhas integrais de linhaça obtidas de sementes cruas e submetidas a tratamento térmico

Protein and food qualities of brown flaxseed whole flour from the raw and heat-treated seeds

RIALA6/1325

Érica Aguiar MORAES^{1*}, Júlia Cristina Cardoso CARRARO¹, Maria Inês de Souza DANTAS¹, Neuza Maria Brunoro COSTA², Sônia Machado Rocha RIBEIRO¹, Hercia Stampini Duarte MARTINO¹

*Endereço para correspondência: Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Nutrição e Saúde, Av. P.H. Rolfs s/n, Viçosa/MG, Brasil. CEP 36570-000. Fone: 31 3899-2545. E-mail: erica_moraes12@hotmail.com

¹Laboratório de Nutrição Experimental, Departamento de Nutrição e Saúde, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil

²Curso de Nutrição, Departamento de Zootecnia, Universidade Federal do Espírito Santo, CCA-UFES

Recebido: 22.04.2010 – Aceito para publicação: 17.12.2010

RESUMO

A linhaça é uma oleaginosa que desperta interesse pelo seu alto teor de compostos bioativos e proteínas, embora pouco se saiba sobre as possíveis interferências desses compostos na sua qualidade proteica. Neste estudo foram avaliadas a qualidade proteica e a concentração de compostos fenólicos e de fibra alimentar em farinhas integrais de linhaça marrom crua e submetida ao tratamento térmico (150°C por 15 minutos). A qualidade proteica foi analisada em ratos Wistar recém-desmamados. Houve aumento de 2,4% no teor de fenólicos totais e redução de 10% e 80%, respectivamente, nos teores de hexafosfato e pentafofato de mioinositol, quando a semente foi exposta ao tratamento térmico. O ganho de peso dos animais, o Coeficiente de Eficiência Alimentar, o Coeficiente de Eficiência Proteica e a Razão Proteica Líquida foram menores nos animais alimentados com dietas contendo linhaça, em comparação à caseína, porém, o tratamento térmico não interferiu na qualidade proteica da linhaça. Estudos futuros poderão esclarecer se o tratamento térmico utilizado não foi suficiente para inativar os fatores antinutricionais que afetam a digestibilidade das proteínas desse alimento.

Palavras-chave. qualidade proteica de alimentos, análises de alimentos, composição de alimentos, alimento funcional, compostos bioativos em alimentos.

ABSTRACT

Flaxseed is an oilseed that arises concerns for its high contents of bioactive compounds and proteins, although little is known about the presumable interference of these compounds in its protein quality. This study evaluated the protein quality, and the concentration of phenolic compounds and of dietary fiber in raw and heat-treated (150°C for 15 minutes) brown flaxseed whole flour. The protein quality was analyzed in weaned Wistar rats. When the seeds were exposed to heat treatment, an increase of 2.4% in the total phenolic contents and reductions of 10% and 80% were observed in the myo-inositol hexaphosphate and pentaphosphate contents, respectively. The weight gain of animals, the Food Efficiency Ratio, the Protein Efficiency Ratio and the Net Protein Ratio were lower in animals fed with flaxseed-containing diets, when compared with the casein diet, however the heat treatment did not affect the protein quality of flaxseed. Further studies might clarify whether the used heat treatment was not sufficient to inactivate the antinutritional factors that affect the protein digestibility of this food.

Key words. protein quality of foods, food analysis, food composition, functional food, bioactive compounds in foods.

INTRODUÇÃO

A linhaça é um alimento vegetal que oferece benefícios potenciais para a saúde por ser fonte de ácido α -linolênico, lignanas e fibra alimentar, propriedades estas que a qualificam como um alimento funcional. Estes nutrientes são relacionados à redução dos riscos de doenças cardiovasculares, melhoria da saúde do colón e propriedade anticarcinogênica dos fitoestrógenos^{1,2}.

A linhaça possui em sua composição química cerca de 30 a 40% de gordura, 20 a 25% de proteína, 20 a 28% de fibra alimentar total, 4 a 8% de umidade e 3 a 4% de cinzas³. As proteínas da linhaça são de boa qualidade, sendo comparadas às da soja, com concentrações consideráveis de arginina, ácido aspártico, ácido glutâmico e leucina. Entretanto, seu conteúdo de triptofano é inferior e apresenta teores mais elevados de aminoácido sulfurados^{4,5}.

Alimentos de origem vegetal podem conter quantidades significantes de componentes antinutricionais de origem não proteica, como compostos fenólicos, oligossacarídeos (α -galactosídeos), fitatos, taninos, glicosídeos cianogênicos, oxalatos e saponinas. Na fração albumínica das sementes são encontrados os fatores antinutricionais proteicos, como as lectinas, inibidores de alfa-amilase, inibidores de tripsina e inibidores de quimotripsina. Essas substâncias reduzem o valor nutricional dos alimentos por interferir na biodisponibilidade de minerais, na digestibilidade de proteínas e de carboidratos, podendo ter efeitos adversos na nutrição e saúde^{6,7,8}.

O emprego de métodos que diminuem a ação dos fatores antinutricionais é uma alternativa para o consumo de alimentos que possuem estes compostos. O tratamento térmico constitui um dos métodos que podem acarretar modificações na estrutura das proteínas com influência na digestibilidade e disponibilidade de aminoácidos, além da possibilidade de reestruturações químicas de outros componentes dos alimentos⁹. Carraro et al¹⁰ observaram preservação do ácido linolênico e capacidade antioxidante de farinhas de linhaça tratadas termicamente a 150°C durante 15 minutos. Porém, é necessário investigar o efeito deste tratamento na qualidade proteica da linhaça.

O objetivo deste estudo foi avaliar a digestibilidade, a qualidade proteica, eficiência alimentar e a concentração de fibra alimentar e de fitoquímicos com ação antinutriente em farinhas integrais de linhaça marrom crua e submetida a tratamento térmico.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparo das farinhas de linhaça

Para obtenção da farinha submetida ao tratamento térmico, as sementes foram expostas à temperatura de 150°C durante 15 minutos em estufa de circulação de ar. Em seguida, as sementes foram resfriadas, trituradas em liquidificador e peneiradas para homogeneização, conforme descrito por Moraes et al¹¹.

Determinação do teor de fenólicos totais, fitato e fibra alimentar das farinhas

As farinhas cruas e submetidas a tratamento térmico foram caracterizadas quanto ao teor de fitatos, fenólicos totais e fibras alimentares. O ácido fítico foi determinado em três repetições, por HPLC (Ultrasep, ES 100 RP18, Leonberg, Alemanha), como proposto por Sandberg e Ahderinne¹². O teor de fenólicos totais foi determinado utilizando-se o reagente de Folin-Ciocalteu, conforme descrito por Singleton et al¹³, em três repetições. Os fenólicos totais foram determinados por meio de curva padrão, $R^2 = 0,9964$ e $y = 30763x + 0,0818$, com concentração de ácido gálico variando de 0,01 a 0,1 g/L. Os teores de fibra alimentar total foram determinados em duplicata, pelo método enzimático gravimétrico descrito pela AOAC¹⁴.

Ensaio biológico

Dietas experimentais

A composição das dietas foi baseada na AIN-93G, segundo Reeves et al¹⁵, com o teor de proteínas alterado para 9% a 10%. Foram preparadas as dietas aprroteica, de caseína (padrão) e testes, cujas fontes proteicas foram fornecidas pela farinha de linhaça crua (FLC) e farinha de linhaça submetida a tratamento térmico (FLTT), seguindo as composições nutricionais ilustradas na Tabela 1.

Após o preparo, determinou-se o teor de proteína de cada dieta pelo método Kjeldhal, segundo AOAC¹⁴, sendo utilizado o fator 6,25 para cálculo de conversão do nitrogênio em proteínas.

Para a obtenção dos teores de proteínas recomendados para o estudo, não foi necessário o acréscimo de fibras e óleo de soja, sendo estes fornecidos pela farinha da semente de linhaça. Todas as dietas experimentais apresentaram densidade energética semelhante, aproximadamente de 3,9 kcal/g de dieta.

As dietas foram acondicionadas em embalagens de polipropileno, devidamente rotuladas e armazenadas em refrigerador, até a utilização no ensaio biológico.

O protocolo de trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais, MG, Brasil.

Tabela 1. Composição das dietas experimentais apteica, caseína, farinha de linhaça crua (FLC) e farinha de linhaça submetida a tratamento térmico (FLTT) (g.100g⁻¹ de mistura)

Ingredientes	Dietas			
	Apteica	Caseína	FLC	FLTT
Caseína	0	11,4	0	0
Linhaça crua	0	0	47,5	0
Linhaça submetida a tratamento térmico	0	0	0	45,4
Amido Dextrinizado	13,2	13,2	13,2	13,2
Sacarose	10,0	10,0	10,0	10,0
Óleo de Soja	7,0	7,0	0	0
Celulose	5,0	5,0	0	0
Mistura de Minerais	3,5	3,5	3,5	3,5
Mistura de Vitaminas	1,0	1,0	1,0	1,0
L-Cistina	0,3	0,3	0,3	0,3
Bitartarato de Colina	0,25	0,25	0,25	0,25
Amido de milho	59,7	48,3	24,3	26,4
% de proteína	nd	9,69	9,56	9,59
Densidade calórica (kcal.g ⁻¹)	3,95	3,87	3,91	3,93

nd = Não determinado

Animais

Foram utilizados 24 ratos machos (*Rattus norvegicus*, variedade *albinus*, classe *Rodentia*), linhagem Wistar, recém-desmamados, com média de 21 a 23 dias de idade, com peso corporal variando entre 57 a 62 g, com média de 59,4 g, provenientes do biotério do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa.

Os ratos foram alocados em gaiolas individuais de aço inoxidável, de modo que as médias dos pesos fossem semelhantes entre os grupos, sendo mantidos em condições de temperatura de 22 ± 3°C, com fotoperíodo de 12 horas.

Os animais foram divididos em quatro grupos com seis animais, os quais receberam as seguintes dietas: apteica, caseína, farinha de linhaça crua (FLC) e farinha de linhaça submetida a tratamento térmico (FLTT).

Durante o período de 14 dias os animais receberam as dietas experimentais e água deionizada *ad libitum*.

Desenho Experimental

No período experimental os animais foram pesados no 7º e 14º dias e determinou-se o Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA), Digestibilidade Verdadeira (DV), Coeficiente de Eficiência Proteica (PER) e Razão Proteica Líquida (NPR).

Coeficiente de eficiência alimentar (CEA) representa a relação entre o ganho de peso (g) e o consumo total de dieta pelos animais (g).

Para a determinação da digestibilidade, as dietas foram marcadas com corante índigo carmim na concentração de 0,2%. Estas dietas foram oferecidas aos animais no 7º e 10º dias. Foram coletadas as fezes do 8º ao 11º dias em recipientes individuais para cada animal e mantidas sob refrigeração.

Ao término do experimento, as fezes foram secas em estufa a 105°C por 24h. Em seguida, foram resfriadas, pesadas e trituradas em multiprocessador para determinação da concentração de nitrogênio, pelo método de Kjeldahl¹⁴, com amostras em triplicata.

A digestibilidade verdadeira foi calculada medindo-se a quantidade de nitrogênio ingerido na dieta, excretado nas fezes, e a perda metabólica nas fezes, que corresponde ao nitrogênio fecal do grupo com dieta apteica. Esta última foi estimada pela quantidade de nitrogênio excretado pelos ratos alimentados com a dieta livre de nitrogênio. A digestibilidade verdadeira relativa (R-DV) foi determinada considerando como 100% o resultado de DV da dieta de padrão (caseína).

O PER foi determinado considerando-se o ganho de peso do grupo-teste (g) em relação ao consumo de proteína do grupo teste (g), segundo método de Hegsted¹⁶, modificado para 14 dias. O coeficiente de eficiência proteica relativo (R-PER) foi determinado considerando como 100% o resultado de PER da dieta de padrão (caseína).

O NPR foi determinado, de acordo com Bender e Doell¹⁷, levando-se em consideração o ganho de peso do grupo-teste (g), mais a perda de peso do grupo com dieta apteica (g), em relação ao consumo de proteína do grupo-teste (g). A razão proteica líquida relativa (R-NPR) foi determinada considerando como 100% o resultado de NPR da dieta de padrão (caseína).

Análises estatísticas

Procedeu-se o teste-t ao nível de 5% de probabilidade para comparação entre as concentrações

de fenólicos totais e ácido fítico. Os dados foram expressos em valores médios e desvio padrão. A concentração de fibra alimentar foi expressa em valores médios, devido realização da análise em duplicata.

Para avaliar o efeito do tratamento térmico sobre as farinhas de linhaça cruas e tratadas, procedeu-se a análise de variância (ANOVA) para os parâmetros: consumo alimentar, nitrogênio ingerido, ganho de peso, coeficiente de eficiência alimentar, coeficiente de eficiência proteica, razão proteica líquida e digestibilidade verdadeira para determinação do valor de "F". Utilizou-se o teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade para comparação de cada grupo teste com o grupo caseína (testemunha). A dispersão da média foi expressa em desvio-padrão.

RESULTADOS

Os teores de fenólicos totais, de fibra alimentar, de hexafosfato de inositol (IP6) e de

pentafosfato de inositol (IP5) das farinhas de linhaça crua e submetida a tratamento térmico são apresentados na Tabela 2. Observou-se aumento de 2,4% no teor de fenólicos totais, quando a semente foi exposta ao tratamento térmico ($p < 0,05$). Entretanto, houve redução de 10% no teor de IP6 e de 80% do IP5 ($p < 0,05$).

Os dados de consumo alimentar, nitrogênio ingerido, ganho de peso e coeficiente de eficiência alimentar estão apresentados na Tabela 3. Não houve diferença de consumo alimentar e nitrogênio ingerido entre os grupos ($p \geq 0,05$). No entanto, o ganho de peso e o CEA apresentaram diferença ($p < 0,05$). O grupo de animais que recebeu dieta de caseína apresentou o maior ganho de peso (52g) e CEA (0,31) diferindo dos grupos de farinha de linhaça. Não foi observada diferença ($p \geq 0,05$) com relação ao ganho de peso e CEA entre o grupo de farinha de linhaça crua e farinha submetida a tratamento térmico.

Tabela 2. Teores de compostos fenólicos totais (FT) ($\text{mg EAG} \cdot 100\text{g}^{-1}$), fibra alimentar total (FAT) ($\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$) e ácido fítico (AF) ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) nas farinhas integrais de linhaça crua (FLC) e submetida a tratamento térmico (FLTT)

Farinhas	FT	FAT	AF	
			IP-6	IP-5
FLC	692,94 \pm 64,2 ^b	29,14	12,32 \pm 0,2 ^a	0,87 \pm 0,1 ^a
FLTT	709,72 \pm 37,9 ^a	29,83	11,08 \pm 0,2 ^b	0,17 \pm 0,0 ^b

Tabela 3. Consumo alimentar, nitrogênio ingerido, ganho de peso e coeficiente de eficiência alimentar (CEA) das dietas de caseína, farinha de linhaça crua (FLC) e farinha de linhaça submetida a tratamento térmico (FLTT)

Dietas	Consumo alimentar (g) *		Nitrogênio ingerido (g)*		Ganho de peso (g) *		CEA*	
Caseína	166,89	\pm 14,5 ^a	0,56	\pm 0,06 ^a	52,33	\pm 8,8 ^a	0,31	\pm 0,04 ^a
FLC	148,58	\pm 29,7 ^{aA}	0,47	\pm 0,12 ^{aA}	34,67	\pm 6,6 ^{bA}	0,23	\pm 0,02 ^{bA}
FLTT	141,81	\pm 12,5 ^{aA}	0,50	\pm 0,06 ^{aA}	29,33	\pm 5,2 ^{bA}	0,21	\pm 0,03 ^{bA}

*As médias seguidas de mesmas letras minúsculas nas linhas não diferem entre si, pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$); As médias seguidas de mesmas letras maiúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste F ($p < 0,05$)

A Tabela 4 apresenta os resultados de PER, NPR e digestibilidade das dietas de caseína, farinha de linhaça crua e farinha de linhaça submetida a tratamento térmico. Tanto PER quanto NPR da dieta de caseína apresentaram valores estatisticamente maiores do que os grupos de farinha de linhaça ($p < 0,05$). As dietas de farinha de

linhaça não diferiram entre si para PER e NPR ($p \geq 0,05$). A dieta de caseína apresentou digestibilidade de 93%, diferindo das dietas de linhaça ($p < 0,05$). A farinha crua apresentou digestibilidade de 74% e a farinha submetida a tratamento térmico foi de 73%, sendo que essas não apresentaram diferença entre si ($p \geq 0,05$).

Tabela 4. Média e desvio padrão de PER, NPR e digestibilidade das dietas de caseína, farinha de linhaça crua (FLC) e farinha de linhaça submetida a tratamento térmico (FLTT)

Parâmetros	Caseína	FLC	FLTT
PER*	3,23 ± 0,40 ^a	2,45 ± 0,24 ^{ba}	2,13 ± 0,33 ^{ba}
R-PER (%)**	100,00	75,81	65,94
NPR*	4,01 ± 0,38 ^a	3,38 ± 0,35 ^{ba}	3,06 ± 0,34 ^{ba}
R-NPR (%)**	100,00	84,28	72,30
Digestibilidade*	94,12 ± 0,90 ^a	74,34 ± 1,18 ^{ba}	73,63 ± 2,12 ^{ba}
R-Digestibilidade (%)**	100,00	78,98	78,22

*As médias seguidas de mesmas letras minúsculas nas linhas não diferem entre si, pelo teste de Dunnet ($p < 0,05$); As médias seguidas de mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste F ($p < 0,05$). **R-PER= PER relativo; R-NPR= NPR relativo; R-Digestibilidade= Digestibilidade verdadeira relativa

DISCUSSÃO

Os animais alimentados com dietas a base de farinha de linhaça crua e submetida ao tratamento térmico obtiveram menor ganho de peso, CEA, PER e NPR, quando comparados aos animais que receberam caseína, corroborando com os dados descritos na literatura^{18,19}.

Quanto ao percentual de adequação médio relativo à caseína, as farinhas de linhaça crua e tratada termicamente apresentaram R-PER de 76% e 66%, e R-NPR de 84% e 72%, respectivamente. Resultados inferiores foram observados por Leite et al¹⁸ em farinha de linhaça crua, com R-PER de 46%, e por Jacinto²⁰, em que o R-PER o R-NPR foram de 42% e 59%, respectivamente, em ratos Wistar recém-desmamados. Diferenças no perfil de aminoácidos e compostos antinutricionais podem explicar as distinções entre os resultados para a linhaça crua entre os estudos.

Ao analisar os valores de NPR observou-se um maior potencial da proteína de linhaça ser utilizada somente para a manutenção do peso corpóreo, isto, provavelmente, ocorreu em função da deficiência de aminoácidos essenciais da linhaça. Esse resultado foi similar ao de Soares et al²¹.

A DV das farinhas de linhaça crua e tratada foram inferiores à caseína. Tal fato, provavelmente, ocorreu em função da presença de fatores antinutricionais e da qualidade das proteínas. Métodos de processamentos térmicos em alimentos podem melhorar sua qualidade proteica por meio da reestruturação das proteínas ou pela redução de compostos antinutricionais²². Silva et

al²³ destacaram que a utilização do tratamento térmico a seco, 150°C/30 min, em grãos para a produção de farinhas de soja, resultou em maiores valores de PER, NPR e DV, podendo, este resultado, ser explicado pela redução de fatores antinutricionais. No entanto, no presente estudo, o tratamento térmico não resultou nessas alterações, pois as farinhas de linhaça dos diferentes tratamentos apresentaram índices de qualidade proteica semelhantes.

O tratamento térmico, provavelmente, não melhorou a qualidade proteica da farinha de linhaça, pois reduziu a concentração de IP-6 e IP-5, mas aumentou a concentração de fenólicos totais. Deste modo, pode ter ocorrido uma equivalência de efeito sobre o aproveitamento das proteínas.

CONCLUSÃO

As dietas contendo farinha de linhaça apresentaram qualidade proteica e coeficiente de eficiência alimentar, inferior à caseína. O tratamento térmico não interferiu na qualidade proteica da farinha de linhaça, uma vez que os índices biológicos, PER, NPR e DV não diferiram entre linhaça crua e tratada, embora a concentração de IP6 e IP5 tenha reduzido com o tratamento térmico.

REFERÊNCIAS

1. Pan A, Yu D, Demark-Wahnefried W, Franco OH, Lin X. Meta-analysis of the effects of flaxseed interventions on blood lipids. *Am J Clin Nutr*. 2009; 90(2):288-97.

2. Morri DH. Linaza - Una Recopilación sobre sus Efectos en la Salud y Nutrición; 2008: Available from URL: [http:// <http://www.flaxcouncil.ca/spanish/index.php?p=primer_spanish>](http://www.flaxcouncil.ca/spanish/index.php?p=primer_spanish). Acesso em 24/11/2008.
3. Coskuner Y, Karababa E. Some physical properties of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). *Food En*. 2007; 78(3):1067-73.
4. Chung MWY, Lei B, Li-Chan ECY. Isolation and structural characterization of the major protein fraction from NorMan flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). *Food Chem* 1998; 62(1):1-6.
5. Trevino J, Rodríguez ML, Ortiz LT, Rebolé A, Alzueta C. Protein quality of linseed for growing broiler chicks. *An Feed Sci Tech*. 2000; 84(3-4):155-66.
6. Del-Vechio G, Corrêa AD, Abreu CMP, Santos CD. Efeito do tratamento térmico em sementes de abóbora (*Cucúrbita* spp) sobre os níveis de fatores antinutricionais e/ou tóxicos. *Ciênc Agrotec*. 2005; 29(2); 369-76.
7. Carvalho MRB, Kirschnik PG, Paiva, KC, Aiura FS. Avaliação da atividade dos inibidores de tripsina após digestão enzimática em grãos de soja tratados termicamente. *Rev Nutr*. 2002; 15(3):267-72.
8. Duodu KG, Taylor JRN, Belton PS, Hamaker BR. Factors affecting sorghum protein digestibility. *J Cereal Sci*. 2003; 38(2):107-13.
9. Peluzio MCG, Batista ES. Proteínas. In Costa NMB, Peluzio MCG. *Nutrição Básica e Metabolismo*. Ed. UFV, Viçosa. 2008: 102-54.
10. Carraro JCC, Lucas CG, Morais DC, Moraes EA, Dantas MIS, Martino HSD et al. Efeito do tratamento térmico sobre a peroxidação lipídica, o teor de ômega-3 e fenólicos totais de sementes de linhaça escura. 10º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - SBAN. 2009; São Paulo- SP, p.4.
11. Moraes EA, Dantas MIS, Morais DC, Silva CO, Castro FAF, Martino HSD et al. Sensory evaluation and nutritional value of cakes prepared with whole flaxseed flour. *Ciênc Tecnol Aliment*. (No prelo) 2010.
12. Sandberg A, Ahderinne R. HPLC method for determination of inositol tri-, tetra-, penta-, hexaphosphates in foods and intestinal contents. *J Food Sci*. 1986; 51(3):547-50.
13. Singleton VL, Orhofer R, Lamauela-Raventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Meth Enz*. 1999; 299:152-78.
14. Association of Official Analytical Chemists- AOAC. *Official Methods of Analysis of the AOAC International*. 17 Ed. Maryland, 1997.
15. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of nutrition ad hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*. 1993;123:1939-51.
16. Hegsted DM. Protein quality and its determination. In: Whitaker, J.H; Tannenbaum, S.H, editors. *Food proteins*. Westport:AVI Publishing. 1977. p.347-62.
17. Bender AE, Doell BH. Note on the determination of net protein utilization by carcass analysis. *Brit J Nutr*. 1957; 11:138-43.
18. Leite CDFC, Muniz JM, Motta EFRO, Fernandes FS, Lenzi KC, Troína AA et al. Potencial protéico da linhaça (*Linum usitatissimum*) para ração de ratos em crescimento. In: 21 Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental FeSBE: Águas de Lindóia, SP, Brasil. Ago/2006.
19. Muniz JM, Motta EFRO, Cysneiros NC, Leite CDFC, Daleprane JB, Fernandes FS et al. Linhaça (*Linum usitatissimum*) como fonte protéica exclusiva: um estudo em ratos. In: 21 Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental FeSBE: Águas de Lindóia, SP, Brasil. Ago/2006.
20. Jacinto KA. Efeito do consumo de farinha de linhaça (*Linum usitatissimum*) no crescimento de ratos wistar e sua relação com a digestibilidade de globulinas e fatores antinutricionias protéicos nas albuminas. [dissertação de mestrado]. Rio Grande do Norte (RN): Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2007.
21. Soares LL, Pacheco JT, Brito CM, Troina AA, Boaventura GT, Guzmán-Silva MA. Avaliação dos efeitos da semente de linhaça quando utilizada como fonte de proteína nas fases de crescimento e manutenção em ratos. *Rev Nutr*. 2009;22(4);483-91.
22. Bressani R, Elias LG, Molina MR. Estudos sobre la digestibilidad de la proteína de varias especies de leguminosas. *Arch Latinoam Nutr*. 1977; 27:215-31.
23. Silva CO, Andrade GF, Dantas MIS, Costa NMB, Peluzio MCG, Martino HSD. Influência do processamento na qualidade protéica de novos cultivares de soja destinados à alimentação humana. *Rev Nutr*. 2010; 23(3):389-97.

Tratamento térmico adequado proporciona melhoria da qualidade nutricional de farinhas de soja elaboradas a partir de novos cultivares destinados à alimentação humana

Adequate heat treatment improves the nutritional quality of soybean flours from new cultivars for human consumption purpose

RIALA6/1326

Gláucia Ferreira ANDRADE¹, Maria Inês de Souza DANTAS¹, Newton Diniz PIOVESAN², Renato Moreira NUNES^{2,4}, Everaldo Gonçalves de BARROS², Neuza Maria Brunoro COSTA³, Hércia Stampini Duarte MARTINO^{1*}

*Endereço para correspondência: Departamento de Nutrição e Saúde, CCB-II. Universidade Federal de Viçosa, Av. P.H. Rolfs s/n, Viçosa/MG, Brasil. CEP 36570-000. Tel: 31 3899-3741 ou 2545. Fax: 31-38992541. E-mail: hercia@ufv.br

¹Departamento de Nutrição e Saúde, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil

²Departamento de Biologia Geral; BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil

³Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, Brasil

⁴Departamento de Nutrição, ICB, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brasil

Recebido: 26.05.2010 – Aceito para publicação: 29.12.2010

RESUMO

O efeito do calor seco sobre índices de urease, a solubilidade proteica e a desfosforilação de ácido fítico foram avaliados em grãos de diferentes cultivares de soja. Os grãos foram submetidos à temperatura de 130°C, 150°C e 170°C por 30 minutos e, posteriormente, triturados. Foram realizadas as análises de urease, da solubilidade proteica e dos teores de hexafosfato, pentafosfato, tetrafosfato e trifosfato de inositol. O tratamento a 130°C foi insuficiente para inativar a atividade da urease e a temperatura de 170°C ultrapassou o limite adequado; os valores desejáveis foram obtidas a 150°C. A solubilidade da proteína diferiu entre as temperaturas aplicadas ($p < 0,05$). O processamento térmico sob temperatura de 150°C indicou ser adequado por apresentar valores de solubilidade proteica entre 70% a 85%. O teor de hexafosfato de inositol foi 46% menor no cultivar convencional. Ocorreu redução média de 37,7% de IP6 no tratamento dos grãos de soja a 150°C, quando comparado a de 130°C. O tratamento térmico a 150°C por 30 minutos foi o melhor para processar a soja, proporcionar adequada solubilidade proteica na redução da atividade de urease, além de reduzir a concentração de inositóis hexa e penta-fosfatos, sem afetar a concentração dos inositóis tetra e trifosfato.

Palavras chaves. soja, urease, solubilidade proteica, ácido fítico.

ABSTRACT

The present work analyzed the effect of dry heat on grains from different soybean cultivars, and the indices of urease, protein solubility and dephosphorylation of phytic acid were determined. The grains were exposed to temperatures at 130°C, 150°C and 170°C for 30 minutes, and then powdered. Analyses of urease, protein solubility, and inositol hexaphosphate, pentaphosphate, tetraphosphate and triphosphate were carried out. The treatment of grains at 130°C was insufficient to inactivate the urease activity, while the temperature at 170°C exceeded the appropriate limit; at 150°C desirable values were observed. The protein solubility differed among the employed temperatures ($p < 0.05$). Heating processing at 130°C was not appropriate, but at 150°C indicated to be suitable temperature, as the protein solubility values were between 70% and 85%. Inositol hexaphosphate content was 46% lower in the conventional cultivar. An average reduction of 37.7% for the IP6 was observed in treating the soybean grains at 150°C, in comparison with 130°C. The heating treatment at 150°C for 30 minutes was the most adequate for processing the soybean, and for providing appropriate protein solubility, reduced urease activity and reduced concentration of inositol penta- and hexaphosphates, without affecting the inositol tetra- and tri-phosphates concentrations.

Key words. soybean, urease, protein solubility, phytic acid.

INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L) Merrill) é uma leguminosa muito valorizada economicamente devido à sua composição de nutrientes e fitoquímicos que a classifica como um alimento de alto valor nutricional e com alegação funcional¹. A proteína e o óleo correspondem a cerca de 40% e 20%, respectivamente, do grão de soja. A proteína é o maior bioproduto processado da soja². O consumo da soja tem sido verificado em diferentes grupos etários, uma vez que está associado à redução dos riscos de doenças crônicas não transmissíveis, como: diabetes mellitus, câncer, enfermidades cardiovasculares, osteoporose, dentre outras^{3,4}.

Entretanto, a soja contém componentes fitoquímicos com ação antinutricional, que podem influenciar a sua qualidade nutricional, como: fitato, inibidores de protease, lipoxigenases, oxalato, saponinas, hemaglutininas, entre outros⁵. O tratamento térmico tem sido utilizado como um método físico para inativar esses fatores, porém deve ser controlado para evitar a destruição de aminoácidos indispensáveis, o escurecimento de subprodutos de soja e favorecer a biodisponibilidade de minerais⁶.

Algumas análises específicas podem ser utilizadas para monitorar o processamento térmico da soja. A análise de atividade de urease indica a presença de fatores antinutricionais, como os inibidores de tripsina, sendo um bom indicador da adequabilidade do processamento térmico de produtos de soja. Os valores recomendados por alguns autores para atividade ureática em soja são de 0,05 a 0,3 unidades de pH^{7,8,9}.

Existe uma correlação direta da qualidade do processamento com a quantidade de proteína solúvel. A variação da solubilidade de 70 a 85% é descrita como processamento ideal, uma vez que valores abaixo de 70% e acima de 85% são indicativos de um processamento inadequado^{7,9,10}.

O fitato presente nos grãos de soja em concentrações entre 0,4 e 6,4%, constitui a principal forma de armazenamento do fosfato em sementes de leguminosas¹¹. A importância de quantificar a concentração dos diferentes compostos formados pela desfosforilação do fitato está baseada na capacidade do mioinositol pentafosfato (IP5) e do hexafosfato (IP6) formarem complexos insolúveis com minerais, proteínas e amidos, biologicamente indispensáveis para seres humanos em condições fisiológicas normais,

impedindo sua absorção no trato digestório^{12,13,14}. Porém, os demais compostos formados, tetrafosfato (IP4) e trifosfato (IP3), têm baixa capacidade de ligarse a minerais ou são mais solúveis, podendo ter efeito positivo na saúde humana, como ação antioxidante^{14,15,16}.

O tratamento térmico de grãos de soja anterior ao seu processamento para produção de farinhas é usual. Entretanto, não existe uma recomendação do melhor tempo e temperatura a ser aplicado aos grãos para inativar e/ou reduzir seus fitoquímicos com ação antinutricional, em detrimento daqueles com efeito funcional, preservando seus nutrientes. Níveis adequados de atividade de urease têm sido demonstrados em sojas submetidas à temperatura de 98°C por 30 minutos, sob calor úmido, 60°C por 42 horas e 121°C por 15 minutos, sob calor seco^{17,18,19}, indicando desnaturação do inibidor de tripsina. Entretanto, atividade de urease não é marcador indireto para hidrólise de ácido fítico. Assim, o presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito do calor seco em grãos de diferentes cultivares de soja nos índices de urease, solubilidade proteica e desfosforilação de ácido fítico.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados quatro cultivares de soja destinada à alimentação humana. Os cultivares Embrapa 48, BRS-155 e BRS-213, foram fornecidos pela EMBRAPA Soja de Londrina, PR, e o cultivar UFVTN 105 foi fornecido pelo Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa. A Embrapa 48 é um cultivar convencional, preferido pela indústria brasileira de extrato de soja. O cultivar BRS-155 apresenta teor reduzido de inibidor de tripsina e os cultivares BRS-213 e UFVTN 105 são isentos das enzimas lipoxigenases.

Os grãos de soja foram selecionados e submetidos ao processo de retirada de sujidades, manualmente. A seguir, quantidades iguais dos diferentes cultivares foram acondicionados em placas de petri, de tamanho padronizado, e colocados em estufa de secagem e esterilização da marca Tecnal (TE-393/2), a temperaturas de 130°C, 150°C e 170°C por 30 minutos. Os grãos foram resfriados à temperatura ambiente e acondicionados em embalagens plásticas.

Para obtenção da farinha integral de soja os grãos foram moídos em um miniprocessador e classificados em peneira de 60 mesh (0,250 mm).

Composição química centesimal

A quantificação dos teores de umidade, proteínas, lipídios, cinzas e carboidratos das farinhas de soja foi realizada segundo o método da AOAC²⁰.

Urease e Solubilidade Proteica

A determinação da atividade ureática foi realizada de acordo com o método de atividade de urease descrito pela AOCS²¹. A análise de solubilização da proteína foi baseada na solubilidade do nitrogênio em solução de hidróxido de potássio (KOH) 0,2% e o resultado foi expresso em porcentagem de nitrogênio solúvel em relação ao nitrogênio total²² adaptado por Machado et al¹⁸.

Determinação de Fitatos

Para a extração dos diferentes mio-inositol fosfatos, as farinhas de soja foram liofilizadas. A quantificação de fitatos foi realizada segundo a metodologia descrita pela AOAC²³ e o método cromatográfico (Par iônico, Ultrasep ES 100 RP18, 2 x 250 mm) proposto por Sandberg e Ahderinne²⁴.

Delineamento experimental

Utilizou-se o modelo fatorial 4 x 3, correspondente à combinação de 4 cultivares e 3 tratamentos, dispostos no delineamento inteiramente casualizados (DIC), com três repetições, em duplicata para os dados de atividade de urease e solubilidade proteica. Os dados de composição química centesimal e de ácido fítico foram apresentados

em valores médios em função das análises terem sido realizadas em replicatas.

Os dados foram interpretados por meio de variância (ANOVA) e as médias averiguadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$), utilizando o software Statistical Analysis Systems (SAS) licenciado pela Universidade Federal de Viçosa²⁵.

RESULTADOS

A composição centesimal, expressa em g.100g⁻¹ de farinha integral de soja dos quatro cultivares é apresentada na Tabela 1. O teor de proteína, entre os cultivares, variou de 36% a 39%, lipídios de 20% a 24%, umidade de 7% a 11%, cinzas de 4% a 6% e carboidrato de 23% a 29%.

Quanto à atividade de urease, não houve diferença significativa entre os cultivares (Tabela 2). No entanto, com relação ao tratamento térmico, a temperatura de 130°C diferiu ($p < 0,05$) das demais não sendo suficiente para inativar a atividade da urease em valores inferiores a 0,3 unidades de pH. Não houve diferença ($p > 0,05$) entre os tratamentos a 150°C e 170°C. Entretanto, o tratamento a 150°C apresentou valores desejáveis, dentro da classificação recomendada (0,3 a 0,05 unidades de pH), sendo a mais indicada neste caso. Os cultivares submetidos à temperatura de 170°C apresentaram atividade de urease inferior a 0,05 unidades de pH, indicando um possível superaquecimento (Tabela 2).

Tabela 1. Composição química dos quatro cultivares de soja, submetidos a diferentes tratamentos térmicos por trinta minutos

Temperatura (°C)	Farinha integral de soja (g.100g ⁻¹)											
	UFVTN 105			Embrapa 48			BRS-213			BRS-155		
	130	150	170	130	150	170	130	150	170	130	150	170
Umidade	10,7	7,1	8,4	10,2	7,4	9,7	9,8	7,7	9,2	7,7	7,6	7,5
Proteína	38,1	38,9	38,9	38,1	37,9	38,5	38,1	38,7	39,0	37,4	36,8	36,9
Lipídio	22,8	20,7	21,1	23,0	23,2	22,8	21,0	21,2	21,4	21,8	22,1	22,1
Cinzas	4,8	5,0	5,1	5,6	5,6	5,6	5,4	5,4	5,5	5,4	5,5	5,5
Carboidratos totais*	23,6	28,2	26,4	23,2	25,9	23,4	25,7	27,0	24,8	27,7	27,9	27,9

*Inclui a fração da fibra alimentar.

Tabela 2. Médias e desvio padrão da atividade de urease de cultivares de soja, em unidades de pH, submetidos a diferentes tratamentos térmicos por trinta minutos

Cultivares	Temperaturas (°C)		
	130	150	170
UFVTN 105	0,78 ± 0,32 ^{Aa}	0,12 ± 0,17 ^{Ba}	0,02 ± 0,005 ^{Ba}
Embrapa 48	0,67 ± 0,25 ^{Aa}	0,12 ± 0,09 ^{Ba}	0,02 ± 0,01 ^{Ba}
BRS-213	1,08 ± 0,73 ^{Aa}	0,04 ± 0,05 ^{Ba}	0,02 ± 0,01 ^{Ba}
BRS-155	1,42 ± 0,18 ^{Aa}	0,19 ± 0,28 ^{Ba}	0,01 ± 0,01 ^{Ba}

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

A solubilidade da proteína não diferiu ($p > 0,05$) entre os cultivares de soja, porém diferiu ($p < 0,05$) entre os tratamentos (Tabela 3). O processamento térmico a temperatura de 130°C não foi adequado, pois a solubilidade permaneceu acima de 85%, valor de referência limite para avaliar a qualidade proteica²⁶. Na temperatura de 150°C, a solubilidade proteica dos cultivares de soja variou entre 70 a 85%, indicando processamento térmico adequado, para preservar a qualidade proteica.

Os teores de mioinositol hexafosfato (IP6), pentafofosfato (IP5), tetrafofosfato (IP4), e trifosfato (IP3) ($\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$) dos cultivares submetidos a diferentes tratamentos térmicos em base seca são apresentados na Tabela 4. A análise de fitato não foi realizada no tratamento a 170°C, em decorrência da baixa

solubilidade proteica e da atividade ureática inferior a 0,05 unidades de pH. Observou-se redução de 37,7% na concentração de IP6 no tratamento dos grãos de soja a 150°C por 30 minutos, em relação ao tratamento a 130°C por 30 minutos.

Os cultivares sem lipoxigenases, UFVTN 105 e BRS-213, apresentaram concentrações de inositóis semelhantes, com redução da concentração de IP6 de 47,4% e 33,1%, respectivamente, no tratamento a 150°C em comparação ao 130°C. A concentração de fitato foi em média 42% menor no cultivar convencional, em comparação aos cultivares sem lipoxigenases, no entanto, o cultivar convencional não apresentou IP3 e ínfimas concentrações de IP4. O cultivar sem inibidor de tripsina, BRS-155, apresentou concentração de IP6 semelhante ao cultivar UFVTN 105 tratado a 150°C.

Tabela 3. Médias e desvio padrão da solubilidade proteica de cultivares de soja, em KOH (%), submetidos a diferentes temperaturas por trinta minutos

Cultivares	Tratamento (°C)		
	130	150	170
UFVTN 105	89,62 ± 2,42 ^{Aa}	79,35 ± 6,27 ^{Ba}	52,63 ± 15,16 ^{Ca}
Embrapa 48	88,30 ± 6,27 ^{Aa}	80,63 ± 7,33 ^{Ba}	42,19 ± 7,14 ^{Ca}
BRS-213	91,97 ± 3,69 ^{Aa}	81,50 ± 0,92 ^{Ba}	41,66 ± 9,06 ^{Ca}
BRS-155	85,74 ± 5,08 ^{Aa}	80,91 ± 2,65 ^{Ba}	41,63 ± 8,43 ^{Ca}

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Tabela 4. Médias das concentrações de mioinositol hexafosfato (IP6), pentafofosfato (IP5), tetrafosfato (IP4), e trifosfato (IP3) (g.100g-1) em base seca, para as diferentes cultivares de soja, submetidas a diferentes tratamentos térmicos

Cultivares	Tratamentos	IP6	IP5	IP4	IP3	Fitato total
UFVTN 105	130°C	1,57	0,44	0,21	0,07	2,29
	150°C	0,83	0,47	0,22	0,07	1,59
Embrapa 48	130°C	0,90	0,13	0,03	-	1,06
	150°C	0,62	0,12	0,04	-	0,78
BRS-213	130°C	1,51	0,46	0,21	0,07	2,25
	150°C	1,01	0,43	0,23	0,08	1,75
BRS-155	130°C	1,35	0,42	0,12	0,03	1,92
	150°C	0,82	0,43	0,12	0,03	1,4

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos, referente à composição química centesimal dos quatro cultivares de soja, situam-se dentro da faixa encontrada por Esteves et al²⁷ e Monteiro et al²⁸. Entretanto, Machado et al¹⁸ encontraram maior concentração de proteína e menor concentração de lipídios em cultivares de soja convencionais e cultivares livre de lecitina e do inibidor de tripsina Kunitz. Mendes et al²⁹ encontraram valores superiores de proteína e de lipídios em cultivares com e sem a presença de lipoxigenases e inibidores de tripsina Kunitz. Moraes et al³⁰ estudaram o cultivar UFVTN 105 e encontraram valores semelhantes de composição química centesimal desse cultivar sem lipoxigenase. Ciabotti et al³¹ encontraram valores inferiores de proteínas e de lipídios no cultivar BRS-213, sem lipoxigenase, em relação ao presente estudo. Vale ressaltar que as diferenças na composição química das sojas podem ocorrer devido aos diferentes tipos de solo, localização geográfica, cultivares e práticas agrônômicas, dentre outros fatores.

O elevado teor de lipídio encontrado nos cultivares de soja é uma vantagem, visto que uma das principais formas de utilização da soja é para extração de óleos, aos quais podem ser amplamente utilizados na indústria de alimentos para produção de óleos e gorduras comestíveis²⁷.

O presente estudo encontrou que o tratamento térmico dos grãos de soja, em calor seco, a 150°C por 30 minutos, permitiu uma adequada atividade de urease em

farinha de soja, estando os valores dentro do recomendado por alguns autores, 0,05 a 0,3 unidades de pH. Esse resultado indica que o tratamento térmico foi adequado para inativar inibidor de tripsina^{7,8,9}. Níveis adequados de atividade de urease em sojas submetidas à temperatura de 98°C por 30 minutos, em calor úmido, 60°C por 42 horas e 121°C por 15 minutos, em calor seco, também foram observados, respectivamente, por Olguin et al¹⁷, Machado et al¹⁸ e Ramos et al¹⁹. Valores de atividade de urease inferiores a 0,12 unidades de pH indicaram adequada inativação de inibidores de tripsina¹⁸.

Não foi observada diferença estatística entre os cultivares, quanto à atividade de urease nos diferentes tratamentos térmicos, mesmo no cultivar com baixo teor de inibidor de tripsina (BRS-155) e com ausência de lipoxigenase (BRS-213 e UFVTN 105), indicando que o tratamento térmico adequado foi suficiente para inativar o inibidor de tripsina, independente do melhoramento genético do cultivar. Carvalho et al³² mostraram em seus estudos que a eliminação genética da lipoxigenase da semente de soja causou uma diminuição nos níveis de inibidor de tripsina nos grãos.

O presente estudo demonstrou que a inativação do inibidor de tripsina é possível, mesmo no cultivar convencional. Sabendo que estes cultivares foram desenvolvidos para a alimentação humana, todos deverão passar por um processamento físico, como o calor, para serem consumidos, tornando-os favoráveis ao consumo quando submetidos à temperatura adequada.

A temperatura de 150°C por 30 minutos também foi adequada para preservar a qualidade proteica dos cultivares de soja, uma vez que a solubilidade proteica variou entre 70 a 85%, indicando um processamento térmico adequado^{7,9,10}. Silva et al³³ avaliaram a qualidade proteica dos mesmos cultivares de soja do presente estudo, tratados também nas mesmas condições, a 130°C e 150°C por 30 minutos, em calor seco, realizando um ensaio biológico com rato *Wistar* recém-desmamados. Os autores encontraram que as farinhas de soja em que os grãos foram tratados a 150°C por 30 minutos, apresentaram melhores índices de qualidade proteica do que aqueles tratados a 130°C por 30 minutos, confirmando o resultado da análise química do presente estudo.

Perilla et al³⁴ estudaram o efeito da temperatura de processamento de extrusão úmida sobre a qualidade da proteína e constataram que a temperatura de 126°C por 20 minutos reduziu o conteúdo de fatores antitripsínicos em 97%. A temperatura de 140°C por 20 minutos destruiu por completo estes fatores antinutricionais, mas reduziu a solubilidade da proteína em KOH até 67%, nível considerado inaceitável.

No presente trabalho, foi observada redução média de 37,7% de IP6 no tratamento dos grãos de soja a 150°C por 30 minutos, em relação ao tratamento a 130°C por 30 minutos. O processamento térmico dos grãos proporcionou desfosforilação parcial do inositol hexafosfato, produzindo compostos intermediários como o penta-fosfato (IP5), tetra-fosfato (IP4), tri-fosfato (IP3), di-fosfato (IP2) e mono-fosfato (IP1) de inositol, sendo essa uma vantagem do tratamento térmico adequado, uma vez que, somente o IP5 e IP6 têm demonstrado efeito negativo na biodisponibilidade de minerais^{14,35}. Os demais compostos formados têm baixa capacidade de ligar-se a minerais ou são mais solúveis¹¹. Portanto, o tratamento a 150°C por 30 minutos proporcionou efeito importante do ponto de vista nutricional, redução dos fitoquímicos IP6 e IP5, especialmente nos cultivares sem lipoxigenas, e aqueles com reduzido teor de inibidor de tripsina; e manutenção dos níveis de IP3 e IP4 que apresentam alegação de propriedade funcional, como potencial antioxidante^{13,14,15,16}.

A concentração de IP6, apesar de 42% menor no cultivar convencional, em comparação aos cultivares sem lipoxigenases, se concentrou nas frações IP6 e IP5 com efeito antinutricional. Segundo Souza³⁶, a variação na concentração de fitato dos grãos de soja são devidos ao genótipo, a variação nas condições ambientais, na dose aplicada de fertilizantes, no armazenamento e nos

métodos de determinação. Analisar a concentração de fitato pelas concentrações de mioinositóis é importante para identificar as frações que têm impacto negativo na biodisponibilidade de nutrientes distinguindo das frações com potencial antioxidante.

O inibidor de tripsina, embora não tenha sido analisado neste estudo, é um fator antinutricional que afeta a digestibilidade da proteína. Ele é termicamente instável, mas o tratamento térmico excessivo pode causar perda de aminoácidos essenciais como lisina, arginina e cisteína, além de promover o escurecimento dos subprodutos de soja^{6,37}. No presente estudo, provavelmente, o calor seco a 150°C por 30 minutos inativou este composto, em função da baixa atividade de urease, sem afetar a solubilidade proteica entre os cultivares estudados. Carvalho³⁸ verificou que a atividade de urease do cultivar UFTN 105AP, tratado a 150°C por 30 minutos, inativou completamente o inibidor de tripsina, sendo a análise da atividade de urease um bom preditor da inativação do inibidor de tripsina.

CONCLUSÃO

O tratamento térmico dos cultivares de soja, utilizando calor seco na temperatura de 150°C por 30 minutos, foi o mais apropriado para o processamento de farinhas de soja, pois proporcionou adequada solubilidade proteica e redução da atividade de urease, indicando inativação do inibidor de tripsina. Além disso, promoveu a desfosforilação do ácido fítico, reduzindo a concentração de inositóis hexa e penta-fosfatos que têm ação antinutricional, sem afetar a concentração dos inositóis tetra e tri-fosfato, que são fitoquímicos com propriedade antioxidante.

Este achado foi de grande importância na área de processamento da soja, uma vez que, independente do melhoramento genético, o tratamento térmico adequado proporcionou melhoria na qualidade nutricional entre os cultivares de soja para o consumo humano.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela concessão da bolsa de iniciação científica (PIBIC/CNPq/UFV). Ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) e a Dra. Mercedes C. Carrão-Panizzi da Embrapa soja de Londrina, Paraná pela disponibilização dos cultivares de soja.

REFERÊNCIAS

1. Wilson TA, Nicolosi RJ, Kotyla T, Fleckinger B. Soy protein without isoflavones reduces aortic total and cholesterol ester concentrations greater than soy protein with isoflavones compared with casein in hypercholesterolemic hamsters. *Nutr Res*. 2007;27(8):498-504.
2. Bolon YT, Joseph B, Cannon SB, Graham MA, Diers BW, Farmer AD et al. Complementary genetic and genomic approaches help characterize the linkage group I seed protein QTL in soybean. *BMC Plant Biol*. 2010;3:10-41.
3. Lee SJ, Ahn JK, Khanh TD, Chun SC, Kim SL, Ro HM et al. Comparison of isoflavone concentrations in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) sprouts grown under two different light conditions. *J Agric Food Chem*. 2007;55:9415-21.
4. Xiao CW. Health effects of soy protein and isoflavones in humans. *J Nutr*. 2008;138:1244S-9S.
5. Martino HSD, Martins BR, Weaver CM, Bressan J, Esteves EA, Costa NMB. Zinc and iron bioavailability of genetically modified soybeans in rats. *J Food Sci*. 2007;72(9):689-95.
6. Huang H, Kwok KC, Liang HH. Inhibitory activity and conformation changes of soybean trypsin inhibitors induced by ultrasound. *Ultrasonics Sonochem*. 2008;15:724-30.
7. Mendes WS, Silva IJ, Fontes DO, Rodriguez NM, Marinho PC, Silva FO et al. Composição química e valor nutritivo da soja crua e submetida a diferentes processamentos térmicos para suínos em crescimento. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2004;56(2):207-13.
8. Wiriyaumpaiwong S, Soponronnarit S, Prachayawarakorn S. Comparative study of processes for full-fat soybeans. *J Food Engin*. 2004;65:371-82.
9. Brito CO, Albino LFT, Rostagno HS, Gomes PC, Dionizio MA, Carvalho DCO. Adição de complexo multienzimático em dietas à base de soja extrusada e desempenho de pintos de corte. *Rev Bras Zootec*. 2006;35(2):457-61.
10. Oliveira FN, Costa FGP, Silva JHV, Brandão PA, Júnior VSA, Nascimento GAJ et al. Desempenho de frangos de corte nas fases de crescimento e final alimentados com rações contendo soja integral extrusada em diferentes temperaturas. *Rev Bras Zootec*. 2005;34(6):1950-5.
11. Oliveira AC, Reis SMPM, Carvalho EM, Pimenta FMV, Rios KR, Paiva KC et al. Adições crescentes de ácido fítico à dieta não interferiram na digestibilidade da caseína e no ganho de peso em ratos. *Rev Nutr Campinas*. 2003;16(2):211-7.
12. Martinez-Valverde I, Periago M, Ros G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Arch Latinoam Nutr*. 2000;50(1):5-18.
13. Martinez-Dominguez B, Gomes MVI, León FR. Ácido fítico: aspectos nutricionales e implicaciones analíticas. *Arch Latinoam Nutr*. 2002;52(3):219-31.
14. Kumar V, Sinha AK, Makkar HPS, Becker K. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. *Food Chem*. 2010;120:945-59.
15. Quirrenbach HR, Kanumfre F, Rosso ND, Carvalho Filho MA. Comportamento do ácido fítico na presença de Fe(II) e Fe (III). *Ciênc Tecnol Alim*. 2009;29(1):24-32.
16. Filgueiras CT, Soares AL, Shimokomaki M, Ida EI. Avaliação da atividade antioxidante do ácido fítico de germe de milho. *Quím Nova*. 2009;32(7):1787-91.
17. Olguin MC, Hisano N, D'Ottavio AE, Zingale MI, Revelant GC, Calderari SA. Nutritional and antinutritional aspects of fan Argentinian soy flour assessed on weanling rats. *J Food Composit Anal*. 2003;16:441-9.
18. Machado FPP, Queiróz JH, Oliveira MGA, Piovesan ND, Peluzio MCG, Costa NMB et al. Effects of heating on protein quality of soybean flour devoid of Kunitz inhibitor and lectin. *Food Chem*. 2008;107(2):649-55.
19. Ramos N, Lúquez J, Eyherabide G. Calidad de la harina de soja sometida a distintos tratamientos térmicos para inactivar los factores antinutricionales. *Tecnol Proces*. 2006:681-3.
20. AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of the AOAC International. 16th ed. Maryland, 1997.
21. AOCS. American Oil Chemists Society. Tentative method Ba 9-58 - Urease activity. In: Smith AK, Circle SJ. Soybeans: chemistry and technology. 1978; 1:454-5.
22. Brasil. Diário Oficial da União. Portaria de 4 de setembro de 1991 que estabelece os Métodos Analíticos para Controle de Alimentos para uso Animal. DOU número 108 de 17 de setembro de 1991. 1991; 19813.
23. AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of the AOAC International. 15th ed. Washington, DC. 1990.
24. Sandberg A, Ahderinne R. HPLC method for determination of inositol tri-, tetra-, penta-, hexaphosphates in foods and intestinal contents. *J Food Sci*. 1986;51:547-50.
25. SAS. System for Windows. Version 9.00. Cary, North Carolina: SAS Institute, 2002.
26. Araba M, Dale NM. Evaluation of protein solubility as an indicator of overprocessing of soybeans meal. *Poult Sci*. 1990;69: 76-82.
27. Esteves EA, Martino HSD, Oliveira FCE, Bressan J, Costa NMB. Chemical composition of a soybean cultivar lacking lipoxygenases (lox2 and lox3). *Food Chem*. 2010;122(1):238-42.
28. Monteiro MRP, Costa NMB, Oliveira MGA, Pires CV, Moreira MA. Qualidade proteica de linhagens de soja com ausência do Inibidor de Tripsina Kunitz e das isoenzimas Lipoxygenases. *Rev Nutr*. 2004;17(2):195-205.
29. Mendes FQ, Oliveira MGA, Cardoso LR, Costa NMB, Sant'ana RCO. Digestibilidade proteica e caracterização bromatológica de linhagens de soja com ausência ou presença do inibidor de tripsina kunitz e das isozimas lipoxygenases. *Biosci J*. 2007;23(1):14-21.
30. Moraes RMA, José IC, Ramos FG, Barros EG, Moreira MA. Caracterização bioquímica de linhagens de soja com alto teor de proteína. *Pesq Agropec Bras*. 2006;41(5):725-9.
31. Ciabotti S, Barcellos MFP, Mandarino JMG, Tarone AG. Avaliação química e bioquímica dos grãos, extratos e tofus de soja comum e de soja livre de lipoxygenase. *Ciênc Agrotéc*. 2006;30(5):920-9.
32. Carvalho WL, Oliveira MGA, Barros EG, Moreira MA. Lipoxygenases affect protease inhibitor levels in soybean seeds. *Plant Physiol Biochem*. 1999;37:497-501.
33. Silva OC, Andrade GF, Dantas MIS, Costa NMB, Peluzio MCG, Martino HSD. Influência do processamento na qualidade proteica de novos cultivares de soja destinados à alimentação humana. *Rev Nutr*. 2010; 23(3):389-97.

34. Perilla NS, Cruz MP, de Belalcázar F, Diaz GJ. Effect of temperature of wet extrusion on the nutritional value of full-fat soybeans for broiler chickens. *Brit Poultry Sci*. 1997;3(4)8:412-6.
35. Silva MR, Silva MAAP. Aspectos nutricionais de fitatos e taninos. *Rev Nutr*. 1999;12(1):5-19.
36. Souza CMMCA. Mecanismos fisiológicos e bioquímicos de regulação da biossíntese de ácido fítico em grãos de dois genótipos de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris L.*). [tese de doutorado] Piracicaba: 2003. Universidade de São Paulo.
37. Kumar V, Rani A, Pandey V, Chauhan GS. Changes in lipoxygenase isozymes and trypsin inhibitor activity in soybean during germination at different temperatures. *Food Chem*. 2006;99:563-8.
38. Carvalho AW. Caracterização nutricional, biodisponibilidade de ferro e qualidade protéica de novo cultivar de soja sem lipoxigenases e de elevado teor protéico. [dissertação de mestrado]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2009.

Índices de qualidade nutricional da fração lipídica do leite de búfalas da raça Murrah produzido em diferentes fases de lactação

Nutritional quality indexes of lipid fraction of milk of Murrah buffalo, produced at different stages of lactation

RIALA6/1327

Luciana Albuquerque CALDEIRA^{1*}, Sibelli Passini Barbosa FERRÃO², Sérgio Augusto de Albuquerque FERNANDES², Ana Prudência Assis MAGNAVITA³, Tayse Dantas Rebouças SANTOS³

* Endereço para correspondência: ¹Departamento de Ciências Agrárias, DCA. Universidade Estadual de Montes Claros/ UNIMONTES, Campus Janaúba, Avenida Reinaldo Viana, 2630, Bico da Pedra, Janaúba, MG, Brasil. CEP: 39440-000. Fone: 3838213823. E-mail: luburq@yahoo.com.br

²Departamento de Tecnologia Rural e Animal/DTRA, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia/UESB, Itapetinga, BA, Brasil

³Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia/UESB, Itapetinga, BA, Brasil

Recebido: 27.07.2010 – Aceito para publicação: 29.12.2010.

RESUMO

As características do leite de búfalas da raça Murrah foram investigadas, utilizando-se como parâmetros a composição, com ênfase no perfil de ácidos graxos. As análises de composição foram realizadas por meio de equipamento Bentley 2000[®], o perfil de ácidos graxos por cromatografia gasosa e a qualidade da fração lipídica foi avaliada, utilizando-se os índices nutricionais, através do perfil de ácidos graxos. A composição do leite de búfala sofreu influência da fase de lactação, com aumento de teor de gordura e redução da lactose no terço final da lactação. No total de ácidos graxos presentes no leite de búfala, as maiores concentrações de ácidos saturados foram encontrados no início da lactação. No final da lactação houve aumento da concentração de ácidos monoinsaturados. Considerando-se o perfil lipídico, a melhor qualidade nutricional foi observada na fase final de lactação.

Palavras-chave. composição, índices nutricionais, ácidos graxos

ABSTRACT

The buffalo milk quality was evaluated based on the milk composition parameter, giving the emphasis to the profile of fatty acids at the early and the late lactation phases. The composition analysis was carried out by the equipment Bentley 2000[®]. The fatty acids profile was analyzed by means of gaseous chromatography. The quality of the lipid fraction was evaluated based on the data of fatty acids composition, using nutritional index. The milk composition was affected by lactation phase, considering the fat increase, and lactose reduction at third part of late lactation. In the total of fatty acid contents in milk, the highest rates of saturated acid concentrations were found in the early lactation. The increased monounsaturated acid concentration was observed in the late lactation phase. Taking into account the lipid profile, the best nutritional quality was observed at the final phase of lactation.

Key words composition, nutritional quality, lipids

INTRODUÇÃO

A composição lipídica do leite possui importância fundamental nas qualidades tecnológicas e nutricionais. Ainda está envolvida na produtividade, firmeza e cor dos produtos, além do envolvimento com o sabor dos mesmos. Atualmente, outra variável tem sido associada aos lipídios do leite, suas características nutracêuticas para os humanos^{1,2}.

O teor médio de gordura no leite de búfalas situa-se entre 6 e 8%³⁻⁸. Por sua vez, o teor de proteína bruta no leite de búfalas situa-se entre 3,8% e 4,5%^{4-6,8}. De forma geral, o teor de gordura e proteína bruta no leite de búfalas logo após o parto é elevado, sendo seguido por diminuição, voltando ao final da lactação a se elevar. No entanto, a lactose, principal carboidrato no leite, é o componente que menos varia, devido à sua osmolalidade⁹. O teor médio de lactose no leite de búfalas é de 5,2%, com elevação no pico da lactação^{4,5,8}.

Parte dos ácidos graxos secretados no leite de bovídeos é obtida como ácidos graxos pré-formados (oriundos da dieta ou mobilizado das reservas corporais) do sangue. Cerca de 40% do ácido palmítico e os ácidos graxos com 18 ou mais átomos de carbono possuem esta origem, sofrendo, assim, importante influência da dieta e estágio de lactação. Em ruminantes, as reservas corporais (adipócitos, tecido muscular e glicogênio) são úteis em condições de déficit nutricional, observado mais especificamente na fase inicial da lactação. Assim, quando o animal se encontra em balanço energético negativo, observam-se maiores teores de ácidos graxos não esterificados (AGNE) no plasma sanguíneo. Os triglicerídeos encontrados nos adipócitos armazenam o ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0) e ácido oleico (C18:1). Dessa forma, sua mobilização irá fornecer estes ácidos graxos para os processos metabólicos da glândula mamária, sendo esta a fonte de 59% do C_{18:0} e C_{18:1}¹⁰.

Outra parte dos ácidos graxos presentes no leite de bovídeos, como os de cadeia curta (C4:0-C10:0) e média (C12:0-C16:0) são sintetizados na própria glândula mamária (*síntese de novo*), a partir de acetato e b-hidroxibutirato¹¹.

Fatores dietéticos também exercem influência sobre o perfil lipídico do leite de ruminantes, alterando-o. Assim, podem ser considerados: i) a espécie forrageira, que pode disponibilizar mais ou menos ácidos graxos poli-insaturados para o processo de biohidrogenação no rúmen, em especial o ácido linoleico (C18:2c9,c12) e o ácido alfa e/ou gama linolênico (C18:3)^{12,13}; ii) a forma de oferecimento da mesma (fresca ou conservada sob a forma de feno ou ensilada),

visto que, o processamento das forrageiras pode diminuir ou indisponibilizar ácidos graxos para o animal^{12,14}; iii) a concentração lipídica da dieta, pois dietas ricas em ácidos graxos poli-insaturados, refletirão sobre a composição dos produtos carne e leite, produzindo mais ácidos graxos com efeito nutracêutico, como o ácido rumênico (C18:2c9,t11)¹⁵.

É crescente o número de informações sobre a influência da gordura do leite sobre a saúde humana e estudos neste sentido têm orientado as autoridades mundiais na área de saúde pública. Estas têm recomendado à população não consumir mais que 7-10% das calorias diárias oriundas de ácidos graxos saturados, menos de 300 mg/dia de colesterol e evitar ao máximo a ingestão de ácidos graxos *trans*. Nesse sentido, têm-se buscado diminuir a concentração de ácidos graxos saturados nos produtos de origem animal, em especial os comprovadamente relacionados com problemas de saúde, como o ácido láurico (C12:0), mirístico (C14:0) e palmítico (C16:0)¹⁶.

Embora o leite apresente alta concentração de ácidos graxos saturados, a literatura tem indicado que, no perfil da gordura do leite, há vários compostos benéficos a saúde humana¹⁷. Os ácidos graxos poli-insaturados, como os da série ômega-3, e o ácido linoleico conjugado (CLA) estão relacionados à redução na incidência de doenças cardiovasculares, prevenção e tratamento de tumores e da osteoporose^{1,2}.

Fatores dietéticos relacionados com a incidência de doenças crônicas, dentre elas as cardiovasculares, incluem aqueles ligados a composição da gordura dietética, que podem exercer efeitos promotores e/ou protetores dessas doenças. A avaliação da qualidade nutricional desta gordura tem sido realizada, com base na composição de ácidos graxos, por meio da determinação de índices que relacionam o conteúdo de ácidos saturados, monoinsaturados, poli-insaturados séries w-6 w-3¹⁸.

Baseados em estudos científicos foram desenvolvidos índices que auxiliam na avaliação nutricional dos alimentos, destacando os índices de aterogenicidade (IA) e trombogenicidade (IT), ambos relacionados à fração lipídica dos mesmos. Os alimentos de origem animal possuem IA em faixas bem estabelecidas. Assim, a gordura da carne possui valores entre 0,5 e 1,0, enquanto a gordura do leite possui valor ao redor de 2,0¹⁹. Esta diferença se relaciona à diferença no perfil de ácidos graxos entre estes alimentos, visto que, o leite possui concentração maior de ácidos graxos de cadeia curta (C4 a C10) e média (C12 a C16), enquanto nos tecidos de ruminantes são observados ácidos graxos de cadeia média e longa²⁰.

O leite e seus derivados podem ser denominados como alimentos funcionais, pois além de serem fontes de energia, proteínas de alta qualidade e certa variedade de vitaminas e minerais, alguns estudos mostraram contribuição destes na prevenção e tratamento de algumas doenças²¹. Dada a exiguidade de informações quanto à qualidade nutricional do leite de búfala, objetivou-se com este trabalho avaliar a qualidade do leite de búfalas, utilizando como parâmetros o perfil de ácidos graxos e a composição do leite de animais da raça Murrah nas fases inicial e final da lactação.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em uma fazenda localizada no município de Uruçuca, região Sul da Bahia. O leite utilizado foi obtido de 13 búfalas da raça Murrah de um único rebanho, alimentadas em pasto de *Brachiaria decumbens*, sem suplementação volumosa ou concentrada, por meio da ordenha mecânica com balde ao pé.

As amostras foram coletadas nos meses de junho e outubro de 2007. No início das coletas, todas as búfalas encontravam-se com mais de 60 dias em lactação. Após a ordenha de cada animal, o leite do latão foi homogeneizado por agitação manual com haste de aço inox, procedendo-se a coleta das amostras em frascos plásticos esterilizados com capacidade para 60 mL, contendo pastilha de conservante bronopol, e enviadas sob refrigeração (caixa isotérmica com gelo reciclável), a um dos laboratórios credenciados à Rede Brasileira de Qualidade do Leite para a determinação dos teores de gordura, proteína, lactose, extrato seco total e extrato seco desengordurado, mediante leitura de absorção de luz infravermelha, utilizando-se o equipamento Bentley 2000[®]. Amostras de 500 mL de leite de cada animal foram também coletadas, resfriadas imediatamente a 4°C e encaminhadas ao Laboratório de Processamento de Leite e Derivados da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia-UESB/*Campus* Itapetinga. Nestas amostras foram determinadas: a acidez (°D), obtida por meio do cálculo do percentual de ácido láctico na amostra pela titulação com NaOH 0,1%; densidade a 15°C, pelo termolactodensímetro de Quevenne e índice crioscópico (°H), utilizando-se crioscópio eletrônico Laktron 312-L (Laktron, Londrina, Paraná, Brasil), conforme metodologia descrita na Instrução Normativa nº 68, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA²².

Amostras individuais de 100 mL de leite foram coletadas em garrafas de polietileno e acondicionadas em caixa isotérmica com gelo e, em seguida, congeladas

para realização da cromatografia gasosa. A extração de lipídeos com a finalidade de determinação da composição lipídica foi realizada segundo procedimentos estabelecidos por Hara & Radim²³. O processo foi iniciado com o descongelamento da amostra, com posterior centrifugação sob rotação de 17800 G, a 8°C por 30 minutos, para concentração da gordura. Após essa etapa foram pesados 400 mg de gordura do sobrenadante e adicionado à solução de hexano-isopropanol. A metilação foi feita pelo uso de uma solução metanólica de metóxido de sódio, de acordo com Christie²⁴. Uma alíquota de 1 µL do extrato esterificado foi injetada no cromatógrafo modelo Focus CG-Finnigan[®] e o perfil de ácidos graxos foi determinado por meio da cromatografia gasosa utilizando coluna capilar de sílica fundida SP-2560 (100 m X 0,25 mm X 0,2 mm; Supelco) e detector de ionização de chama (FID). O gás de arraste foi o hidrogênio com fluxo de 40 mL/minuto e 18 psi de pressão na cabeça da coluna. Os ácidos graxos foram identificados por comparação dos tempos de retenção dos ésteres metílicos das amostras com padrões de ácidos graxos de manteiga. O perfil de ácidos graxos foi expresso em gramas por 100 gramas do total de ácidos graxos determinados pela cromatografia.

A qualidade nutricional da fração lipídica foi avaliada pelos dados de composição em ácidos graxos, empregando-se os seguintes cálculos: Índice de Aterogenicidade (IA) = $\{(C12:0 + (4 \times C14:0) + C16:0)\} / (\Sigma AGMI + \Sigma w6 + \Sigma w3)$; e Índice de Trombogenicidade (IT) = $(C14:0 + C16:0 + C18:0) / \{(0,5 \times \Sigma AGMI) + (0,5 \times \Sigma w6 + (3 \times \Sigma w3) + (\Sigma w3 / \Sigma w6)\}$, segundo Ulbrich & Southage²⁵; b) Ácidos Graxos Desejáveis (AGD) = (insaturados + C18:0), segundo Costa et al²⁶; c) razão entre ácidos graxos poli-insaturados e ácidos graxos saturados e razão entre w6 e w3.

Foi utilizado o teste t de Student para dados emparelhados, comparando-se as fases inicial e final de lactação para cada variável, ao nível de 5% de significância, por meio do programa estatístico SAS²⁷.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A densidade do leite é uma propriedade totalmente dependente da matéria dissolvida e suspensa no corpo em questão. Pode ser observado (Tabela 1) que houve diferença ($p < 0,05$) para a densidade. Esta, na fase inicial apresentou valor de 1,031 g/L, sendo maior que o observado na fase final (1,028 g/L). Resultados superiores foram observados por Mesquita et al⁵ que, avaliando a influência do estágio de lactação na composição do leite

bubalino, encontraram densidade de 1,036 g/L, 1,035 g/L e 1,033g/L para os estágios inicial, médio e final da lactação, respectivamente, ou seja, valores menores na fase mais avançada da lactação. De acordo com Walstra e Jenness²⁸, a densidade sofre alterações em função das variações dos componentes do leite, principalmente

gordura, pois teores mais elevados desses componentes proporcionam densidades menores. Dessa forma, os dados aqui apresentados corroboram a afirmação desses autores, pois o teor de gordura no final da lactação (6,79%) foi maior ($p < 0,05$) que o observado no estágio inicial da lactação (5,45%).

Tabela 1. Propriedades físico-químicas e composição do leite de búfalas da raça Murrah produzido em diferentes fases de lactação

Parâmetros	Início Lactação			Final Lactação		
	Média	D.P ²	C.V ³	Média	D.P ²	C.V ³
Densidade a 15°C (g/L)	1,031 ^a	0,0020	0,19	1,028 ^b	0,0015	0,14
Crioscopia (°H)	-0,541 ^a	0,007	1,31	-0,542 ^a	0,008	1,54
Acidez (°D)	18,00 ^b	1,71	9,33	19,00 ^a	1,23	6,31
Gordura (%)	5,45 ^b	1,39	25,18	6,79 ^a	1,47	21,40
Proteína (%)	3,88 ^a	0,28	7,21	3,80 ^a	0,35	9,17
Lactose (%)	5,17 ^a	0,31	5,93	4,98 ^b	0,35	6,99
Sólidos Totais (%)	15,75 ^b	1,27	7,94	16,87 ^a	1,59	9,32
ESD ¹ (%)	10,30 ^a	0,40	3,79	10,09 ^b	0,51	5,03

^{a,b}Médias seguidas por letras diferentes na linha diferem estatisticamente pelo teste t ao nível de 5% de probabilidade; ¹ESD = Extrato Seco Desengordurado; ²DP = Desvio Padrão; ³CV = Coeficiente de Variação

A crioscopia, análise que determina o ponto de congelamento do leite, foi um dos parâmetros que não apresentou diferença estatística ($p > 0,05$) entre as fases de lactação estudadas. Os valores observados variaram de $-0,543^{\circ}\text{H}$ a $-0,526^{\circ}\text{H}$. Resultados médios diferentes foram encontrados por Nader Filho et al²⁹ que observaram valores de $-0,577^{\circ}\text{H}$, no terço inicial da lactação, e $-0,576^{\circ}\text{H}$, no terço final da lactação, para o índice crioscópico.

A acidez titulável, expressa em graus Dornic (°D), foi influenciada pela fase de lactação. Na fase inicial esta foi de 18°D e na fase final se elevou para 19°D. A Instrução Normativa (IN) n° 51, do MAPA³⁰ determina que em leite bovino, a acidez titulável deve estar entre 14 e 18°D. Trabalhos relatam que a acidez titulável do leite de búfalas pode ser superior ao estabelecido pela IN 51, para leite bovino, com valores que variam de 18,98°D³¹ e 20,0°D⁸. Assim, os dados observados neste trabalho corroboram os relatos que afirmam que a acidez do leite bubalino tende a ser maior que a observada no leite bovino. Esta afirmativa explica-se pelo fato do maior teor de proteína bruta observado no leite de búfalas, conseqüentemente, maior quantidade de caseína, com seus aminoácidos

com características anfotéricas, que agem como ácido na titulação²⁹, além do seu maior diâmetro e número que o observado no leite bovino³¹.

Em relação ao teor de proteína bruta (PB) no leite de búfalas, não foi observada diferença estatística ($p > 0,05$) quanto à fase de lactação (3,88% no início e 3,80% no final). Resultados superiores de PB no leite de búfalas foram encontrados por Fernandes et al⁸, que observaram efeito da fase de lactação sobre esse parâmetro no leite de búfalas da raça Murrah, com suplementação alimentar (volumosa ou concentrada) e relataram valores médios de 4,04%, no início, e 4,62% no final da lactação. Macedo et al³¹ observaram teor de PB no leite de búfalas de 4,31%, superior aos aqui relatados.

Muitos fatores afetam a distribuição do nitrogênio nas diferentes frações nitrogenadas do leite, incluindo clima, doenças, estágio de lactação, parto, raça e nutrição. A importância de cada fator no mecanismo de secreção do nitrogênio do leite é difícil de ser determinada, mas De Peters & Cant³² sugerem que a interação dos fatores pode afetar drasticamente a composição da fração nitrogenada do leite. Dentre esses, a nutrição exerce papel fundamental e animais em desequilíbrio nutricional podem apresentar teor

de PB no leite abaixo da média. Esta parece ser a provável explicação para os resultados observados neste trabalho, pois, no período experimental, os animais não receberam suplementação alimentar (volumosa ou concentrada).

Foi observada diferença estatística ($p < 0,05$) para os teores de gordura no leite (Tabela 1) entre as fases de lactação. Na fase inicial, o teor de gordura foi de 5,45%, e na fase final foi de 6,79%. Dessa forma, os dados aqui encontrados corroboram as observações de Faria et al⁷, que avaliaram o comportamento da composição físico-química do leite de búfala ao longo da lactação e encontraram diferença estatística entre as médias do início (6,2%) e do final (8,2%). É de se esperar que a percentagem de gordura se eleve ao longo da lactação, pois à medida que a produção cai ocorre elevação da concentração de alguns compostos, dentre eles a gordura⁸. Outro fator que pode ter elevado o teor de gordura no leite é o fato de que os animais encontravam-se em balanço energético positivo no final da lactação, ou seja, o consumo de matéria seca pelo animal é superior às necessidades de manutenção e produção, disponibilizando energia para a síntese de gordura.

O menor teor de lactose (4,98%) observado na fase final da lactação, pode ser explicado pela menor produção de leite neste estágio. A lactose está diretamente associada ao volume de leite produzido, devido à sua relação com a regulação da pressão osmótica da glândula mamária, sendo o componente que menos varia⁹. Duarte et al⁴, estudando rebanho bubalino no Estado de São Paulo, detectaram percentagem média de lactose de 5,2%, observando, também, pouca variação ao longo da lactação, similar ao encontrado por Mesquita et al⁵, cuja concentração média no início da lactação foi de 5,4%, atingindo o ponto mais alto no meio lactação (5,8%), voltando a cair no final (5,5%).

O período de lactação das búfalas influenciou o perfil de alguns ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados do leite (Tabela 2).

Na fase inicial da lactação das búfalas, o leite apresentou maior proporção de ácidos graxos saturados (67,1%), quando comparado à fase final de lactação (62,29%). A composição de ácidos graxos no leite é influenciada pelo período de lactação, em razão da necessidade de mobilização de reservas lipídicas no início da lactação, dentre outros fatores^{32, 10}.

Segundo Palmquist et al¹¹, a gordura do leite contém ácidos graxos derivados da síntese *de novo* na glândula mamária, principalmente, os de cadeia curta, C4:0 a C14:0. Os teores médios detectados neste trabalho para esses ácidos graxos foram influenciados pela fase de

lactação ($p < 0,05$), com exceção do ácido butírico (C4:0) que foi semelhante ($p > 0,05$) nas fases. Segundo De Peters e Cant³², o ácido butírico é próprio da gordura do leite dos ruminantes, sendo responsável, juntamente com o caproico (C6:0), pelo aroma característico do leite quando a gordura é hidrolisada pela ação das lipases.

Em leite de ruminantes, os ácidos graxos de cadeia curta e média correlacionam-se negativamente com os de cadeia longa¹¹. Assim, o teor do conjunto de ácidos graxos com 18 ou mais átomos de carbono foi de 44,51%, no início, e 44,79% no final da lactação, resultados inferiores ao observado por Fernandes et al⁸, que encontraram valores variando de 46,06% a 53,84% para os ácidos graxos com 18 ou mais átomos de carbono.

Alguns ácidos graxos como láurico, mirístico e palmítico (C12:0, C14:0 e C16:0, respectivamente) presentes no leite estão relacionados a problemas cardiovasculares³³. A diminuição do teor desses ácidos graxos tem sido almejada no intuito de melhorar a imagem, junto à opinião pública, dos produtos de origem animal. Os resultados médios encontrados para o conjunto destes ácidos graxos, neste trabalho, foram de 38,52% para a fase inicial de lactação e 37,66% para a fase final de lactação.

A fase de lactação influenciou ($p < 0,05$) o teor de ácido esteárico (C18:0) que apresentou maior média no início da lactação (17,37%), quando comparado com o final da lactação (14,44%). Segundo Monteiro³⁴, o ácido esteárico, ao contrário de outros ácidos graxos saturados, não está relacionado ao aumento de colesterol, pois, quando ingerido, é metabolizado a ácido oleico (C18:1). Assim, teores mais elevados encontrados podem ser favoráveis à dieta do homem, exaltando a qualidade do leite estudado.

Os ácidos graxos insaturados são extremamente importantes na saúde humana, sendo seus principais efeitos relacionados à redução do colesterol total e lipoproteínas de baixo peso molecular (LDL), sem reduzir as lipoproteínas de alta densidade (HDL)³⁵. Vale ressaltar que, apesar dos ácidos graxos insaturados diminuírem os níveis séricos de colesterol e de alguns serem considerados essenciais por não serem sintetizados pelo organismo, uma vez fornecidos na dieta, também podem ser precursores de várias substâncias, sendo algumas vasoativas. Estas substâncias podem influenciar também na viscosidade sanguínea, na permeabilidade dos vasos sanguíneos e na pressão arterial. O aumento de alguns desses ácidos insaturados, ou a alteração da razão entre eles, pode aumentar a produção de tromboxanos e leucotrienos que, em excesso, estão associados a doenças como trombozes, arritmias, artrite, asma e psoríase²¹.

Tabela 2. Perfil de ácidos graxos (\pm erro padrão) do leite de búfalas da raça Murrah produzido em diferentes fases de lactação

Ácidos graxos	Início da lactação (g/100 g)	Final da lactação (g/100 g)
Saturados	67,15^a \pm 2,52	62,28^b \pm 4,33
C4:0	3,38 ^a \pm 0,43	3,19 ^a \pm 0,28
C6:0	1,17 ^a \pm 0,11	1,07 ^b \pm 0,25
C8:0	0,48 ^a \pm 0,05	0,41 ^b \pm 0,06
C10:0	0,92 ^a \pm 0,09	0,75 ^b \pm 0,12
C12:0	1,36 ^a \pm 0,11	1,17 ^b \pm 0,15
C14:0	8,52 ^a \pm 0,43	7,93 ^b \pm 0,78
C15:0	2,86 ^a \pm 0,03	2,96 ^a \pm 0,04
C16:0	28,64 ^a \pm 0,03	28,56 ^a \pm 0,03
C17:0	2,45 ^a \pm 0,04	1,80 ^b \pm 0,05
C18:0	17,37 ^a \pm 2,41	14,44 ^b \pm 2,04
Monoinsaturados	24,29^b \pm 3,34	26,88^a \pm 4,33
C14:1 <i>cis</i> 9	0,34 ^b \pm 0,15	0,48 ^a \pm 0,13
C16:1	1,53 ^b \pm 0,98	2,45 ^a \pm 0,36
C17:1	1,09 ^a \pm 0,08	1,03 ^a \pm 0,09
C18:1 <i>trans</i> 6-8	0,26 ^a \pm 0,11	0,24 ^a \pm 0,09
C18:1 <i>trans</i> 9	0,42 ^a \pm 0,13	0,53 ^a \pm 0,19
C18:1 <i>trans</i> 11	0,39 ^a \pm 0,08	0,40 ^a \pm 0,09
C18:1 <i>trans</i> 12	3,09 ^a \pm 0,94	2,92 ^a \pm 0,60
C18:1 <i>cis</i> 9	18,97 ^a \pm 5,71	21,52 ^a \pm 6,52
C18:1 <i>cis</i> 11	0,65 ^a \pm 0,14	0,76 ^a \pm 0,28
C18:1 <i>cis</i> 12	0,27 ^a \pm 0,09	0,28 ^a \pm 0,10
C18:1 <i>cis</i> 13	0,23 ^a \pm 0,01	0,22 ^a \pm 0,02
C18:1 <i>trans</i> 16	0,20 ^a \pm 0,05	0,19 ^a \pm 0,05
C20:1	0,11 ^a \pm 0,13	0,14 ^a \pm 0,12
C22:1	0,05 ^a \pm 0,01	0,05 ^a \pm 0,01
Poli-insaturados	2,5^a \pm 0,42	3,1^a \pm 0,51
C18:2 <i>cis</i> 9 <i>cis</i> 12	0,80 ^a \pm 0,19	0,93 ^a \pm 0,26
C18:3 w-6	0,25 ^a \pm 0,06	0,24 ^a \pm 0,04
C18:3 w-3	0,56 ^b \pm 0,09	0,66 ^a \pm 0,013
C18:2 <i>cis</i> 9 <i>trans</i> 11 (CLA)	0,75 ^b \pm 0,11	1,10 ^a \pm 0,21
C20:4 w-6	0,08 ^a \pm 0,01	0,09 ^a \pm 0,01
C20:5 w-3	0,05 ^a \pm 0,02	0,06 ^a \pm 0,02

^{a,b}Médias seguidas por letras diferentes na linha diferem estatisticamente pelo Teste t ao nível de 5% de probabilidade

Para os ácidos graxos monoinsaturados houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre as fases de lactação, onde a fase inicial apresentou menor porcentagem (24,29%) em relação à fase final (26,88%). Dentre esses ácidos graxos, o que mais contribuiu para o total de monoinsaturados foi o C18:1 *cis* 9 (um dos isômeros do ácido oleico), com valores médios de 18,97%, no início da lactação, e 21,52% no final da lactação ($p > 0,05$). Valores semelhantes foram verificados por Mihaylova e Peeva³⁵, com resultados médios de 18,79% do C18:1 *cis* 9.

Lock e Bauman¹ relataram evidências de que, ao contrário do consumo de gorduras hidrogenadas de origem vegetal, o consumo do ácido graxo C18:1 *trans*-11 é negativamente correlacionado ao risco de doenças coronarianas. Os valores encontrados para os isômeros *trans* do C18:1, neste trabalho, foram de 4,36% no início da lactação e 4,28% para o final da lactação. Mihaylova e Peeva³⁵ encontraram valores variando de 1,75% a 3,14%. Segundo Fernandes et al⁸, esse isômero apresenta fundamental importância devido à sua atuação como substrato para produção do ácido linoleico conjugado (CLA) na glândula mamária. Este isômero é substrato para a síntese de novo do ácido linoleico conjugado, CLA (18:2 *cis*-9 *trans* 11) em seres humanos e animais³⁶.

No geral, para os ácidos graxos poli-insaturados, não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) entre as fases de lactação. No entanto, os ácidos graxos α -linolênico (18:3 *w*-3) e o CLA (18:2 *cis*-9 *trans* 11) apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$), com maiores concentrações na fase final de lactação. A produção de CLA, encontrado no leite e tecidos ocorre em duas etapas: i) a biohidrogenação ruminal dos ácidos linoleico e linolênico; e, ii) endogenamente, a partir do ácido vacênico (C18:1t11), intermediário na biohidrogenação ruminal dos ácidos graxos poli-insaturados linoleico e linolênico¹⁵. O efeito da fase de lactação foi observado sobre os teores de CLA (C18:2 *cis*-9 *trans* 11) no leite de búfala. A média observada foi de 0,75%, no início da lactação, e 1,10% no final da lactação. Fernandes et al⁸ relataram variação entre 1,02% a 1,77% de CLA, superiores aos observados neste trabalho.

A concentração de CLA na gordura do leite é dependente da presença de ácidos graxos precursores, como o ácido linoleico e ácidos linolênico, na dieta. Os búfalos são animais poliéstricos estacionais, com o cio ocorrendo em dias curtos e frios, que ocorrem no outono/inverno, como na região estudada. Este período caracteriza-se pela baixa precipitação pluviométrica, que afeta a qualidade das forragens, diminuindo-a. Ressalta-se que a concentração de

CLA no leite é afetada pela quantidade de precursores (ácido linoleico e ácidos linolênico) na dieta. Este período coincide com a fase inicial da lactação. Por outro lado, a fase final da lactação coincide com o período das chuvas, que afetam a quantidade e qualidade das forrageiras. Os lipídios, nas forrageiras, correlacionam-se positivamente com os tecidos metabolicamente ativos¹¹. Com as chuvas, as forrageiras reiniciam seu ciclo vegetativo, alterando seu aparato fotossintético. Esta alteração determina elevação da relação folha:caule. Com o aumento da quantidade de folhas ocorre elevação na concentração dos ácidos graxos precursores de CLA¹¹. Fernandes et al¹³ estudando o comportamento de gramíneas tropicais (*Brachiaria decumbens* e *Brachiaria ruziziensis*), de acordo com a época do ano, verificaram que no período seco (outono/inverno) ocorre diminuição do teor de extrato etéreo, conseqüentemente, ocorre diminuição da concentração dos precursores de CLA. O inverso ocorre no período das chuvas (primavera/verão), período no qual ocorre aumento na concentração destes precursores. Esta é a provável explicação para os resultados observados nesse trabalho, visto que, a fase inicial de lactação coincide com o período em que as forrageiras encontram-se com baixa qualidade e disponibilidade (outono/inverno) e, com a chegada das chuvas (primavera/verão), tanto a quantidade quanto a qualidade das forrageiras se elevam neste período, disponibilizando mais precursores para a biohidrogenação ruminal.

O perfil lipídico avaliado por diferentes índices qualitativos encontra-se descrito na Tabela 3. Foi observada diferença estatística ($p < 0,05$) entre as fases de lactação para a razão entre ácidos graxos poli-insaturados e saturados (P/S), que apresentaram valores de 0,03 e 0,05, no início e final da lactação, respectivamente. Alimentos que apresentam esta razão de P/S abaixo de 0,45 têm sido considerados como indesejáveis na dieta³⁷. Segundo Santos-Silva et al³⁸, a relação entre ácido graxo poli-insaturado e saturado é normalmente utilizada para avaliar o valor nutricional da gordura. No entanto, a relação P/S é baseada na estrutura química do ácido graxo, podendo não ser o melhor caminho para se avaliar o valor nutricional da gordura, uma vez que se considera que todos os ácidos graxos saturados induzem ao aumento de colesterol e ignoram os efeitos dos ácidos graxos monoinsaturados. Assim, os autores recomendam que a melhor maneira de avaliar o valor nutricional da gordura seria a utilização de relações baseadas nos efeitos funcionais dos ácidos graxos como, por exemplo, a proporção entre ácidos graxos hipercolesterolêmicos/ hipocolesterolêmico.

Tabela 3. Índices de qualidade nutricional da fração lipídica do leite de búfalas da raça Murrah produzido em diferentes fases de lactação

Componente	Início da lactação	Final da lactação
AGP/AGS	0,03 ^b	0,05 ^a
AGD	45,63 ^b	49,41 ^a
w6/w3	0,54 ^a	0,48 ^a
IA	2,46 ^a	1,90 ^b
IT	3,25 ^a	2,53 ^b

^{a,b}Médias seguidas por letras diferentes na linha diferem estatisticamente pelo teste t ao nível de 5% de probabilidade; AGP/AGS = ácidos graxos poli-insaturados/ácidos graxos saturados; AGD = ácidos graxos desejáveis; w6/w3 = série ômega 6/ série ômega 3; IA = índice de aterogenicidade; IT = índice de trombogenicidade

De acordo com os resultados observados nesse trabalho, a concentração de ácidos graxos desejáveis (AGD) no leite de búfala no estágio final de lactação apresentou média superior (49,41%), em relação ao estágio inicial de lactação (45,63%). Fernandes et al³⁹ observaram teor de AGD no leite de búfalas variando de 38,08 ($\pm 6,54$) a 47,17 ($\pm 7,88$). Segundo Costa et al²⁶, a maior concentração de AGD se deve aos processos de biohidrogenação ruminal, relacionado com o ácido esteárico (C18:0) que compõe, junto aos ácidos graxos insaturados, os ácidos graxos desejáveis.

Por outro lado, não foi verificado efeito da lactação ($p > 0,05$) sobre a razão w6/w3, que apresentou valores de 0,54 na fase inicial e 0,48 na fase final. Valores abaixo de 4,0 sugerem quantidades desejáveis destes ácidos graxos na dieta, que exercem ação preventiva sobre doenças cardiovasculares. Sendo assim, em ambas as fases o leite apresentou relação dentro dos padrões recomendados¹⁹.

O índice de aterogenicidade (IA) indica a razão entre a soma dos principais ácidos graxos saturados e a soma dos principais insaturados. Foi observado efeito ($p < 0,05$) da fase de lactação sobre o IA no leite de búfalas. O IA na fase inicial foi de 2,46 e na fase final 1,9. De acordo com Bobe et al¹⁹ produtos lácteos, geralmente, apresentam IA ao redor de 2. Bobe et al⁴⁰, avaliando o IA, em leite bovino, relataram valores entre 1,51 e 2,83. Para estes autores o primeiro valor (1,51) é considerado baixo, enquanto 2,83 é considerado alto, para leite de bovídeos. Alguns fatores devem ser avaliados no sentido da compreensão da diferença observada neste trabalho. Como observado na Tabela 2, verifica-se diferença significativa entre as fases de lactação para o C 14:0, apresentando o menor teor na fase final. Este resultado

associado aos maiores teores de AGMI, w-3 e de CLA na fase final, determinou o menor IA nesta fase.

Na literatura são raras as referências que avaliam o IA, principalmente, no que se refere a leite de búfala. Fernandes et al³⁹ estudando o efeito dos diferentes sistemas de produção sobre a qualidade nutricional do leite de búfalas, encontraram IA variando entre 1,49 \pm 0,43 e 2,35 \pm 0,6.

Para definir o índice de trombogenicidade (IT) são considerados os ácidos graxos mirístico, palmítico e esteárico como pró-trombogênicos, enquanto os insaturados são admitidos como antitrombogênicos com diferentes potencialidades, isto é, os ácidos graxos monoinsaturados e ácidos graxos poli-insaturados w-6 são menos antitrombogênicos que o ácido graxo poli-insaturado w-3²⁶. Os valores encontrados neste trabalho para este índice, apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) entre as fases de lactação, estando a fase final com valores menores (2,53) que a fase inicial de lactação (3,25).

CONCLUSÃO

O leite de búfala sofreu influência do estágio de lactação para alguns parâmetros estudados, sendo observado aumento na acidez titulável, teor de gordura e sólidos totais, enquanto, para densidade, lactose e sólidos não gordurosos, notou-se diminuição dos valores no final da lactação em relação ao início.

No total de ácidos graxos presentes no leite de búfala foram encontradas maiores concentrações de ácidos saturados no início da lactação. No final da lactação, houve aumento da concentração de ácidos monoinsaturados. Na avaliação da qualidade

nutricional da fração lipídica, na fase final de lactação o leite apresentou maior relação de ácidos graxos poli-insaturados/ácidos graxos saturados, menor relação de ácidos hipercolesterolêmicos/ hipocolesterolêmicos, maior teor de ácidos graxos desejáveis e menores índices de aterogenicidade e trombogenicidade.

AGRADECIMENTO

À FAPEMIG e UESB pelo auxílio com bolsa.

REFERÊNCIAS

1. Lock AL, Bauman DE. Dairy products and milk fatty acids as functional food components. *Proceedings Cornell Nutrition Conference For Feed Manufacturers*. 1993; Ithaca: Cornell University. p.159-73.
2. Tapiero H, Nguyen BAG, Couvreur P. Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and eicosanoids in human health and pathologies. *Biomed Pharmacoth*. 2002;56:215-22.
3. Tonhati H. Resultados do controle leiteiro em bubalinos. *Bubalinos: Sanidade, Reprodução e Produção*; 1999; Jaboticabal, São Paulo: Funep. p.90-109.
4. Duarte JMC. Efeitos ambientais sobre a produção no dia do controle e características físico-químicas do leite em um rebanho bubalino no Estado de São Paulo, Brasil. *Rev ILCT*. 2001;56(322):16-9.
5. Mesquita AJ, Tanezini CA, Pontes IS, Rocha JM, Souza JT, D'alessandr WT. Qualidade físico-química e microbiológica do leite cru bubalino. Goiânia: UFGO, 2001.
6. Bovera F, Cutrignelli MI, Calabrò S. Influence of diet characteristics and productions levels on blood and milk urea concentrations in buffalo. *World Buffalo Congress*, 6; 2001; Maracaibo: Zulia University Tech Park. p. 506-11.
7. Faria MH, Tonhati H, Ceron Munoz M, Duarte JMC, Vasconcellos B. Características do leite de búfalas ao longo da lactação. *Rev ILCT*. 2002;54(324): 2-7.
8. Fernandes SAA, Mattos WRS, Matarazzo SV, Tonhati H. Avaliação da produção e qualidade do leite de rebanhos bubalinos no estado de São Paulo. *Rev ILCT*. 2005;60:53-8.
9. Sutton JD. Altering milk composition by feedind. *J Dairy Sci*. 1989;72(10):2801-14.
10. Chilliard Y, Ferlay A, Rouel J, Lamberet G. A review of nutritional and physiological factors affecting goat Milk lipid synthesis and lipolysis. *J Dairy Sci*. 2003;86(5):1751-70.
11. Palmquist DL, Beaulieu AD, Barbano DM. Feed and animal factors influencing milk fat composition. *J Dairy Sci*. 1993;76(6):1753-71.
12. Elgersma A, Ellen G, Van Der Horst H, Muuse BG, Boer H, Tamminga S. Comparison of the fatty acid composition of fresh and ensiled ryegrass (*Lolium perenne* L.), affected of cultivar and regrowth interval. *Anim Feed Sci Technol*. 2003;108:191-205.
13. Fernandes ASA, Mattos WRS, Matarazzo SV, Gama MAS, Lanna DPD, Rosseto CV. Perfil de ácidos graxos em alimentos de clima tropical utilizados nas dietas para ruminantes. *Bol Ind Anim*. 2007;64:19-27.
14. French P, Stanton C, Lawless F, O'Riordan EG, Monahan FJ, Caffrey PJ et al. Fatty acid composition, including conjugated linoleic acid, of intramuscular fat from steers offered grazed grass, grass silage, or concentrate-based diets. *J Anim Sci*. 2000;78:2849-55.
15. Bauman DE. Conjugated linoleic acid (CLA) and milk fat: a good news story. *Annual Arizona Dairy Production Conference*; 2003; Arizona. p.1-13.
16. Fehily AM, Pickering JE, Yarnell JWG, Elwood PC. Dietary indices atherogenicity and thrombogenicity and ischaemic heart disease risk: the Caerphilly prospective study. *Br J Nutr*. 1994;71:249-57.
17. Eifert EC, Lana RP, Lanna DPD, Leopoldino WM, Arcuri PB, Leão MI et al. Perfil de ácidos graxos do leite de vacas alimentadas com óleo de soja e monensina no início da lactação. *Rev Bras Zoot*. 2006;35(1):219-28.
18. Dietschy JM. Dietary fatty acids and the regulation of plasma low density lipoprotein cholesterol concentration. *J Nutrit*. 1998; 128(2):444-8.
19. Bobe G, Zimmerman S, Hammond EG, Freeman G, Lindberg GL, Donald CB. Texture of butters made from milks differing in indices of atherogenicity. *Iowa State University Animal Industry Report. Dairy*. 3 p.2004.
20. Nuermberg K, Fischer A, Nuermberg G, Ender K, Dannemberger D. Meat quality and fatty acid composition of lipids in muscle and fatty tissue of Skudde lambs fed grass versus concentrate. *Small Ruminant Res*. 2008;74:279-83.
21. Belda MCR, Pourchet-Campos MA. Ácidos graxos essenciais em nutrição: uma visão atualizada. *Cienc Tecnol Aliment*. 1991;11(1):5-35.
22. Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº. 68 de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF*. 14 dez 2006. Seção 1, nº 239. p.8-30.
23. Hara A, Radim NS. Lipid extraction of tissues with low toxicity solvent. *Anal Biochem*. 1978; 90:420-6.
24. Christie WW. A simple procedure for rapid transmethylation of glycerolipids and cholesterol ester. *J Lipid Res*. 1982;23:1072-5.
25. Ulbrich TLV, Southgate DTA. Coronary heart disease: seven dietary factors. *Lancet*. 1991;338(19):985-992.
26. Costa RG, Mesquita IVU, Queiroga RCRE, Medeiros NA, Carvalho FFR, Beltrão Filho EM. Características químicas e sensoriais do leite de cabras Moxotó alimentadas com silagem de maniçoba. *Rev Bras Zoot*. 2008;37(4):694-702.
27. SAS Institute. 2000. SAS OnlineDoc, version 8. SAS Institute, Inc., Cary, NC.

28. Walstra P, Jenness R. Química y física lactológica. Zaragoza: Acribia, 1987, 423p.
29. Nader Filho A, Amaral LA, Tonhatti H, Penha LHC, Toledo LM. Variação das características físico-químicas do leite de búfala, durante os diferentes meses do período de lactação. *Art Vet*. 1996;12(1):148-53.
30. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51, 18 de setembro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite tipo A, Leite tipo B, Leite tipo C, Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF. 20 set 2006. Seção 1, nº 183. p.13.
31. Macedo MP, Wechsler FS, Ramos AA, Amaral JA, Souza JC, Resende FD et al. Composição Físico-Química e Produção do Leite de Búfalas da Raça Mediterrâneo no Oeste do Estado de São Paulo. *Rev Bras Zootec*. 2001;30(3):1084-8.
32. De Peters EJ, Cant JP. Nutritional factors influencing the nitrogen composition of bovine milk: A Review. *J Anim Sci*. 1992;75:2043-50.
33. Lock A, Garnsworthy JH. Seasonal variation in milk conjugated linoleic acid and Δ^9 desaturase activity in dairy cows. *Livest Prod Sci*. 2003;79:47-59.
34. Monteiro EM. Influência do cruzamento Ile de France x Corriedale (F1) nos parâmetros de qualidade da carne de cordeiro [Tese de Doutorado] São Paulo. Universidade de São Paulo, 1998. 99p.
35. Mihaylova G, Peeva T. Trans fatty acids and conjugated linoleic acid in the buffalo milk. *Ital J Anim Sci*. 2007;6(1):1056-9.
36. Griinari JI, Corl BA, Lacy SH, Chouinard PY, Nurmela KVV, Bauman DE. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by Delta(9)-desaturase. *J Nutr* 2000;130:2285-91.
37. Department of Health and Social Security (DHSS). Diet and cardiovascular disease. Report health and social subjects. 1984;28.
38. Santos-Silva J, Bessa RJB, Santos-Silva F. Effect of genotype, feeding system and slaughter weight on the quality of light Lamb. II Fatty acid composition of meat. *Liv Prod Sci*. 2002; 77:187-94.
39. Fernandes SAA, Mattos WRS, Matarazzo SV, Gama MAS, Malhado CHM, Etcheagaray MAL et al. Indices of atherogenicity and thrombogenicity in milk fat from Buffaloes raised under different feeding systems. *Rev Vet*. 2010;21:562-3.
40. Bobe G, Hammond EG, Freeman AE, Lindberg GL, Beitz DC. Texture of Butter from Cows with Different Milk Fatty Acid Compositions. *J Dairy Sci*. 2003; 86: 3122-7.

Propriedades reológicas da gelatina obtida a partir de pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*)

Rheological properties of gelatin from skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*)

RIALA6/1328

Alexandre da Trindade ALFARO^{1*}, Edilson Ferreira da SILVA²

*Endereço para correspondência: ¹Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus de Francisco Beltrão, Linha Santa Bárbara, s/nº, CEP 85601-971, Francisco Beltrão/ PR, Brasil E-mail: alexandre@utfpr.edu.br

²Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Pato Branco

Recebido: 31.03.2010 – Aceito para publicação: 15.10.2010

RESUMO

A gelatina foi preparada da pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*) e suas propriedades reológicas foram determinadas. A avaliação da força de gel da gelatina foi realizada por meio de analisador de textura, modelo TA-Xtplus e a viscosidade foi determinada por meio de viscosímetro Ostwald-Fenski. As propriedades viscoelásticas foram estimadas em reômetro RheoStress Haake RS-150. Com o tempo de maturação de 18±1h, a força de gel e a viscosidade apresentaram valores, respectivamente, de 243±7,55g e 5,24±0,29cP. O prolongamento do tempo de maturação ocasionou aumento de força de gel e viscosidade. Os pontos de fusão e de formação de gel foram, respectivamente, de 27° e 22,5°C, e o processo resultou em rendimento de 8,85±1,80%. A gelatina de pele de tilápia possui propriedades reológicas intermediárias àquelas descritas na literatura para gelatinas originárias de outros pescados.

Palavras-chaves. *Oreochromis niloticus*, propriedades viscoelásticas, força de gel, viscosidade.

ABSTRACT

Gelatin from the skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*) was prepared, and the rheological properties of this product were determined. The gel strength of gelatin was assessed by texture analyzer, model TA-Xtplus, and its viscosity was determined by Ostwald-Fenske viscometer. The viscoelastic properties were estimated on a RheoStress Haake RS-150 rheometer. At maturation period of 18±1h, the gel strength and viscosity showed values of 243±7,55g and 5,24±0,29cP, respectively. The prolongation of maturation period increased the gel strength and viscosity. The gelling and melting points were at 27° and 22.5°C, respectively, and the process yield was 8.85±1.80%. The gelatin from tilapia skin shows intermediate rheological properties when compared with those reported for other fish gelatins.

Key words. *Oreochromis niloticus*, viscoelastic properties, gel strength, viscosity.

INTRODUÇÃO

A gelatina tem muitas aplicações em produtos alimentícios, farmacêuticos e fotográficos, sendo uma substância caracterizada por sua capacidade de formar géis termoreversíveis¹. É uma substância sem cor e aroma, solúvel em água quente, e que, se presente em 1%, geleifica após o resfriamento, mas perde esta propriedade em fervura contínua. Todas as gelatinas possuem composição similar, contendo água, pequena quantidade de sais minerais e proteína pura do tecido conectivo. No entanto, gelatinas com diferentes propriedades podem ser obtidas, dependendo da matéria-prima e pré-tratamento empregado².

Tradicionalmente a extração de colágeno para produção de gelatinas, é realizada utilizando como matéria-prima ossos e peles de mamíferos, principalmente bovinos e suínos. No entanto, recentes problemas sanitários relacionados com bovinos, como a Encefalopatia Espongiforme Bovina^{3,4} e restrições à gelatina de mamíferos em países que predominam religiões como islamismo e judaísmo, onde somente são aceitas se concebidas conforme os requerimentos da religião^{5,6,7}, têm despertado um crescente interesse em gelatinas de pescado.

Uma das principais restrições à utilização da gelatina de pescado deve-se às suas inferiores propriedades reológicas, quando comparada à gelatina de mamíferos^{6,8}, o que restringe a sua gama de aplicações³. Gelatinas de pescado geralmente apresentam temperaturas de geleificação e fusão mais baixas e também menor força de gel do que gelatinas de mamíferos⁹. Colágenos de peixes de água quente possuem conteúdo de iminoácidos (prolina e hidroxiprolina) superior a peixes de água fria⁵, resultando em gelatinas com melhores propriedades funcionais^{10,3}.

O objetivo desse estudo foi avaliar o potencial da pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*) para produção de gelatina, através da determinação das suas principais propriedades reológicas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas peles frescas de tilápia (*Oreochromis niloticus*) recém-processadas, obtidas junto à empresa localizada na cidade de Pato Branco (Paraná, Brasil). As peles foram estocadas a -18°C até a sua utilização. Todos os reagentes que foram utilizados são de grau analítico (P.A.).

O pré-tratamento e extração seguiram parâmetros definidos por Alfaro¹¹. As peles foram lavadas em

água corrente sob agitação contínua para retirada do material superficial aderido, e cortadas em peças de aproximadamente 4 x 4 cm. A seguir, o material foi submetido à imersão em solução salina de NaCl a 0,2% (p/v), por 5 minutos, sob agitação contínua. As peles cortadas foram, então, submetidas a tratamento alcalino, 1:10 (p/v), em solução de NaOH a 0,3% (p/v), por período de 80 minutos, a 10°C. Após esse procedimento, foram lavadas em água corrente para retirada do álcali em excesso, até pH abaixo de 8. A seguir, as peles foram submetidas a tratamento ácido, 1:10 (p/v), em solução de H₂SO₄ a 0,3% (p/v), por 80 minutos, e, posteriormente, lavadas em água corrente até pH próximo à neutralidade. As peles foram então submetidas a um segundo tratamento ácido, 1:10 (p/v), em solução de ácido cítrico a 0,7% (p/v), por 80 minutos, e lavadas em água corrente até pH próximo à neutralidade. A extração da gelatina foi realizada em biorreator BIostat B (B. Braun Biotech International, Alemanha) em água deionizada, por 6h a 45°C, mantendo a proporção de 2 mL de solução para 1 g de pele. Após a extração, o material foi filtrado em funil de Büchner com papel de filtro Whatman nº 4, sendo, então, liofilizado e moído.

Umidade e cinzas da pele de tilápia foram determinadas por método gravimétrico, segundo AOAC¹². Lipídios foram determinados segundo o método de extração de Soxhlet, de acordo com a AOAC¹². Proteína foi determinada pelo método de Kjeldahl, segundo AOAC¹², utilizando fator de conversão de 5,4⁴. Umidade, cinzas e lipídios da gelatina foram determinados, segundo o British Standard Institution (BSI)¹³. Proteína foi determinada pelo método de Kjeldahl, segundo AOAC¹², utilizando fator de conversão de 5,5¹⁴. Para o cálculo do rendimento foi considerado o peso seco de gelatina, dividido pelo peso úmido das peles, multiplicado por 100.

A força de gel foi determinada na amostra de gelatina a 6,67% (p/v), preparada pela dissolução em água destilada a 60°C, sob agitação mecânica constante por 30 minutos. A amostra foi submetida à refrigeração a 7 ± 1°C (temperatura de maturação) por 18 ± 1h, 42 ± 1h e 66 ± 1h. A força de gel foi determinada em analisador de textura (Stable Microsystems, Surrey, Inglaterra), modelo TA-Xtplus, com célula de carga de 5kg, e velocidades de pré-teste, teste e pós-teste de 1,5 mm/s, 1,0 mm/s e 1,0 mm/s, respectivamente. Utilizou-se probe cilíndrico de Teflon® de 1,27 cm de diâmetro, com base plana. A força de gel foi expressa como a força máxima(g) requerida para penetração de 4mm do probe na amostra, a temperaturas entre 8 e 10°C.

As propriedades viscoelásticas foram determinadas em reômetro Rheostress Haake RS-150 (Haake, Karlsruhe, Alemanha), utilizando software Rheowin Job Manager. Utilizou-se para o estudo dinâmico viscoelástico um cone-placa de 35 mm de diâmetro e 1° de ângulo com gap de 0,14mm. A amostra de gelatina a 6,67% (p/v) foi preparada pela dissolução em água destilada, a 60°C, sob constante agitação mecânica por 30 minutos, antes do início das análises.

A amostra foi submetida a uma rampa de temperatura, sendo resfriada de 40 para 7°C, voltando a ser aquecida até 40°C. Os experimentos foram realizados em tensão de 3,0 Pa, frequência de 1Hz e taxa de variação de temperatura de 0,5°C/min, monitorando-se o processo de geleificação, através dos módulos de elasticidade G' e viscosidade G'' . O ponto de geleificação (*gelling point*) foi determinado pela intersecção dos módulos G' e G'' durante o resfriamento da amostra, segundo metodologia de Gudmundsson¹⁵. O ponto de fusão (*melting point*) foi determinado do mesmo modo, durante subsequente aquecimento. As amostras foram mantidas a 7°C durante alguns minutos, antes de serem aquecidas até 40°C, para a avaliação do comportamento dos módulos de elasticidade G' e viscosidade G'' em temperatura padrão. O ângulo de fase (δ) foi representado em função da temperatura para observação do comportamento viscoelástico da amostra.

Para determinação da viscosidade, a gelatina a 6,67% (p/v) foi preparada pela dissolução em água destilada a 60°C, sob agitação mecânica constante, por 30 minutos e submetida à refrigeração a $7 \pm 1^\circ\text{C}$ (temperatura de maturação), por $18 \pm 1\text{h}$. A viscosidade

foi determinada segundo método do British Standard Institution (BSI)¹³. A amostra foi fundida em banho a 45°C e transferida para viscosímetro de Ostwald-Fensk (n° 100). Para a determinação da viscosidade, o viscosímetro foi colocado em banho a 60°C e aguardados 10 minutos para a estabilização da temperatura.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O percentual médio de gordura da pele de tilápia foi de $4,05 \pm 0,27\%$ (Tabela1), sendo bastante elevado, portanto, é necessário que os tratamentos prévios à extração sejam eficientes na retirada do material lipídico. Sabe-se, que o odor peculiar das peles de pescado deve-se aos compostos nitrogenados e às gorduras que contêm grandes porcentagens de ácidos graxos não saturados¹⁰. O conteúdo médio de proteína em base úmida encontrado na pele de tilápia foi de $22,80 \pm 1,75\%$, sendo semelhante aos valores descritos para perca do Nilo jovens (20,3%) e adultas (21,6%)⁴. É válido ressaltar que o teor de proteínas presente na pele do pescado, representará a quantidade máxima de colágeno presente no tecido e, portanto, o máximo rendimento possível de gelatina.

A amostra apresentou teor de cinzas em base úmida de $3,95 \pm 0,42\%$, sendo este valor, intermediário aos observados por Muyonga et al⁴ para espécimes jovens (3,7%) e adultos (6,0%) de perca do Nilo. Segundo os autores, essa diferença deve-se a maior calcificação das escamas em função da idade. No presente trabalho, não foi considerada a idade do animal, não sendo possível, desta forma, traçar um comparativo a essa variável.

Tabela 1. Composição centesimal da pele e da gelatina de pele de tilápia

Componentes %	Pele de tilápia		Gelatina de pele de tilápia	
	B.U.	B.S.	B.U.	B.S.
Umidade	$71,4 \pm 1,90$	-	$13,5 \pm 1,30$	-
Gordura	$4,05 \pm 0,27$	13,14	$0,20 \pm 0,02$	0,23
Proteína	$22,80 \pm 1,75$	74,02	$83,90 \pm 2,80$	97,55
Cinzas	$3,95 \pm 0,42$	12,82	$1,90 \pm 0,18$	2,20

Valores médios referentes a três determinações \pm desvio padrão

B.U. = base úmida; B.S. = base seca

Observou-se na gelatina um conteúdo de cinzas em base úmida de $1,90 \pm 0,18\%$ (Tabela 1), valor superior aos relatados para gelatina de peixes de águas frias (0,82%)¹⁶, entretanto, inferior ao máximo teor de cinzas recomendado que é de 2,6%^{17,4}. Segundo Jones¹⁷, o

conteúdo de cinzas é frequentemente especificado, porém não deve ser considerado como um fator indispensável, exceto pelo fato de indicar o conteúdo máximo de cálcio da amostra, informação de grande importância em algumas aplicações da gelatina.

Observa-se na Tabela 1, que o teor lipídico foi baixo ($0,20 \pm 0,02\%$), sendo semelhante aos descritos para gelatinas de outras espécies de pescado, de $0,21\%^8$ e $0,20\%^4$, indicando que os sucessivos banhos, nas etapas prévias a extração, foram eficientes na remoção do conteúdo lipídico das peles de tilápia. O teor médio de umidade da gelatina foi $13,5 \pm 1,30\%$, estando na faixa descrita para gelatinas comerciais, que geralmente apresentam conteúdo de umidade entre $9-14\%^{14}$.

O rendimento médio da gelatina de pele de tilápia foi $8,85 \pm 1,80\%$. Esse valor é superior aos valores relatados para gelatinas de pele de tilápia negra e vermelha, que foram de $5,39$ e $7,81\%$, respectivamente⁷; e menor que os rendimentos descritos por Grossman e Bergman¹⁰ para tilápia sp (15%), e por Holzer¹⁸, que relatou método de extração de gelatina de pele com possibilidade de atingir rendimentos superiores a 20% .

Sabe-se que baixas temperaturas resultam em rendimentos inferiores e incompleta extração, enquanto, temperaturas mais elevadas tendem a degradar a gelatina produzida, afetando sua qualidade¹⁸. No entanto, a temperatura empregada neste estudo na etapa de extração foi semelhante a dos trabalhos citados anteriormente, indicando que os diferentes rendimentos encontrados, provavelmente devem-se à excessiva perda de colágeno durante as etapas iniciais de lavagem.

A gelatina de pele de tilápia possui força de gel de $243 \pm 7,55$ g (Tabela 2), sendo superior aos valores reportados por Jamilah e Harvinder⁷ para gelatinas de pele de tilápia negra ($180,76$ g) e vermelha ($128,11$ g), e inferior aos valores descritos por Grossman e Bergman¹⁰ para tilápia sp (263 g). Zhou e Regenstein¹⁹ e Cho et al⁸ relataram valores de força de gel para gelatinas de polaca do Alasca e atum de cauda amarela de 400 e 426 g, respectivamente, consideravelmente maiores aos encontrados neste trabalho. Gómez-Guillén et al²⁰ reportaram diferenças na força de gel para gelatinas obtidas de pele de linguado (~ 350 g), linguado areeiro (340 g), bacalhau (70 g) e merluza (100 g). As variações acima observadas poderiam ser explicadas por diferenças entre os processos de obtenção da gelatina e o conteúdo de iminoácidos das respectivas espécies de pescado. Sabe-se que as propriedades da gelatina são largamente influenciadas pelo processo de extração e pelo colágeno original²¹, que pode variar significativamente de acordo com a espécie^{5,4}, sendo largamente dependente da temperatura do habitat do peixe⁵.

O prolongamento do tempo de maturação para 42 ± 1 h e 66 ± 1 h propiciou uma elevação aproximada

de 10 e 15% , respectivamente, na força de gel da gelatina de tilápia. Sabe-se que, o tempo e temperatura de maturação influenciam nas propriedades dos géis de gelatina²². Arnesen e Gildberg²³ relataram aumento de 250% na força de gel da gelatina de pele de bacalhau, quando o tempo de estocagem foi prolongado para 144 h (6 dias). O fortalecimento do gel durante a maturação é principalmente atribuído à regeneração da estrutura helicoidal pelas cadeias polipeptídicas do colágeno e à formação de ligações de hidrogênio entre os aminoácidos hidroxilados e as moléculas de água^{16,23}.

Tabela 2. Força de gel da gelatina de pele de tilápia em diferentes tempos de maturação

Gelatina de pele de tilápia	Força de gel (g)	Força de gel (g)	Força de gel (g)
	18 ± 1h	42 ± 1h	66 ± 1h
	243 ± 7,55	266 ± 6,25	279 ± 9,20

Valores médios referentes a três determinações ± desvio padrão

O comportamento dos módulos de elasticidade G' , viscosidade G'' (a) e ângulo de fase δ (b), monitorados durante o resfriamento de 40 para 7°C , podem ser observados na Figura 1. Em temperatura próxima a $25,5^\circ\text{C}$ observa-se o incremento do módulo elasticidade G' , em relação ao módulo viscosidade G'' (Figura 1a), denotando o início do processo de geleificação; efeito confirmado pelo decréscimo do ângulo de fase δ (Figura 1b), demonstrando o comportamento viscoelástico da gelatina e a tendência ao predomínio do componente elástico, abaixo dessa temperatura. Então, o processo ocorre rapidamente até o ponto de geleificação (*gelling point*), em torno de $22,5^\circ\text{C}$, onde acontece a intersecção dos módulos de elasticidade G' e viscosidade G'' .

Após o resfriamento, a gelatina de pele de tilápia foi submetida a aquecimento para avaliar o seu comportamento viscoelástico (Figura 2). Observa-se que em torno de $18,5^\circ\text{C}$ inicia-se a fusão da gelatina, visto o rápido decréscimo do módulo elasticidade G' , em relação ao módulo viscosidade G'' (Figura 2a) e o consequente aumento ângulo de fase (Figura 2b). Então, com a tendência contínua ao decréscimo do componente elástico G' , o ponto de fusão (*melting point*) é observado em temperatura próxima a 27°C (Figura 2a).

Fernandéz-Díaz et al⁹ e Alfaro et al²⁴ relataram em seus trabalhos a influência do tempo de maturação, sobre as propriedades viscoelásticas da gelatina de pescado,

aumentando seus pontos de fusão. Para avaliação da influência do frio sobre as propriedades viscoelásticas da gelatina, a amostra foi mantida a 7°C, por alguns minutos, antes do início do aquecimento. Observa-se (Figura

2a) que ocorre um aumento do módulo elasticidade G' , durante esse intervalo de tempo. Segundo Gómez-Guillén et al²⁰, esta elevação da elasticidade é resultante da rápida maturação causada pelo frio.

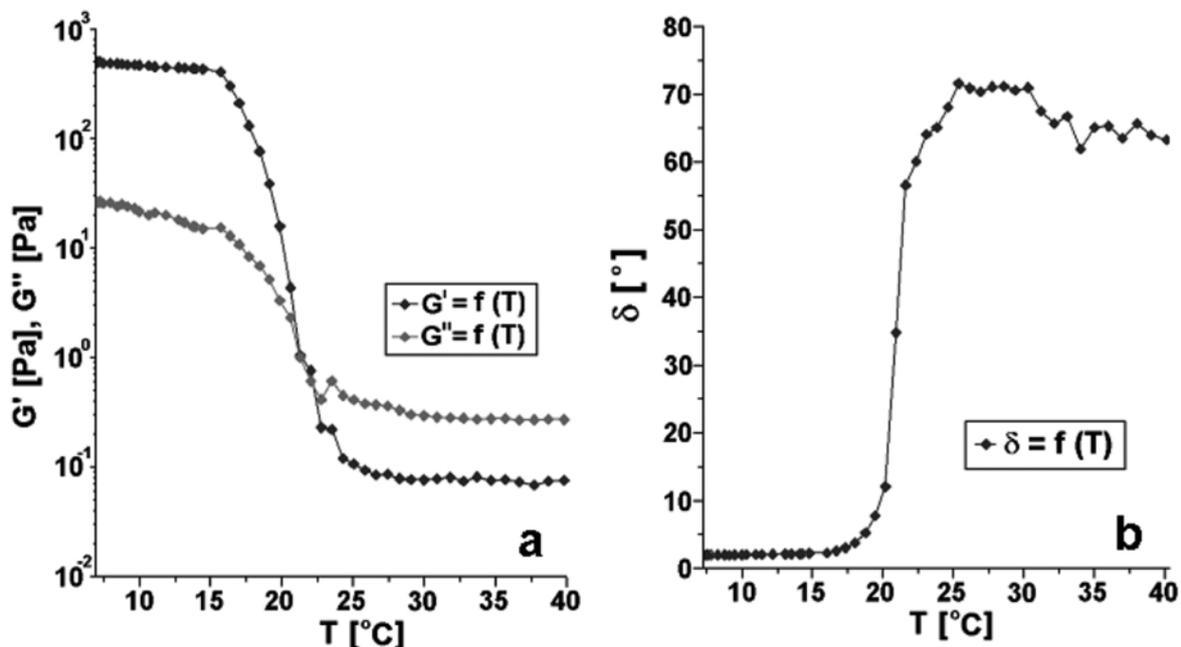


Figura 1. Módulos de elasticidade G' e viscosidade G'' (a) ângulo de fase δ , (b) durante resfriamento de 40°C para 7°C da amostra de gelatina de pele de tilápia

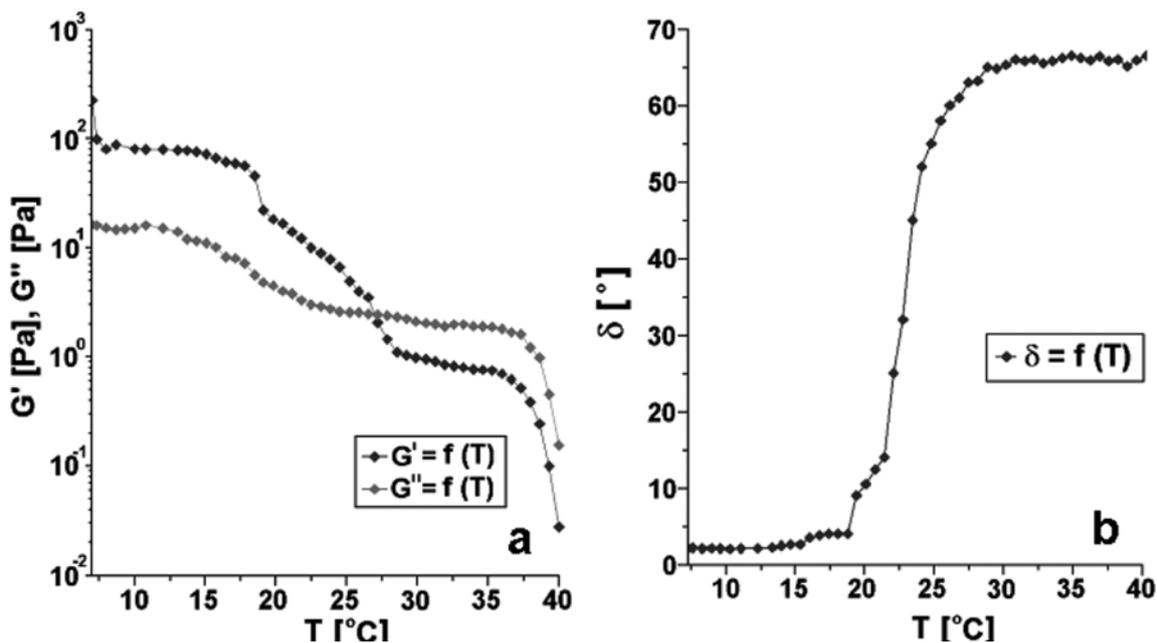


Figura 2. Módulos de elasticidade G' e viscosidade G'' (a) ângulo de fase δ , (b) durante aquecimento de 7°C para 40°C da amostra de gelatina de pele de tilápia

As temperaturas de geleificação e fusão das gelatinas vem sendo relacionadas com a proporção de prolina e hidroxiprolina da molécula de colágeno original^{3,16}, e com o tratamento utilizado no processo^{25,26}. Portanto, os pontos de geleificação e fusão das gelatinas são fortemente dependentes da sua distribuição de peso molecular e composição de aminoácidos²¹.

Os valores de viscosidade para a maioria das gelatinas comerciais têm sido reportados entre 2,0 - 7,0cP, e acima de 13,0 cP para gelatinas especiais^{21,5,7}. A viscosidade das gelatinas também é um importante parâmetro para determinação de seu valor comercial. Sob aspecto de funcionalidade, a viscosidade da solução de gelatina é a sua segunda mais importante propriedade física²⁷. Gelatinas com baixa viscosidade resultam em géis frágeis, enquanto aquelas de alta viscosidade produzem géis consistentes e extensíveis²⁸.

Observa-se (Tabela 3) que a gelatina apresentou maior viscosidade ($5,24 \pm 0,29$ cP), que o valor descrito por Grossman e Bergman¹⁰ para gelatina de pele de tilápia sp. ($5,1$ cP). Segundo Gudmundsson¹⁵, o comportamento viscoso da gelatina é resultante da espécie e das condições de processo, utilizadas na sua manufatura. Sabe-se que a viscosidade das gelatinas é parcialmente influenciada pela distribuição de pesos moleculares e polidispersia^{5,7}. Segundo Johnston-Banks²¹, a viscosidade das gelatinas aumenta com a maior quantidade de compostos de alto peso molecular.

O prolongamento do tempo de maturação para 42 ± 1 h acarretou um aumento de aproximadamente 17%, enquanto, em tempo de 66 ± 1 h a gelatina teve um incremento em torno de 30% na sua viscosidade.

Tabela 3. Viscosidade da gelatina de pele de tilápia em diferentes tempos de maturação

Gelatina de pele de tilápia	Viscosidade (cP)	Viscosidade (cP)	Viscosidade (cP)
	18 ± 1 h	42 ± 1 h	66 ± 1 h
	5,24 ± 0,29	6,15 ± 0,22	6,83 ± 0,44

Valores médios referentes a três determinações ± desvio padrão

CONCLUSÃO

A gelatina de pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*) possui propriedades reológicas intermediárias às descritas na literatura, para outras gelatinas de pescado. O prolongamento do tempo de maturação propicia a elevação da sua viscosidade e força de

gel. Alguns agentes, como sais e enzimas poderiam ser utilizados com intuito de maximizar as suas propriedades reológicas.

AGRADECIMENTOS

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA SUÍNOS E AVES, Concórdia (SC), pela liofilização das amostras.

Ao Laboratório de Biopolímeros da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) pela disponibilização do equipamento para as análises viscoelásticas.

Ao Laboratório de Tecnologia de Pescados da Universidade do Rio Grande (FURG), pela disponibilização do equipamento para as análises de força de gel.

REFERÊNCIAS

1. Simon A, Vandanjon L, Levesque G, Bourseau P. Concentration and desalination of fish gelatin by ultrafiltration and continuous diafiltration processes. Desalination. 2000; 144: 313-8.
2. Schott A. Functions of gelatine in food applications. Am Assoc Cereal Chemists, Inc. 2001; 46: 414-6.
3. Gilsenan PM, Ross-Murphy SB. Rheological characterisation of gelatins from mammalian and marine sources. Food Hydrocoll. 2000; 14: 191-5.
4. Muyonga JH, Cole CGB, Duodu KG. Extraction and physico-chemical characterisation of Nile perch (*Lates niloticus*) skin and bone gelatin. Food Hydrocoll. 2004; 18: 581-92.
5. Gudmundsson M, Hafsteinsson H. Gelatin from cod skins as affected by chemical treatments. J Food Sci. 1997; 62: 37-9.
6. Choi SS, Regenstein JM. Physicochemical and sensory characteristics of fish gelatin. J Food Sci. 2000; 65: 194-9.
7. Jamilah B, Harvinder KG. Properties of gelatins from skins of fish: black tilápia (*Oreochromis mossambicus*) and red tilápia (*Oreochromis nilotica*). Food Chem. 2002; 77: 81-4.
8. Cho SM, Gu YS, Kim SB. Extracting optimization and physical properties of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) skin gelatin compared to mammalian gelatins. Food Hydrocoll. 2004; 19: 221-9.

9. Fernandez-Díaz MD, Montero P, Gómez-Guillén MC. Effect of freezing fish skins on molecular and rheological properties of extracted gelatin. *Food Hydrocoll*. 2003; 17: 281-6.
10. Grossman S, Bergman M, inventores. Process for the production of gelatin from fish skins. US Patent 5,093,474. 1992 Mar 3.
11. Alfaro AT. Otimização das condições de extração e caracterização da gelatina de pele de tilápia (*Oreochromis urolepis hornorum*). [Tese de doutorado]. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas; 2008.
12. Association of Official Agricultural Chemist's International - AOAC. Official Methods of the Association of Official Agricultural Chemist's International. 17th ed., Gaithersburg: AOAC International; 2000.
13. British Standards Institution - BSI. Methods for sampling and testing gelatin (physical and chemical methods). London; 1975.
14. Eastoe JE, Leach AA. Chemical constitution of gelatin. In: Ward AG, Courts A. organizadores. The science and technology of gelatin. London: Academic Press; 1977. p. 73-108.
15. Gudmundsson M. Rheological properties of fish gelatin. *J Food Sci*. 2002; 67: 2172-6.
16. Haug IJ, Draget KI, Smidsrod O. Physical and rheological properties of fish gelatin compared to mammalian gelatin. *Food Hydrocoll*. 2004; 18: 203-13.
17. Jones NR. Uses of gelatin in edible products. In: Ward AG, Courts A. organizadores. The science and technology of gelatin. London: Academic Press; 1977. p. 365-94.
18. Holzer D, inventor. Gelatin production. US Patent 5,484,888; 1996 jan 16.
19. Zhou P, Regenstein JM. Effects of alkaline and acid pretreatments on Alaska Pollock skin gelatin extraction. *J Food Sci*. 2005; 70: 392-6.
20. Gómez-Guillén MC, Turnay J, Fernandez-Díaz MD, Ulmo N, Lizarbe M, Montero P. Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study. *Food Hydrocoll*. 2002; 16: 25-34.
21. Johnston-Banks FA. Gelatin. In: Harris P. organizador. Food gels. London: Elsevier Applied Science; 1990. p. 233-89.
22. Kolodziejka I, Kaczorowski K, Piotrowska B, Sadowska M. Modification of the properties of gelatin from skins of Baltic cod (*Gadus morhua*) with transglutaminase. *Food Chem*. 2003; 86(2): 203-9.
23. Arnesen JA, Gildberg A. Extraction and characterization of gelatine from Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Bioresource Technol*. 2007; 98: 53-7.
24. Alfaro AT, Costa CS, Prentice C. Propiedades reológicas, estructurales y físico-químicas de gelatina de huesos de pescadilla (*Macrodon ancylodon*) sometidos a tratamiento ácido preliminar. *Alimentaria*. 2005; 367: 66-73.
25. Montero P, Fernandez-Díaz MD, Gómez-Guillén MC. Characterization of gelatin gels induced by high pressure. *Food Hydrocoll*. 2002; 16: 197-205.
26. Alfaro AT, Fonseca GG, Costa CS, Prentice C. Effect of extraction parameters on the properties of gelatin from King weakfish (*Macrodon ancylodon*) bones. *Food Sci Technol Int*. 2009; 15: 553-62.
27. Cole CGB. Gelatin Food Science. [acesso 19 set 2009] Disponível em: [<http://www.gelatin.co.za>].
28. Wainwright FW. Physical tests for gelatin and gelatin products. In: Ward AG, Courts A. organizadores. The science and technology of gelatin. London: Academic Press; 1977. p. 508-57.

Avaliação da estabilidade química de sardinhas-verdadeiras (*Sardinella brasiliensis*) inteiras e evisceradas armazenadas sob refrigeração

The chemical stability of whole and eviscerated Brazilian sardines (*Sardinella brasiliensis*) stored under refrigeration

RIALA6/1329

Sabrina da Costa Silva ANDRADE^{1*}, Eliane Teixeira MÁRSICO², Lourdes Maria Pessoa MASSON³, Carlos Frederico Marques GUIMARÃES²

*Endereço para correspondência: Avenida Roberto Silveira, 2258, Flamengo, Marica/RJ, Brasil. CEP 24900-000. Tel: 21 2637-2776. E-mail: sabrina.vet@gmail.com.

¹Faculdade de Veterinária, Programa de Pós Graduação em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal, Universidade Federal Fluminense

²Departamento de Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Veterinária Universidade Federal Fluminense

³Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro

Recebido: 05.07.2010 – Aceito para publicação: 29.12.2010

RESUMO

A estabilidade química de amostras de sardinhas refrigeradas em três diferentes condições de conservação foi avaliada por meio de determinação de bases voláteis totais (N-BVT) e análise de produção de histamina, putrescina e cadaverina. As amostras foram separadas em três grupos: o primeiro composto de sardinhas inteiras refrigeradas, sem adição de gelo (4-7°C); o segundo e o terceiro grupos foram constituídos, respectivamente, de sardinhas inteiras e evisceradas, com adição de gelo (0-3°C). Somente o primeiro grupo apresentou teor de N-BVT acima do preconizado pela legislação no 14º dia de estocagem. Nos segundo e terceiro grupos, os valores mantiveram-se abaixo de 17 mg N.100 g⁻¹. Em todos os grupos não houve produção de histamina acima do limite oficial de 10 mg.100 g⁻¹, contudo no primeiro grupo o valor inferior a 2 mg.100 g⁻¹ foi detectado a partir do 21º dia de estocagem. Putrescina e cadaverina foram detectadas a partir do 12º, 16º e 19º dias de estocagem, respectivamente, no primeiro, segundo e terceiro grupo. A presença de formaldeído foi avaliada, cujo resultado foi positivo em todos os grupos estudados. A longa validade comercial dessas espécies ocorreu em função do uso de conservante na cadeia produtiva.

Palavras-chave. Sardinhas, bases voláteis totais, histamina, formaldeído.

ABSTRACT

This study evaluated the chemical stability of chilled sardines under three preservation conditions by determining the total volatile bases (TVB-N), and the production of histamine, putrescine and cadaverine. The samples were separated into three groups: the first was composed by chilled whole sardines without ice addition (4-7°C), and the second and third groups were comprised by whole and eviscerated sardines, respectively, and adding ice (0-3°C). Only the first group showed TVB-N contents above the recommended rate at the 14th storage day. In the second and third groups, the values remained below 17 mg N.100 g⁻¹. Histamine was within the recommended limit of 10 mg.100 g⁻¹ in all groups, and values lower than 2 mg.100 g⁻¹ were detected after the 21st storage day in the first group. Putrescine and cadaverine were detected after the 12th, 16th and 19th storage days in the first, second and third groups, respectively. The presence of formaldehyde was evaluated, which was positive in all three groups. These findings indicate that the long shelf life of these products was due to use of preservatives in the production chain.

Key words. Sardines, total volatile bases, histamine, formaldehyde.

INTRODUÇÃO

A sardinha-verdadeira (*Sardinella brasiliensis*), segundo dados estatísticos do IBAMA¹, é o peixe de maior importância econômica no Estado do Rio de Janeiro, destacando-se pelo alto consumo, em função do preço acessível ao consumidor e das características nutricionais e funcionais que apresenta^{2,3,4,5}. Porém, pela alta captura desta espécie, a sardinha-verdadeira vem sendo submetida ao controle oficial, por intermédio do período de defeso, que proíbe o exercício da pesca durante os picos de reprodução e de recrutamento da espécie objetivando a recuperação da biomassa, podendo, neste período, ser comercializada apenas na forma beneficiada⁶.

Devido à sua composição química, atividade de água elevada e pH próximo à neutralidade, o pescado degrada-se com facilidade⁵. Segundo Huss⁷, a deterioração do peixe refrigerado é causada principalmente pela ação de bactérias. Jay⁸ afirma que a velocidade do processo de deterioração pode ser diminuída através da evisceração do pescado que impede a ação das bactérias intestinais, auxiliadas pela ação das enzimas proteolíticas.

A determinação das Bases Voláteis Totais (N-BVT) é um dos métodos mais amplamente utilizados para avaliar a qualidade do pescado, devido a simplicidade analítica e razoável concordância com o estado de frescor^{9,10}. As principais bases nitrogenadas são trimetilamina (TMA), dimetilamina (DMA), monometilamina (MMA) e amônia, encontradas no músculo do pescado em proporções variadas, segundo a espécie e estado de deterioração da amostra¹¹. Segundo a Portaria nº 185¹², o pescado é considerado deteriorado quando apresenta teor de N-BVT superior ou igual a 30 mg N.100 g⁻¹. Diversos autores estudando diferentes espécies de sardinhas, observaram que valores próximos aos preconizados na legislação brasileira foram encontrados em um período de 10-15 dias para temperaturas de estocagem entre 0-4°C^{13,14,15}.

As aminas biogênicas têm sido frequentemente utilizadas para estimar o frescor ou o grau de deterioração do pescado, pois são compostos presentes em baixos níveis no pescado fresco, cuja produção está associada à atividade de bactérias deterioradoras^{16,17}. A histamina é a diamina mais comumente estudada por ser potencialmente causadora de intoxicação por consumo de peixes com alto teor de histidina livre que, por ação de enzimas descarboxilases, produzem histamina, e por tratar-se de uma análise oficial^{12,16,18}. A Portaria nº 185¹² preconiza um limite máximo de histamina de 10 mg.100 g⁻¹

(100 ppm) para as espécies pertencentes às famílias *Scombridae*, *Scombrosocidae*, *Clupeidae*, *Coryphaenidae* e *Pomatomidae*. Segundo Shalaby¹⁹, o armazenamento de peixes em baixa temperatura reduz a taxa de formação das aminas biogênicas. Ababouch et al¹⁵ e Veciana-Nogués et al¹⁶, ao avaliarem peixes de diferentes espécies estocados em temperaturas variadas, observaram que a concentração de histamina aumentou com a elevação da temperatura e do tempo de armazenamento, comprovando, desta forma, a relação da produção desta amina com a temperatura de estocagem do produto.

Diante dos aspectos descritos, o objetivo do presente estudo foi avaliar a estabilidade química de sardinhas armazenadas em três diferentes condições de conservação: inteiras refrigeradas sob temperatura controlada (4-7°C) sem adição de gelo, inteiras refrigeradas (0-3°C) com adição de gelo e evisceradas, refrigeradas (0-3°C) adicionadas de gelo, utilizando como parâmetros de qualidade a determinação de N-BVT e a semi-quantificação de histamina, putrescina e cadaverina.

MATERIAL E MÉTODOS

Cerca de cinco quilos de sardinha-verdadeira (*Sardinella brasiliensis*) foram adquiridas aleatoriamente de um lote constituído por 50 Kg, no mercado consumidor do município de Niterói (RJ), em setembro de 2008, antes do início do período de defeso, e encaminhadas em recipientes isotérmicos de poliestireno expandido com gelo ao Laboratório para preparo dos grupos e acompanhamento da validade comercial através dos procedimentos analíticos eleitos como viáveis para a espécie. Em condições laboratoriais, as amostras foram lavadas em água corrente, separadas em três grupos homogêneos e mantidas sob refrigeração. No primeiro grupo as sardinhas inteiras foram mantidas em refrigeração sob temperatura controlada (4-7°C), sem adição de gelo; no segundo e terceiro grupos, as sardinhas inteiras e as evisceradas, respectivamente, foram mantidas sob refrigeração (0-3°C) em gelo filtrado.

A determinação das bases voláteis totais foi realizada em duplicata pela técnica oficial de microdifusão em Placas de Conway, descrita no Manual do Laboratório Nacional de Referência Animal – LANARA²⁰, que se fundamenta na extração das bases voláteis pela adição de ácido tricloroacético a 10%, à amostra e liberação das mesmas pela adição de carbonato de potássio ao extrato. O nitrogênio volátil liberado difunde-se pelo ar e fixa-se na solução de ácido bórico, sendo

posteriormente titulado com ácido clorídrico. A análise de histamina, putrescina e cadaverina foi realizada pela técnica semiquantitativa de cromatografia em camada delgada descrita por Schutz et al²¹, que consistiu na extração das aminas biogênicas das amostras com metanol, corrida cromatográfica em placa de sílica em gel e revelação por aspersão uniforme de solução de ninhidrina a 0,3% em metanol. As análises foram realizadas a cada um ou dois dias, de acordo com a evolução dos resultados, até o 28º dia de estocagem.

O procedimento analítico para avaliar a presença de formaldeído não foi previsto na metodologia inicial e foi realizado em função da longa validade comercial observada nas amostras estudadas. Esta análise baseou-se na técnica qualitativa de identificação de formaldeído com floroglucina (método 280/IV), descrita no Manual de métodos físico-químicos para análise de alimentos do Instituto Adolfo Lutz²², sendo realizada no 23º dia de estocagem com um “pool” proveniente de 10 amostras de cada grupo estudado.

Para verificação de diferenças entre os grupos, os resultados foram analisados a partir de estatística descritiva simples e análise de variância (ANOVA), a um nível de significância de 5%, utilizando o programa computacional Microsoft Office Excel 2003.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados sumarizados podem ser observados na Figura 1, na qual se demonstra que sardinhas inteiras refrigeradas, sob temperatura controlada, sem adição de

gelo (4-7°C) apresentaram teores de N-BVT acima do limite aceitável no 14º dia de estocagem, enquanto as sardinhas inteiras e as evisceradas, estocadas em gelo (0-3°C) apresentaram teores abaixo de 17 mg N.100 g⁻¹ até o 28º dia de estocagem, mantendo-se, portanto, dentro do limite preconizado pela legislação vigente no decorrer do período experimental de validade comercial. Apesar dos resultados obtidos nas amostras de sardinhas evisceradas terem sido inferiores, quando comparados aos obtidos nas demais condições de armazenamento, fato este, possivelmente correlacionado à diminuição das enzimas do tecido visceral que aceleram a autólise⁵, estes resultados não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais ($p > 0,05$).

Com relação à produção de histamina, os dados são apresentados na Tabela 1, onde se observa que em todas as condições experimentais não houve produção desta amina em níveis acima do limite de 10 mg.100 g⁻¹ (100 ppm) preconizado pela Portaria 185¹². No 3º grupo, composto por amostras de sardinha inteira mantidas em refrigeração, sob temperatura controlada, sem adição de gelo (4-7°C), esta diamina foi observada em um valor inferior a 2 mg.100 g⁻¹ em torno do 21º dia de estocagem. Ainda nestas condições a presença de outras aminas biogênicas (putrescina e cadaverina) foi observada a partir do 12º dia de estocagem. Nos grupos das amostras de sardinhas inteiras e evisceradas, estocadas em gelo (0-3°C), a presença de histamina não foi observada. Entretanto, a presença de outras aminas (putrescina e cadaverina) pôde ser observada a partir do 16º e 19º dia de estocagem, respectivamente.

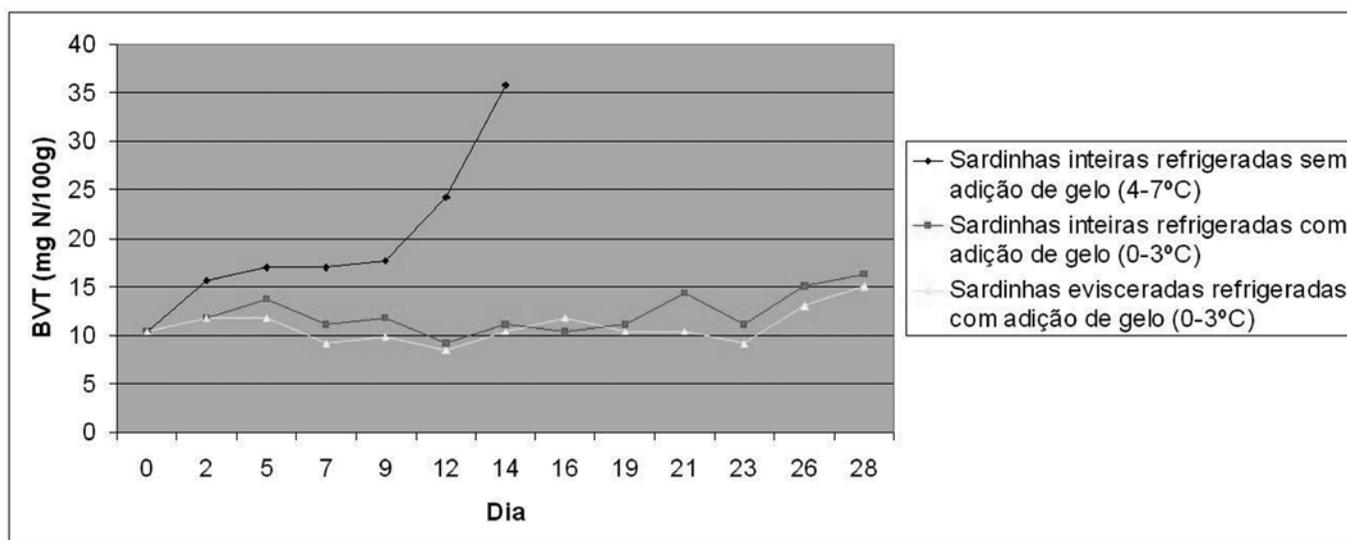


Figura 1. Valores médios da determinação das bases voláteis totais (mg N.100g⁻¹) de sardinhas inteiras refrigeradas sem adição de gelo (4-7°C), inteiras refrigeradas com adição de gelo (0-3°C) e evisceradas refrigeradas com adição de gelo (0-3°C) até 28º de estocagem

Tabela 1. Teor de histamina ($\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$) em sardinhas inteiras refrigeradas sem adição de gelo ($4-7^{\circ}\text{C}$), inteiras refrigeradas com adição de gelo ($0-3^{\circ}\text{C}$) e evisceradas refrigeradas com adição de gelo ($0-3^{\circ}\text{C}$) por 28 dias de estocagem

DIA	Histamina ($\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$)		
	Sardinhas inteiras refrigeradas sem adição de gelo ($4-7^{\circ}\text{C}$)	Sardinhas inteiras refrigeradas com adição de gelo ($0-3^{\circ}\text{C}$)	Sardinhas evisceradas refrigeradas com adição de gelo ($0-3^{\circ}\text{C}$)
0 a 20	N.D.	N.D.	N.D.
21	< 2,0	N.D.	N.D.
23	< 2,0	N.D.	N.D.
26	2,0	N.D.	N.D.
28	2,0	N.D.	N.D.

N.D.: Não detectável pela técnica de cromatografia em camada delgada

Apesar da legislação nacional não pontuar limites para outras aminas biogênicas, cabe ressaltar que a presença destas é de suma importância por serem potencializadoras da ação da histamina, pois inibem o sistema de detoxificação do organismo e aumentam a absorção intestinal da histamina^{18,19,23}, além de caracterizarem perda da qualidade nutricional do alimento por degradação de aminoácidos.

Os resultados do presente estudo diferiram dos relatados por Erkan e Özden²⁴ que, ao analisarem sardinhas da espécie *Sardina pilchardus* inteiras e evisceradas, mantidas sob refrigeração em gelo, obtiveram valores para N-BVT de até $29,23 \text{ mg N}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ e $15,03 \text{ mg N}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$, respectivamente, em apenas nove dias de estocagem, e um teor de histamina de $5,28 \text{ mg}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ neste mesmo período. Marrakchi et al¹⁴, ao avaliarem sardinhas desta mesma espécie, inteiras e estocadas em gelo, observaram que o limite máximo estabelecido para N-BVT foi atingido entre 10 e 15 dias de estocagem. Ababouch et al¹⁵, ao estudarem sardinhas desta mesma espécie estocadas em gelo, registraram valores distintos de N-BVT, um de $45 \text{ mg N}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ em 200 horas e outro de $30 \text{ mg N}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$, em 400 horas, atribuindo este fato à presença de micro-organismos que influenciam na produção de bases voláteis. Para histamina, esses autores observaram valores de $14,74$ e $21,05 \text{ mg}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ após 11 e 13 dias de armazenamento em gelo, respectivamente. Shakila et al²⁵, ao avaliarem sardinhas da espécie *Sardinella fimbriata* estocadas em temperatura ambiente, relataram que após um período de 18 horas, o limite estabelecido para N-BVT foi alcançado e,

após um período de 15 horas de estocagem, encontraram $5 \text{ mg}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ (50 ppm) de histamina. Beraquet et al¹³ verificando a qualidade da sardinha verdadeira fresca e processada termicamente encontraram na sardinha fresca quantidades de N-BVT entre $21-30 \text{ mg N}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$, para um período de estocagem de 14 dias a $0-4^{\circ}\text{C}$.

Desta forma, como as amostras demonstraram uma validade comercial muito extensa, diferindo do observado por diversos autores, suspeitou-se de adição de conservantes e analisou-se qualitativamente a presença de formaldeído nas amostras, observando positividade para os três grupos estudados. Isto explica os resultados encontrados, pois o formaldeído é um conservante que, segundo a Portaria nº 540²⁶, impede ou retarda a alteração dos alimentos provocada por micro-organismos ou enzimas, sendo ainda um agente mutagênico e cancerígeno de emprego, como aditivo alimentar, proibido no Brasil, segundo a Resolução nº 4²⁷.

CONCLUSÃO

O uso adequado da cadeia de frio e a adição de gelo aumentam a validade comercial da sardinha. A não adição de gelo faz com que esse período diminua e os limites oficiais de avaliação do frescor de pescado sejam atingidos num menor tempo de estocagem. O processo de evisceração não influenciou de forma significativa na validade comercial das amostras em função da adição de formaldeído. Sendo assim, com o objetivo de aumentar a validade comercial destas espécies, aumentando

assim, o período de venda, os resultados sugerem que conservantes estejam sendo utilizados em alguma etapa da cadeia produtiva, fato comprovado pela constatação da presença de formaldeído nas amostras estudadas. Diante deste fato, este estudo serve como um alerta para as autoridades brasileiras intensificarem a fiscalização no comércio de pescado, objetivando, desta forma, a não ocorrência de fraudes.

REFERÊNCIAS

1. IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Estatística da pesca 2006 Brasil: grandes regiões e unidades da federação. Brasília;2008.
2. Osman H, Suriah AR, Law EC. Fatty acid composition and cholesterol content of selected marine fish in Malaysian waters. *Food Chem*. 2001;73(1):55-60.
3. Espírito Santo MLP, Beirão LH, Sant'ana ES, Dalcin EB, Franco BGM. Bacteriocinogenic effect of *Lactobacillus sakei* 2a on microbiological quality of fermented *Sardinella brasiliensis*. *Braz Arch Biol Technol*. 2003;46(4):553-61.
4. Visentainer JV, Carvalho PO, Ikegaki M, Park YK. Concentração de ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) em peixes marinhos da costa brasileira. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2000;20(1):90-3.
5. Ogawa M, Maia EL. Manual de pesca: ciência e tecnologia do pescado. São Paulo: Livraria Varela; 1999.
6. Brasil. Instrução Normativa nº 128 de 2006 do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF. 26 outubro 2006.
7. Huss HH. Garantia da Qualidade dos produtos da pesca. Roma: FAO; 1997.
8. Jay MJ. Microbiologia de alimentos. 6 ed. Porto Alegre: Artmed; 2005.
9. Huss HH. El Pescado Fresco: Su Calidad y Cambios de su Calidad. Dinamarca: FAO; 1999.
10. Contreras-Guzmán ES. Bioquímica de pescado e derivados. Jaboticabal: FUNEP; 1994.
11. Giannini DH. Determinación de nitrógeno básico volátil (NBV) en pescado: consideraciones generales. *Alimentaria*. 2003;40(343):49-54.
12. Brasil. Portaria nº 185 de 1997 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Peixe Fresco (inteiro e eviscerado). Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 13 maio 1997.
13. Beraquet NJ, Lindo MMK, Vieira MC. Métodos químicos na avaliação da qualidade de sardinha (*Sardinella brasiliensis*) fresca e processada termicamente. *Col ITAL*. 1985; 15:141-70.
14. Marrakchi AE, Bennour M, Bouchriti N, Hamama A, Tagafait H. Sensory, chemical and microbiological assessments of Moroccan sardines (*Sardina pilchardus*) stored in ice. *J Food Prot*. 1990;53(7):600-5.
15. Ababouch LH, Souibri L, Rhaliby K, Ouahdi O, Battal M, Busta FF. Quality changes in sardines (*Sardina pilchardus*) stored in ice and at ambient temperature. *Food Microbiol*. 1996;13:123-32.
16. Veciana-Nogués MC, Mariné-Font A, Vidal-Carou MC. Biogenic amines as hygienic quality indicators of tuna. Relationship with microbial counts, ATP- related compounds volatile amines and organoleptic changes. *J Agric Food Chem*. 1997;45: 2036-41.
17. Lapa-Guimarães J, Pickova J. New solvent systems for thin-layer chromatographic determination of nine biogenic amines in fish and squid. *J Chromatogr A*. 2004;1045: 223-32.
18. Lehane L, Olley J. Histamine fish poisoning revisited. *Int J Food Microbiol*. 2000;58:1-37.
19. Shalaby AR. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Res Int*. 1996;29(7):675-90.
20. Brasil. Métodos analíticos oficiais para o controle de Produtos de Origem Animal e seus ingredientes. II – Métodos físicos e químicos. Laboratório Nacional de Referência Animal (LANARA). Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, DF. 1981.
21. Schutz DE, Chang GW, Bjeldanes LF. Rapid thin layer chromatographic method for the detection of histamine in fish products. Chemical indexes. Department of Nutrition Science; University of California Berkeley, 1976.
22. Brasil. Métodos Físico-químicos para análise de Alimentos do Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 1018 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos), 4 ed.
23. Önal A. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in food. *Food Chem*. 2007;103:1475-86.
24. Erkan N, Özden Ö. Quality assessment of whole and gutted sardines (*Sardina pilchardus*) stored in ice. *Int J Food Sci Technol*. 2008;43:1549-59.
25. Shakila RJ, Vijayalakshmi K, Jeyasekaran G. Changes in histamine and volatile amines in six commercially important species of fish of the Thoothukudi coast of Tamil Nadu, India stored at ambient temperature. *Food Chem*. 2003;82:347-52.
26. Brasil. Portaria nº 540 de 1997 do Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares - definições, classificação e emprego. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 27 outubro 1997.
27. Brasil. Resolução nº 4 de 1988 do Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova revisão das tabelas I, III, IV e V referente a aditivos intencionais, bem como os anexos I, II, III e VII, todas do Decreto nº 55.871 de 26 de março de 1965. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 24 novembro 1988.

Aflatoxinas em amendoim: melhoria da qualidade e programas de controle

Aflatoxins in peanut: quality improvement and control programs

RIALA6/1330

Luzia SHUNDO*, Sandra Aparecida NAVAS, Valter RUVIERI, Janete ALABURDA, Leda Conceição Antonia LAMARDO, Myrna SABINO

*Endereço para correspondência: Núcleo de Contaminantes Orgânicos, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, São Paulo/SP, Brasil. CEP 01246-902. Fone 11 30682922. E-mail: lushundo@ial.sp.gov.br

Recebido: 12.07.2010 – Aceito para publicação: 29.12.2010

RESUMO

Trezentas amostras de amendoim e de derivados de amendoim colhidas no Estado de São Paulo pela Vigilância Sanitária em 2000, 2002 e 2009 foram analisadas para a determinação de aflatoxinas, em cumprimento ao programa de monitoramento da Secretaria de Estado da Saúde. Das 56 amostras coletadas em 2000, 25 apresentaram valores de aflatoxinas acima da legislação em vigor, cujas concentrações variaram de 18 µg/kg a 1947 µg/kg. Das 73 e 171 amostras coletadas em 2002 e 2009, sete e três amostras apresentaram valores acima da legislação em vigor, em que as concentrações variaram, respectivamente, de 4,4 µg/kg a 648 µg/kg e de 0,03 µg/kg a 71 µg/kg. Houve decréscimo nos teores de contaminação, embora ainda com valores elevados de aflatoxinas. Esse fato pode ser atribuído a ações do governo juntamente com a iniciativa privada e produtores para melhorar a qualidade do amendoim. Por ser recorrente, a contaminação com aflatoxinas muitas vezes é inevitável. Desta forma, os programas de monitoramento constituem uma ferramenta importante para manter os valores de aflatoxinas nos limites da legislação em vigor, para diminuir o risco à saúde humana e do animal a essa micotoxina.

Palavras-chave. Aflatoxinas, amendoim, programas de controle.

ABSTRACT

Three hundred samples of peanut and peanut products were collected from the state of São Paulo by Public Health Surveillance in 2000, 2002 and 2009. The occurrence of aflatoxins was analyzed in these samples, in conformity of the monitoring program regulation of the São Paulo State Health Department. Of 56 samples collected in 2000, 25 were contaminated with value above the legal limit for aflatoxin contents ranging from 18µg/kg to 1947 µg/kg. Of 73 and 171 samples collected in 2002 and 2009, seven and three samples were contaminated with levels above the established limit for aflatoxins, ranging from 4.4 µg/kg to 648 µg/kg, and 0.03 µg/kg to 71µg/kg, respectively. Decrease in the aflatoxin contamination levels were found, although its values were still high. This fact should be attributed to the government actions and a joint effort with the private sectors and peanut producers, in order to improve the quality of these products. Aflatoxins are recurrent, sometimes unavoidable contaminants of peanuts. For this reason, monitoring programs constitute an important tool for keeping the aflatoxin levels under the regulatory limits, for decreasing the human and animal health risk to this mycotoxin.

Key words. Aflatoxins, peanut, monitoring programs.

INTRODUÇÃO

A micotoxicologia moderna iniciou-se com a descoberta das aflatoxinas no início da década de 1960, embora haja evidências dos problemas causados pelas micotoxinas desde os tempos mais remotos. O envolvimento do Brasil no episódio dos anos 60 ocorreu por meio do farelo de amendoim contaminado exportado para a Inglaterra, quando mais de 100.000 perus morreram após a ingestão de ração produzida com tal matéria prima. Entretanto, somente nas últimas décadas as micotoxinas vêm ganhando atenção global, devido a seus efeitos adversos para a saúde humana e animal e para a economia¹.

As aflatoxinas são metabólitos tóxicos produzidos principalmente pelo *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, sendo considerada uma das substâncias naturais de maior carcinogenicidade conhecida. Foi classificada como carcinogênica para humanos (grupo 1) pela IARC (International Agency for Research on Cancer)².

No Brasil, as pesquisas relacionadas com as aflatoxinas iniciaram em 1967, envolvendo 3 instituições: ESALQ/USP (Escola Superior de Agricultura Luiz de Queirós/Universidade de São Paulo), IAL/SP (Instituto Adolfo Lutz/São Paulo) e ICB/USP (Instituto de Ciências Biomédicas/USP)¹. Entretanto, em 1961, Amaral, do Instituto Biológico da Secretaria da Agricultura de São Paulo, atribuiu a morte de suínos à ingestão de farelo de amendoim que mostrou ser tóxicos para cobaias. Este pode ser considerado o primeiro trabalho publicado no Brasil em micotoxinas³.

A primeira legislação brasileira para aflatoxinas em alimentos foi estabelecida em 1976, com a Resolução nº 34/76, da CNNPA/MS (Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos/Ministério da Saúde)⁴, fixando o limite máximo permitido para a somatória das concentrações das Aflatoxinas B₁ e G₁ em 30 µg/kg. Em 2002, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), por meio da Resolução RDC nº 274/2002⁵, internalizou a Resolução MERCOSUL/GMC nº 25/2002⁶ que estabeleceu limite de 20 µg/kg para a somatória das aflatoxinas B₁+B₂+G₁+G₂. Na Europa, o limite máximo para esta micotoxina é o estabelecido pela EU nº 165/2010⁷ em que o teor máximo permitido de aflatoxina B₁ é de 2 µg/kg e, para a somatória das aflatoxinas B₁+B₂+G₁+G₂, é de 4 µg/kg.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas trezentas amostras de amendoim em grãos e derivados coletados pela Vigilância Sanitária

do Estado de São Paulo em 2000, 2002 e 2009, referente ao Programa Paulista e outras análises fiscais.

Em 2000 e 2002, as aflatoxinas foram determinadas por cromatografia em camada delgada (CCD), como descrito por Soares e Rodriguez-Amaya¹⁴, e em 2009, a determinação foi por cromatografia líquida de alta eficiência-fluorescência (CLAE-FL), com derivatização pós-coluna (Kobra cell) utilizando colunas de imunoafinidade. As colunas de imunoafinidade utilizadas foram das marcas R-Biopharm, Romer e Vicam, cujo procedimento obedeceu o protocolo estabelecido pelo fabricante, atendendo o limite de recuperação superior a 80%.

RESULTADOS

A Tabela 1 mostra os resultados das determinações das aflatoxinas em amendoim em grãos e seus derivados nos anos de 2000, 2002 e 2009. Em 2000, das 56 amostras analisadas de amendoim e derivados, 25 apresentaram concentrações de aflatoxinas acima da legislação em vigor. As amostras contaminadas apresentaram teores variando de 18 µg/kg a 1947 µg/kg. Da mesma forma, em 2002, das 73 amostras analisadas, 7 apresentaram concentrações de aflatoxinas acima da legislação em vigor e os teores das amostras contaminadas variaram de 4,4 µg/kg a 648 µg/kg. Cabe ressaltar que em outubro deste ano, o limite máximo passou para 20 µg/kg, para a somatória das aflatoxinas B₁+B₂+G₁+G₂. Em 2009, das 171 amostras analisadas, 3 apresentaram concentrações de aflatoxinas acima da legislação em vigor, com teores variando de 0,03 µg/kg a 71 µg/kg.

O limite de quantificação (LQ) obtido por CCD foi de 3,0 µg/kg e o limite de detecção (LD) e LQ por CLAE foram de 0,03 µg/kg e 0,06 µg/kg, respectivamente, para as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂.

DISCUSSÃO

Comparando os resultados das determinações das aflatoxinas nestes períodos estudados, observou-se um decréscimo nos níveis de contaminação dos amendoins, embora ainda com valores elevados. Sabe-se que os problemas com o cultivo deste alimento estão concentrados principalmente na colheita e no armazenamento. Algumas iniciativas, com a finalidade de melhorar a qualidade do amendoim, com relação à contaminação por aflatoxinas têm sido estabelecidas. Em 1989, o Programa de Melhoria da Qualidade do Amendoim coordenado pelos

pesquisadores da ESALQ, consistiu em um programa de extensão para levar aos produtores instruções sobre práticas recomendadas para minimizar a incidência de aflatoxinas. Este programa foi levado para as principais regiões produtoras de amendoim do Estado de São Paulo⁸.

Em 2002, a ABICAB (Associação Brasileira da Indústria de Chocolate, Cacau, Amendoim, Balas e Derivados) criou um selo o qual informa ao consumidor que os produtos que estampam esta informação em suas embalagens são seguros por seguirem normas de controle de qualidade baseadas naquelas estabelecidas pela FAO-ONU (Food and Agriculture Organization-Organizações das Nações Unidas). Além disto, as empresas participantes se comprometem a adotar o comportamento ético industrial implantando Boas Práticas de Fabricação (BPF) e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), a fim de atender a legislação em vigor. O selo surgiu com o objetivo de estimular o consumo de amendoim no Brasil. Este projeto conta com o apoio da ANVISA e da iniciativa privada⁹. Também, os produtores deste setor, juntamente com técnicos da Secretaria de Agricultura e Abastecimento, vem continuamente desenvolvendo esforços para a implantação de novas políticas para o setor produtivo do amendoim. Os produtores do oeste paulista estão propondo a criação de programas visando a obtenção de variedades de sementes mais produtivas e adaptadas às condições do clima e solo¹⁰.

Comparando os resultados da incidência, com os de outros autores de outras regiões do país neste período

estudado, observou-se uma tendência de melhora na qualidade dos amendoins, embora com teores máximos elevados e variados. Caldas et al¹¹, em um programa de monitoramento de aflatoxinas em diversos alimentos no Distrito Federal, realizado no período de 1998 a 2001, encontraram aflatoxinas em 39,2% das amostras de amendoim cru, 29,4% em paçocas e doces de amendoim e 26,3% em amendoim confeitado com valores máximos de 1421 µg/kg, 1710 µg/kg e 660 µg/kg para a somatória das aflatoxinas B₁+B₂+G₁+G₂, respectivamente. Em 2002, Batatinha et al¹² analisaram 100 amostras de amendoim e seus derivados comercializados no Estado da Bahia. Das 100 amostras analisadas, 58 continham aflatoxinas com contaminação máxima de 6625 µg/kg. Rocha et al¹³ analisaram 36 amostras de amendoim e paçoca comercializadas na cidade de Alfenas/MG de junho de 2006 a fevereiro de 2007. A incidência de contaminação foi de 38% para as amostras de amendoim e 13% para as amostras de paçoca, sendo que os teores variaram de 23 a 137 µg/kg para a somatória das aflatoxinas B₁+B₂+G₁+G₂.

Para atender as crescentes exigências da legislação que vem restringindo os limites máximos permitidos a níveis cada vez mais rigorosos, é importante a utilização de métodos sensíveis e precisos nas análises de micotoxinas. O método utilizando derivatização pós-coluna por CLAE atende às necessidades da legislação nacional e internacional, bem como fornece subsídios para estudos da ingestão diária, entre outros.

Tabela 1. Aflatoxinas em amendoim e derivados de amendoim referente aos anos de 2000, 2002 e 2009 no Estado de São Paulo

Ano	nº de amostras	Distribuição das amostras por intervalo de concentração					faixa de concentrações µg/kg
		<LQ*/LD**	LQ*/LD** - 4 µg/kg	4,1- 20 µg/kg	21-30 µg/kg	>30 µg/kg	
2000	56	26*	0	2	3	25	18-1947
2002	73	57*	0	6	3	7	4,4-648
2009	171	107**	55	6	1	2	0,03-71

*LQ - Aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ = 3 µg/kg (Método por Cromatografia em Camada Delgada - CCD)

**LD - Aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ = 0,03 µg/kg (Método por CLAE/derivatização pós-coluna -Kobracell)

Estima-se que cerca de 35% dos casos de câncer humano estejam relacionados diretamente à dieta, e a presença de aflatoxinas nos alimentos é considerada um fator importante na produção de câncer hepático, principalmente nos países tropicais¹⁵.

CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo indicam um decréscimo dos níveis elevados de contaminação das amostras com aflatoxinas, evidenciando uma redução da contaminação com relação às amostras de amendoim e derivados consumidos no Estado de São Paulo. Entretanto, nota-se que ainda é necessário juntar esforços dos produtores e órgãos governamentais para oferecerem produtos seguros à população. Neste sentido, os programas de monitoramento, com o compromisso de manter os alimentos dentro dos limites legais, representam uma importante ferramenta para fornecer subsídios e informações a órgãos do governo e setores envolvidos para a implementações de ações corretivas, a fim de diminuir o risco da exposição humana as aflatoxinas. A continuidade desses programas é uma importante estratégia de prevenção, pois as aflatoxinas são recorrentes e sua presença nos alimentos, muitas vezes, é difícil de ser evitada.

REFERÊNCIAS

1. Micotoxinas no Brasil e no mundo. [acesso em 16 de junho de 2010]. Disponível em: [http://www.mycotoxins.com.br/].
2. IARC - International Agency for Research on Cancer. Aflatoxins. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 1993; 56:245-395.
3. Amaral LBS. Torta de amendoim e morte de suínos. *Biológico*. 1961; 27:63.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 34 de 1976 da CNNPA (Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos). Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolve fixar para os alimentos, tolerância de 30 ppb (trinta partes por bilhão) para as Aflatoxinas, calculada pela soma dos conteúdos das aflatoxinas B₁ e G₁. Diário Oficial [da] União, Brasília, DF. 19 de janeiro de 1977. Sec. I.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 274 de 15 de outubro de 2002. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Aprova o Regulamento Técnico sobre limites máximos de aflatoxinas no leite, amendoim e milho. Diário Oficial [da] União, Brasília, DF. 16 de outubro de 2002. Sec I.
6. MERCOSUL/GMC (Mercado Comum do Cone Sul/Grupo Mercado Comum). Resolução nº 25 de 2002. Regulamento Técnico Mercosul sobre limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, amendoim e milho. [acesso em 16 de junho de 2010]. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/mercosul/alimentos/25_02.pdf].
7. COMMISSION REGULATION (EU) nº 165/2010 amending Regulation (EC) nº 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins. Official Journal of the European Union, L 50/8, 27 of february 2010.
8. Fonseca H. Micotoxinas on-line. Prevenção e controle de micotoxinas em produtos agrícolas. Práticas usuais e novas dos produtores de amendoim. [acesso em 16 de junho de 2010]. Disponível em: [http://www.micotoxinas.com.br/Boletim7.htm].
9. Pró-amendoim. Selo de qualidade. Garantia de produto seguro. [acesso em 16 de junho de 2010]. Disponível em: [http://www.pro-amendoim.com.br/selo.php].
10. Unisite-Economia. Produtores de amendoim debatem necessidades da cadeia produtiva. [acesso em 16 de junho de 2010]. Disponível em: [http://www.unisite.com.br/Economia/25773/Produtores-de-amendoim-debatem-necessidade-da-cadeia-produtiva.xhtml].
11. Caldas ED, Silva SC, Oliveira JN. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. *Rev Saúde Pública*. 2002; 36(3):319-23.
12. Batatinha MJM, Santos MM, Botura MB, Almeida GN, Domingues LF, Kowalski CH et al. Ocorrência de Aflatoxinas em amendoim e seus produtos comercializados no Estado da Bahia durante o ano de 2002. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2003; 62(3):183-7.
13. Rocha MD, Maia PP, Rodrigues MAC, Martins I. Incidência de aflatoxinas em amostras de amendoim e paçoca comercializadas na cidade de Alfenas-MG, Brasil. *Rev Bras Toxicol*. 2008; 21(1):15-9.
14. Soares LV, Rodrigues-Amaya DB. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in some Brazilian foods using a multi-toxin thin layer chromatographic method. *J Assoc Off Anal Chem*. 1989; 72(1):22-6.
15. Doll R, Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst*. 1981; 66:1191-308.

Avaliação microbiológica da alimentação servida aos passageiros de um navio de cruzeiro na temporada 2009/2010. Detecção de *Bacillus cereus* em refeição à base de peixe

Microbiology evaluation of the meal served to passengers in a ship cruiser in the 2009/2010 season. Detection of *Bacillus cereus* in the fish-based meal

RIALA6/1331

Estevão de Camargo PASSOS*, Ana Ruth Pereira de MELLO, Cícero Vagner de SOUSA, Ana Carolina Buchalla ALONSO, Eduardo GONZALEZ, Mário TAVARES

*Endereço para correspondência: Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas, Centro de Laboratório Regional de Santos, Instituto Adolfo Lutz. Rua Silva Jardim, 90, Vila Nova, Santos/SP, Brasil. CEP 11015-020. Fone (13) 3232-5112. E-mail: estevaopqc@yahoo.com.br

Recebido: 05.03.2010 – Aceito para publicação: 01.12.2010

RESUMO

Em janeiro de 2010, foi realizada uma vistoria sanitária pelos técnicos da ANVISA, em um navio durante a escala no porto de Santos/SP, pela ocorrência de distúrbios gastrointestinais nos passageiros e tripulantes, após a escala em Búzios, RJ. Foram coletadas amostras dos alimentos preparados: ensopados de peixe, de carne, de frango e de porco; salada de batatas com maionese, saladas grega e mista com macarrão; molho de maionese com ketchup e amostras de água potável de cinco pontos. As amostras foram analisadas segundo as metodologias descritas no “Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods”, da American Public Health Association (2001) e “Standard Methods” (2005). Foi isolado *Bacillus cereus* no ensopado de peixe e coliformes a 35°C no reservatório de água potável do navio. Coliformes totais e termotolerantes, *Staphylococcus aureus* coagulase positiva, clostrídios sulfito redutores, *Bacillus cereus* e *Salmonella* spp não foram isolados dos demais alimentos, tampouco *Escherichia coli* das amostras de água. A ocorrência de *Bacillus cereus* no ensopado de peixe com valores acima do limite de tolerância estabelecido pela Resolução RDC nº 12/2001, da ANVISA/MS, pode ser a causa de surtos de toxinfecção alimentar nos passageiros e tripulantes de navios de cruzeiros.

Palavras chaves. alimentos, peixe, *Bacillus cereus*, água potável, coliformes, navio de cruzeiro.

ABSTRACT

In January of 2010, ANVISA technicians carried out a sanitary inspection in a ship during the stopover at the port of Santos/SP due to an occurrence of gastroenteritis in the passengers and crew members after a stopover in the region of Buzios in Rio de Janeiro/RJ. They collected samples of the prepared foods: fish soup, mixed salad of pasta, meat soup, chicken soup, pork soup, potatoes salad with mayonnaise, mayonnaise and ketchup dressing and Greek salad, and samples of drink water from five sites. Conventional methodologies were used for analyzing the samples, according to Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods (American Public Health Association, 2001) and by Standard Methods (2005) recommendations. The results were analyzed following the Brazilian Ministry of Health legislation ANVISA RDC 12/2001 and Decree 518/2004. *Bacillus cereus* was isolated from fish soup meal and coliforms from drink water reservoir tank. The occurrence of these bacteria could be responsible for causing the food borne diseases in the passengers and crew members of the cruise ship.

Key words. food, fish, *Bacillus cereus*, drink water, coliforms, cruise ship.

INTRODUÇÃO

Os navios de cruzeiros têm sido objeto de diversos estudos na ocorrência de surtos de doenças transmitidas por alimentos, como os descritos por Said et al¹ em 2009, que descreveram a associação de queijo não pasteurizado, patê e mariscos na transmissão de hepatite E; Rooney et al², em 2004, revisaram os surtos ocorridos associados aos passageiros de cruzeiros, entre 1970 e 2003, identificaram a *Salmonella* spp como o agente patogênico mais frequente, seguida pela *E. coli*, *Shigella* spp, norovírus, *Vibrio* spp, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, os quais afetaram aproximadamente 10.000 pessoas; por Passos et al³, em 2008, que detectaram a presença de coliformes termotolerantes na salada de macarrão, e Verhoef et al⁴, em 2008, que associaram framboesas e água da torneira ao surto de norovírus.

Os alimentos preparados e processados nas cozinhas de estabelecimentos correm o risco de sofrerem contaminação a partir do ar do ambiente, das superfícies de bancadas e dos equipamentos utilizados; além disso, os manipuladores de alimentos, também, poderiam ser responsabilizados pela disseminação das bactérias patogênicas, como os trabalhos descritos por Soares et al⁵ em dois restaurantes institucionais que verificaram a presença de *B. cereus*, potencialmente produtores de enterotoxinas, e Rodrigues et al⁶ que observaram a ocorrência de intoxicação estafilocócica em restaurante institucional.

Segundo Zandonadi et al⁷, a prevenção da contaminação dos alimentos nos restaurantes “self-service” não é tarefa exclusiva dos manipuladores de alimentos, os consumidores também desempenham papel importante na cadeia analisada. Os consumidores devem ser conscientizados em suas atitudes de risco, uma vez que estes mantêm contato direto com os alimentos expostos no balcão de distribuição.

De acordo com Zandonadi et al⁷, nos surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) a contaminação dos alimentos pode-se iniciar na produção da matéria-prima e se estende às etapas de transporte, recepção, armazenamento, e, durante a manipulação, pode haver contaminação por condições precárias de higiene de manipuladores, equipamentos, utensílios, ambiente e condições inadequadas de armazenamento dos produtos prontos para consumo. Ademais, observa-se também a falta de informação

desses profissionais quanto às normas de segurança alimentar na produção de refeições.

Em relação aos portos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA⁸ exerce o controle para tratar de assuntos internacionais na área de vigilância sanitária. Saliente-se que o fluxo de navios mercantes durante o ano todo é intenso, com chegadas e saídas diárias, e no tocante aos navios de cruzeiros, o fluxo é sazonal, iniciando-se nos meses de outubro e novembro, prolongando-se até abril, coincidindo com o inverno no hemisfério norte. Na temporada 2009/2010 estava prevista a atracação de 15 navios, com um total de 257 escalas, no porto de Santos, onde foram recebidos 820 mil passageiros, entre embarque, desembarque e trânsito no Terminal Marítimo de Passageiros Giusfredo Santini – CONCAIS⁹ naquela temporada.

No dia 8 de janeiro de 2010, durante a temporada de 2009/2010 dos navios de cruzeiros no Brasil, técnicos da ANVISA do Posto Portuário de Santos/SP realizaram uma vistoria sanitária em um navio durante a escala no porto da mesma cidade, após a denúncia de alguns passageiros e tripulantes que relataram a ocorrência de distúrbios gastro-intestinais, como: vômitos, dores abdominais, cefaleia, diarreia, febre, náuseas, semelhantes à sintomatologia dos casos de doenças transmitidas por alimentos, durante a escala na região de Búzios no Rio de Janeiro.

O objetivo do presente trabalho foi realizar uma avaliação microbiológica de alimentos e água do navio de cruzeiro, envolvido em um provável surto de toxinfecção alimentar nos passageiros e tripulantes, ocorrido durante a viagem em janeiro de 2010.

MATERIAL E MÉTODOS

Na vistoria sanitária pelos técnicos da ANVISA do Posto Portuário de Santos/SP foram colhidas amostras dos alimentos preparados: ensopados de peixe, de carne, de frango e de porco; saladas de batatas com maionese, grega, e mista com macarrão; molho de maionese com ketchup, além de amostras de água potável de cinco pontos: tanque reservatório, bebedouro do *buffet* dos passageiros nº 2, água de lavagem de verduras e frutas, ponto de oferta de lavagem de mãos da cozinha dos tripulantes e bebedouro dos tripulantes.

As amostras de alimentos e água foram transportadas à temperatura de refrigeração, em isopor contendo gelo reciclável, para o setor de

Microbiologia Alimentar, do Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas, do Centro de Laboratório Regional de Santos, do Instituto Adolfo Lutz, onde foram registradas, identificadas, e mantidas à temperatura de refrigeração até a sementeira e inoculação nos meios de cultura apropriados.

Os alimentos e a água foram processados segundo a metodologia da American Public Health Association¹⁰ e “Standard Methods”¹¹; os resultados foram comparados segundo aos padrões microbiológicos estabelecidos pela Resolução RDC nº 12/2001¹² e Portaria nº 518/2004¹³, do Ministério da Saúde.

Foram pesquisados os bioindicadores de contaminação ambiental e fecal, coliformes a 35°C e coliformes termotolerantes, por meio da técnica do número mais provável (N.M.P.) para os alimentos; para a detecção de coliformes a 35°C e *Escherichia coli* nas amostras de água, foi empregada a técnica do substrato definido/presença ou ausência. Nos alimentos também foram pesquisados *Staphylococcus aureus* coagulase positiva, clostrídios sulfito redutores e *Bacillus cereus*, através da diluição de 25 g de amostra em 225 mL de diluente, seguido de plaqueamento de 0,1 ou 1 mL; portanto, os resultados foram referidos a 1g de amostra e expressos em UFC/g (Unidade Formadora de Colônia/grama); e a *Salmonella* spp através do método de presença ou ausência em 25 gramas da amostra.

RESULTADOS

Os resultados das análises microbiológicas das amostras de alimentos e águas encontram-se descritos nas tabelas 1 e 2.

Foram pesquisados nos alimentos coliformes a 35°C e coliformes termotolerantes, *Staphylococcus aureus* coagulase positiva, clostrídios sulfito redutores, *Bacillus cereus* e *Salmonella* spp. Observa-se que no peixe ensopado foi detectada somente a presença de *Bacillus cereus*, com valor superior ao valor de tolerância aceito para amostra indicativa segundo a Resolução RDC 12/2001, da ANVISA/MS. As colônias isoladas apresentaram crescimento característico, coloração de Gram positivo bacilo esporulado, provas positivas para gelatinase, motilidade, hemólise e manitol. A cepa foi encaminhada ao Núcleo de Doenças Entéricas e Infecções por Patógenos Especiais, do Instituto Adolfo Lutz, que confirmou o diagnóstico bacteriológico. Nos outros alimentos, salada mista de macarrão, carne ensopada, frango ensopado, carne de porco ensopado, salada de batatas com maionese, molho de maionese com ketchup e salada grega não foram detectadas a presença desses agentes.

Em relação às amostras de água pesquisou-se a presença de coliformes a 35°C e *Escherichia coli* sendo detectado somente coliformes a 35°C no tanque do reservatório de água potável, contrariando os padrões microbiológicos da Portaria nº 518/2004.

Tabela 1. Resultados das análises de alimentos obtidas pela técnica do número mais provável, unidade formadora de colônia, presença/ausência em 25 gramas da amostra, coletados no navio durante a escala no porto de Santos/SP, em 2010

Amostra de alimentos	Coliformes termotolerantes (NMP/g) ^a	<i>Staphylococcus coagulase positiva</i> (UFC/g) ^b	<i>Bacillus cereus</i> (UFC/g)	Clostrídios sulfito-redutores (UFC/g)	<i>Salmonella</i> spp/25g (ausência/presença) ^c
Peixe ensopado com tomates	<3 ^d (20) ^e	<10 ² (10 ³)	>10 ³ (10 ³)	<10 ² (10 ³)	ausência (ausência)
Salada mista com macarrão	4,3 (50)	<10 ² (10 ³)	<10 ² (10 ³)	NR ^f	ausência (ausência)
Carne ensopada	<3 (20)	<10 ² (10 ³)	<10 ² (10 ³)	<10 (10 ³)	ausência (ausência)
Frango ensopado	<3 (20)	<10 ² (10 ³)	<10 ² (10 ³)	<10 (10 ³)	ausência (ausência)
Carne de porco ensopado	<3 (20)	<10 ² (10 ³)	<10 ² (10 ³)	<10 (10 ³)	ausência (ausência)
Salada de batata com maionese	<3 (10 ²)	<10 ² (10 ³)	NR	NR	ausência (ausência)
Molho de maionese com ketchup	<3 (10)	NR	NR	NR	ausência (ausência)
Salada grega	43 (50)	<10 ² (10 ³)	<10 ² (10 ³)	NR	ausência (ausência)

^aNMP: Número mais Provável/g., ^bUFC: Unidade formadora de colônias/g., ^cMetodologia para pesquisa de *Salmonella* em 25g da amostra: ausência/presença., ^dResultados obtidos., ^eValores de tolerância para amostra indicativa segundo a Resolução RDC 12/2001 da ANVISA/MS., ^fNR: não realizado por não ser exigido na Resolução RDC 12/2001 da ANVISA/MS.

Tabela 2. Resultados das análises das amostras de água obtidas pela técnica do substrato definido/presença ou ausência em 100 mL, coletadas no navio durante a escala no porto de Santos/SP, em 2010

Origem	Coliformes totais/100mL	<i>Escherichia coli</i> /100mL
Água casa das máquinas – tanque reservatório	Presença	Ausência
Bebedouro do <i>buffet</i> dos passageiros nº 2	Ausência	Ausência
Água de lavagem verduras e frutas	Ausência	Ausência
Ponto de oferta de lavagem de mãos da cozinha dos tripulantes	Ausência	Ausência
Bebedouro dos tripulantes	Ausência	Ausência

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Os passageiros e tripulantes de navios de cruzeiros estão suscetíveis a adquirirem surtos de intoxicações alimentares provocados por agentes virais e bacterianos, o que tem sido objeto de estudos descritos por Cramer et al¹⁴ e Cramer et al¹⁵.

Em terra firme, a ocorrência e a identificação dos agentes envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) têm sido observadas com certa frequência como os relatados por Soares et al⁵ e Rodrigues et al⁶.

Segundo Zandonadi et al⁷, durante a manipulação dos alimentos pode haver contaminação por condições precárias de higiene de manipuladores, equipamentos, utensílios, ambiente e condições inadequadas de armazenamento dos produtos prontos para consumo, ressalta-se ainda que a contaminação dos alimentos pode-se iniciar na produção da matéria-prima e se estende às etapas de transporte, recepção, armazenamento e produção de refeições.

No presente trabalho, a presença de *Bacillus cereus* no ensopado de peixe e coliformes a 35°C na água potável do reservatório do navio, poderia servir como fonte disseminadora das doenças transmitidas por alimentos para os tripulantes, bem como para os passageiros do cruzeiro. Ressalta-se que os alimentos foram elaborados no dia da vistoria sanitária e, provavelmente, os alimentos devem ter sido consumidos no dia de embarque dos novos passageiros. Não houve posteriormente comunicação de novos surtos referente àquela embarcação.

Destaca-se que a pesquisa dos agentes envolvidos nas doenças transmitidas por alimentos deve ser realizada para pesquisa da presença de células viáveis, como na detecção da toxina elaborada pelos mesmos, como é o caso

do *Bacillus cereus* e *Staphylococcus coagulase positiva*, cujos sintomas apresentados pelas pessoas acometidas por toxinfecção alimentar são semelhantes.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária exerce o controle na fiscalização e na qualidade sanitária a ser realizada nas embarcações de navios de passageiros e navios mercantes. O Regulamento Sanitário Internacional deverá abranger determinados procedimentos com a participação efetiva dos Laboratórios de Saúde Pública e apoio das Vigilâncias Epidemiológicas e Sanitárias dos municípios das regiões dos portos, aeroportos e fronteiras, das Secretarias Estaduais da Saúde, entre outros órgãos.

O Laboratório de Saúde Pública tem um papel fundamental na execução das metodologias empregadas na análise dos alimentos e água, complementando as ações de fiscalização da ANVISA por meio dos exames laboratoriais, e, no futuro, essas ações devem ser efetuadas rotineiramente em todos os portos brasileiros.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos técnicos da ANVISA do Posto Portuário de Santos/SP pelo apoio logístico na colheita das amostras e ao Núcleo de Doenças Entéricas e Infecções por Patógenos Especiais do Instituto Adolfo Lutz na identificação da cepa isolada.

REFERÊNCIAS

1. Said B, Ijaz S, Kafatos G, Booth L, Thomas HL, Walsh A et al. Hepatitis E Outbreak on Cruise Ship. *Emerg Infect Dis*. 2009; 15(11):1738-44.

2. Rooney RM, Cramer EH, Mantha S, Nichols G, Bartram JK, Farber JM et al. A Review of Outbreaks of Foodborne Disease Associated with Passenger Ships: Evidence for Risk Management. *Public Health Rep*. 2004;119:427-34.
3. Passos EC, Mello ARP, Sousa CV, Silva CR, Paschoal RC, Tavares M. Avaliação microbiológica da alimentação servida aos tripulantes de um navio de cruzeiro ancorado no porto de Santos, São Paulo, em dezembro de 2007. *Bol Inst Adolfo Lutz*. 2008;18:47-8.
4. Verhoef L, Depoortere E, Boxman I, Duizer E, van Duynhoven Y, John Harris J et al. Emergence of New Norovirus Variants on Spring Cruise Ships and Prediction of Winter Epidemics. *Emerg Infect Dis*. 2008; 14(2):238-43.
5. Soares CM, Valadares GF, Azeredo RMC, Kuaye AY. Contaminação ambiental e perfil toxigênico de *Bacillus cereus* isolados em serviços de alimentação. *Ciêñ Rural, Santa Maria*. 2008;38(2):504-10.
6. Rodrigues KL, Moreira AN, Almeida ATS, Chiochetta D, Rodrigues MJ, Brod CS et al. Intoxicação estafilocócica em restaurante institucional. *Ciêñ Rural, Santa Maria*. 2004;34(1):297-9.
7. Zandonadi RP, Botelho RBA, Sávio KEO, Akutsu RC, Araújo WMC. Atitudes de risco do consumidor em restaurantes de auto-serviço. *Rev Nutr*. 2007;20(1):19-26.
8. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Institucional. Sobre a Anvisa. Apresentação. Brasília, 2008. [acesso 2008 Mar 17]. Disponível em [<http://www.anvisa.gov.br/institucional/anvisa/apresentacao.htm>].
9. Floriano, C. Estatísticas - Terminal Marítimo de Passageiros Giusfredo Santini Concais S.A. Relatório da temporada 2009-2010. Santos, 2010. [acesso 2010 Fev 17]. Disponível em [<http://www.concais.com.br/numeros.php>].
10. Downes FP, Ito K, editors. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4 ed. Washington: Edwards Brothers; 2001.
11. Eaton AE, Clesceri LS, Rice EU, Greenberg AE. *Standard Methods for the examination of water and wastewater*. 21 ed. Baltimore: United Book Press; 2005.
12. 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.
13. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 518, de 25 de março de 2004. Aprova a Norma de Qualidade da Água para Consumo Humano. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, DF, 26 mar 2004. Seção 1, nº 59, p. 266-70.
14. Cramer EH, Blanton CJ, Blanton LH, Vaughan GH Jr, Bopp CA, Forney DL. Epidemiology of gastroenteritis on cruise ships, 2001-2004. *Am J Prev Med*. 2006;30(3):252-7.
15. Cramer EH, Gu DX, Durbin RE. Diarrheal Disease on Cruise Ships, 1990-2000 The Impact of Environmental Health Programs. *Am J Prev Med*. 2003;24(3):227-33.

Ocorrência de fungos filamentosos de importância médica em água de bebedouros

Filamentous fungi of medical importance in drinking water

RIALA6/1332

André Ferraz Goiana LEAL*, Danielle Patrícia Cerqueira MACÊDO, Cristina Maria de Souza-MOTTA, Maria José dos Santos FERNANDES, Oliane Maria Correia MAGALHÃES, Rejane Pereira NEVES

Endereço para correspondência: *Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Moraes Rêgo, 1235, CEP 50670-901, Recife/PE, Brasil. E-mail: andreferrazleal@yahoo.com.br

Recebido: 03.03.2010 – Aceito para publicação: 02.12.2010

RESUMO

No presente trabalho foi investigada a ocorrência de fungos de importância médica na água, torneira e pia dos bebedouros do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil. De cada bebedouro foram coletados 100 mL de água, e das superfícies da torneira e pia as amostras foram obtidas com swab. As amostras foram semeadas em meio ágar *Sabouraud* adicionado de 50mg/L de cloranfenicol, em placas de Petri. Das amostras de água, 10 culturas de fungos filamentosos foram isoladas e estas foram identificadas como *Aspergillus flavus* (5), *A. niger* (3) e *Cladosporium cladosporioides* (2). Das torneiras foram obtidos 21 isolados de fungos filamentosos e 164 das amostras das pias. O número de unidades formadoras de colônias (UFCs) (48h) variou de 12 a 56 em amostras de água, de 115 a 228 em amostras coletadas das torneiras e de 204 a 690 das pias. A presença de fungos com capacidade de produzir micotoxinas foi detectada nas amostras de água, bem como das torneiras. Com a finalidade de preservar a saúde dos consumidores, o monitoramento e a manutenção de equipamentos de purificação da água são práticas essenciais para garantir a qualidade microbiana e química da água.

Palavras-chave. fungos filamentosos, água, bebedouros, qualidade micológica da água, micotoxinas.

ABSTRACT

This study aimed to assess the occurrence of fungi in water sample, tap and sink from drinking fountains at the university center, Recife-PE, Brazil. From each fountain, 100mL of water were collected, and the samples from the tap and sink surfaces were obtained by using swabs. The samples were cultivated on Sabouraud agar medium containing 50mg/L of chloramphenicol in Petri dishes. Of water samples, 10 isolates of filamentous fungi were found and identified as *Aspergillus flavus* (5), *A. niger* (3) and *Cladosporium cladosporioides* (2). Twenty-one strains of filamentous fungi were isolated from tap samples and 164 from sink samples. The number of colony forming units (CFU) (48h) ranged from 12 to 56 in water samples, from 115 to 228 in samples collected from taps, and 204 to 690 in sink samples. Fungi capable of producing mycotoxins were detected in both water and taps samples. Monitoring the microbial and chemical quality of water and the maintenance of water purification equipment are crucial to guarantee the consumers safety.

Key-words. filamentous fungi, water, drinking fountain, microbial water quality, mycotoxins.

INTRODUÇÃO

A ocorrência de fungos filamentosos em água tratada tem sido relatada por vários pesquisadores em todo mundo. A frequência de isolamento desses micro-organismos apresenta-se bastante variável sendo detectados entre 7,5% a 89% das amostras de água analisadas¹.

Existem poucas orientações quanto ao que é considerado como níveis aceitáveis de fungos na água tratada. De acordo com os regulamentos de controle de qualidade da água da Suécia, a água é considerada imprópria para o consumo humano quando há formação, em meio de cultura, de 100 unidades formadoras de colônia (UFC) por 100 mL². No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), não inclui a análise micológica da água como um parâmetro de qualidade³.

Este trabalho teve como objetivo verificar a ocorrência de fungos na água, torneira e pia dos bebedouros do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

O isolamento de fungos foi baseado no método de Göttlich et al⁴ modificado. De cada bebedouro foram coletados 100 mL de água em frascos de vidro com tampa esmerilhada, previamente esterilizada. Na superfície da torneira e pia foram utilizados *swabs* esterilizados umedecidos com 2 mL de água destilada esterilizada adicionada de cloranfenicol (50mg/L) e contido em tubos de ensaio. Após a coleta, as amostras, foram transportadas em caixas isotérmicas (isopor) contendo cubos de gelo para o Departamento de Micologia da UFPE.

Dos 100 mL de água, alíquotas de 2 mL foram semeadas em meio ágar Sabouraud adicionado de 50mg/L de cloranfenicol, contido em placas de Petri, totalizando 50 preparações para cada bebedouro. Para o isolamento dos fungos da torneira e pia, os *swabs* foram semeados em quadruplicata na superfície do meio ágar Sabouraud (Difco), adicionado de 50mg/L de cloranfenicol, contido em placas de Petri. As preparações, incubadas a 25°C, foram acompanhadas diariamente por até quatro semanas. Após o surgimento das colônias fúngicas (48h), estas foram quantificadas (UFC), purificadas e identificadas através das características macroscópicas e microscópicas, utilizando-se os meios ágar Sabouraud (Difco), ágar Czapeck (Difco) e Batata Dextrose Ágar (Difco)⁵. O experimento foi realizado em três repetições com a coleta de um novo material para a análise.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidas 195 culturas de fungos filamentosos pertencentes às espécies *Aspergillus aculeatus* (1), *Aspergillus flavus* (23), *Aspergillus japonicus* (12), *Aspergillus niger* (36), *Aspergillus tamaraii* (8), *Cladosporium cladosporioides* (6), *Cladosporium sphaerospermum* (12), *Cunninghamella elegans* (3), *Curvularia pallescens* (13), *Mucor racemosus* (5), *Paecilomyces variotii* (4), *Penicillium aurantiogriseum* (32), *Penicillium brevicompactum* (9), *Penicillium corylophilum* (19), *Penicillium solitum* (5), *Pithomyces graminicola* (2) e *Trichoderma pseudokoningii* (5). A Tabela 1 apresenta o número de amostras fúngicas isoladas dos diferentes substratos.

Das amostras de água foram isolados 10 fungos identificados como *Aspergillus flavus* (5), *Aspergillus niger* (3) e *Cladosporium sphaerospermum* (2). Das torneiras, 21 amostras identificadas como *Aspergillus flavus* (2), *Aspergillus japonicus* (1), *Aspergillus niger* (5), *Cladosporium sphaerospermum* (3), *Curvularia pallescens* (1), *Penicillium aurantiogriseum* (3), *Penicillium brevicompactum* (1), *Penicillium corylophilum* (2), *Penicillium solitum* (2) e *Pithomyces graminicola* (1) foram isoladas. Das pias foram isoladas 164 amostras de fungos incluindo *Aspergillus aculeatus* (1), *Aspergillus flavus* (16), *Aspergillus japonicus* (11), *Aspergillus niger* (28), *Aspergillus tamaraii* (8), *Cladosporium cladosporioides* (4), *Cladosporium sphaerospermum* (9), *Cunninghamella elegans* (3), *Curvularia pallescens* (12), *Mucor racemosus* (5), *Paecilomyces variotii* (4), *Penicillium aurantiogriseum* (29), *Penicillium brevicompactum* (8), *Penicillium corylophilum* (17), *Penicillium solitum* (3), *Pithomyces graminicola* (1) e *Trichoderma pseudokoningii* (5). O número de unidades formadoras de colônias (UFCs) variou de 12 a 56 das amostras de água, de 115 a 228 das amostras coletadas das torneiras e de 204 a 690 das pias.

O monitoramento e a manutenção de equipamentos de purificação da água são de extrema importância para a qualidade microbiana e química da água⁶. Os bebedouros avaliados neste trabalho utilizam basicamente três processos de filtração da água. Na primeira etapa, uma tela com microporos impede a passagem de várias substâncias físicas como limbo, lodo e barro. Na segunda etapa, o carvão ativado impregnado com prata impede a proliferação de micro-organismos e elimina da água o sabor e odor do cloro. Na terceira etapa a água, já limpa, passa por mais uma tela de microesferas que retém, além do próprio carvão, eventuais partículas que tenham passado pela primeira etapa, de acordo com informações fornecidas pela empresa fabricante dos equipamentos.

Tabela 1. Espécies fúngicas isoladas dos bebedouros do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

Espécies isoladas	Número de isolados	Substratos		
		água	torneira	pia
<i>Aspergillus aculeatus</i>	1	-	-	1
<i>Aspergillus flavus</i>	23	5	2	16
<i>Aspergillus japonicus</i>	12	-	1	11
<i>Aspergillus niger</i>	36	3	5	28
<i>Aspergillus tamaritii</i>	8	-	-	8
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	6	2	-	4
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	12	-	3	9
<i>Cunninghamella elegans</i>	3	-	-	3
<i>Curvularia pallescens</i>	13	-	1	12
<i>Mucor racemosus</i>	5	-	-	5
<i>Paecilomyces variotii</i>	4	-	-	4
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	32	-	3	29
<i>Penicillium brevicompactum</i>	9	-	1	8
<i>Penicillium corylophilum</i>	19	-	2	17
<i>Penicillium solitum</i>	5	-	2	3
<i>Pithomyces graminicola</i>	2	-	1	1
<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	5	-	-	5
Total	195	10	21	164

Não houve isolamento (-)

Existem poucos estudos epidemiológicos relacionados à ocorrência de fungos potencialmente patogênicos em água tratada⁷. Anaissie et al⁸ demonstraram que o reservatório de água de um hospital, localizado em Houston nos Estados Unidos, era uma fonte de infecção por espécies de *Fusarium*. Através de técnicas moleculares, constataram que os isolados fúngicos obtidos de pacientes com fusariose tinham as mesmas características genotípicas que os isolados dos reservatórios de água.

Pesquisadores de várias partes do mundo têm demonstrado interesse acerca da qualidade micológica da água de ambientes hospitalares, especialmente em decorrência de infecções fúngicas oportunistas em pacientes imunocomprometidos. Esses estudiosos sugerem que

suprimentos de água de hospitais devem ser monitorados também quanto ao aspecto micológico, adotando-se medidas profiláticas eficazes, minimizando assim a exposição de pacientes imunodeficientes a fontes de água contaminada^{8,9,10}.

No Brasil, dois trabalhos avaliaram a qualidade micológica do sistema hídrico das unidades de Hemodiálise do Estado de São Paulo. Varo et al¹⁰ conseguiram isolar vários fungos filamentosos, dentre estes *Trichoderma* spp, *Cladosporium* spp, *Aspergillus* spp e *Fusarium* spp. Pires-Gonçalves et al⁹ isolaram fungos filamentosos, destacando-se as espécies de *Fusarium*, e as leveduras *Candida parapsilosis* e *Rhodotorula rubra*. Estes estudos demonstraram que várias espécies de fungos podem estar presentes na água utilizada nos centros de hemodiálise.

Outro problema que a água contaminada por fungos pode apresentar é a presença de micotoxinas. Algumas espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* são conhecidas por produzirem toxinas fúngicas em substratos como alimentos e bebidas¹¹. Paterson et al¹² detectaram aflatoxina produzida por *Aspergillus flavus* em amostras de água coletadas de uma cisterna. A exposição a altas concentrações desta toxina produz graves danos ao fígado, tais como necrose, cirrose hepática, carcinoma ou edema. Em nosso estudo, foram detectadas, na água, duas espécies conhecidas por produzirem micotoxinas como *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger*.

A ocorrência de fungos filamentosos e leveduras em água mineral engarrafada já é descrita. Ribeiro et al⁶, após avaliarem uma fábrica de engarrafamento de água mineral, concluíram que medidas de controle para evitar contaminação fúngica deveriam ser tomadas, como por exemplo: a mudança regular dos filtros, principalmente nos períodos mais quentes do ano, durante os quais os fungos se desenvolvem e esporulam mais rapidamente.

Ainda não existe um consenso quanto aos níveis aceitáveis de propágulos fúngicos na água potável. Outro ponto é a importância do isolamento de fungos com capacidade de produzir micotoxinas. Sabe-se que esses microorganismos são capazes de produzir biofilmes (agregados microbianos) em diferentes tipos de substratos, além de variados tipos de compostos tóxicos para o homem¹¹.

Nesse estudo foram detectadas, tanto nas amostras de água como nas das torneiras, a presença de fungos com capacidade de produzir micotoxinas. Desta maneira, a higienização das torneiras é de grande importância e deve ser feita regularmente para evitar a formação de biofilmes nos bebedouros. Estas medidas devem ser adotadas de maneira ampla, visto que este problema provavelmente ocorre em locais com condições similares.

Estes dados representam um alerta para que as autoridades competentes conheçam a qualidade microbiológica, mais especificamente micológica, da água consumida pelos alunos e profissionais que frequentam este centro, e avaliando esse problema em outros locais, ampliando as pesquisas acerca da relevância de fungos e micotoxinas em água potável.

REFERÊNCIAS

1. Hageskal G, Lima N, Skaar I. The study of fungi in drinking water. *Mycol Res*. 2008; 30:1-8.
2. Hageskal G, Gaustad P, Heier BT, Skaar I. Occurrence of molds in drinking water. *J Appl Microbiol*. 2006; 774-8.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 275, de 22 Set. 2005. Regulamento técnico de características microbiológicas para água mineral natural e água natural. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília. 23 set 2005.
4. Göttlich E, Van der Lubbe W, Lange B, Fiedler S, Melchert I, Reifenrath M et al. Fungal flora in groundwater-derived public drinking water. *Int J Hyg Environm Health*. 2002; 205: 269-79.
5. Hoog GS, Guarro J, Gene J, Figueiras MJ. Atlas of clinical fungi. Centraalbureau Voor Schimmelcultures/Universitat Rovira i Vigili, 2000.
6. Ribeiro A, Machado AP, Kozakiewicz Z, Ryan M, Luke B, Buddie AG et al. Fungi in bottled water: a case study of production plant. *Rev Iberoam Micol*. 2006; 23: 139-44.
7. Gonçalves AB, Russell RM, Paterson NL. Survey and significance of filamentous fungi from tap water. *Int J Hyg Environm Health*. 2006; 209: 257-64.
8. Anaissie EJ, Kuchar RT, Rex JH, Francescone A, Kasai M, Müller FMC et al. Fusariosis associated with pathogenic *Fusarium* species colonization of a hospital water system: A new paradigm for the epidemiology of opportunistic mold infections. *Clin Infect Dis*. 2001; 33:1871-8.
9. Pires-Gonçalves RH, Sartori FG, Montanari LB, Zaia JE, Melhem MSC, Mendes-Giannini MJS et al. Occurrence of fungi in water used at a haemodialysis center. *Lett Appl Microbiol*. 2008; 46:542-7.
10. Varo SD, Martins CHG, Cardoso MJO, Sartori FG, Montanari LB, Gonçalves RHP. Isolamento de fungos filamentosos em água utilizada em uma unidade de hemodiálise. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007; 40 (3):326-31.
11. Carvalho S, Stuart RM, Pimentel IC, Dalzoto PR, Gabardo J, Zawadneak MAC. Contaminação fúngica em chás de camomila, erva-doce e erva-mate. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2009; 68(1): 91-5.
12. Paterson RRM, Kelly J, Gallagher M. Natural occurrence of aflatoxins and *Aspergillus flavus* (Link) in water. *Lett Appl Microbiol*. 1997; 25: 435-6.

Aplicação da análise microscópica na investigação de espinhos de *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (Figo da Índia) presentes em alimento

Microscopic analysis of glochidia of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (Indian Fig Opuntia) occurring in food

RIALA6/1333

SoniadePaulaToledoPRADO^{1*}, AdrianaSalatiniABUD², MariaHelenaPIRES³, EmersonRicardoPANSARIN³

*Endereço para correspondência: Centro de Laboratório Regional de Ribeirão Preto, Instituto Adolfo Lutz, Rua Minas, 877, Campos Elíseos, Ribeirão Preto/SP, Brasil. CEP 14085-410. E-mail: sptprado@hotmail.com

¹Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas, Centro de Laboratório Regional de Ribeirão Preto, Instituto Adolfo Lutz, Ribeirão Preto, SP, Brasil

²Senac, Curitiba, PR, Brasil

³Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil

Recebido: 26.04.2010 – Aceito para publicação: 30.11.2010

RESUMO

Em uma amostra de panetone de frutas cristalizadas, contendo corpos estranhos, encaminhada ao Laboratório de Microscopia de Alimentos do Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto, foram feitas análises, a fim de determinar a origem dessas estruturas. Com o auxílio de estereomicroscópio binocular (lupa) e de um microscópio óptico, os referidos corpos estranhos foram comparados com os espinhos existentes nas porções vegetativas e reprodutivas de espécies de Cactaceae, Caryocaraceae, Malvaceae e Cyperaceae. Foi constatado que o material contido no panetone eram aréolas de gloquídeos, um tipo de espinho comumente presente em frutos e caules de espécies de gênero *Opuntia* (Cactaceae). Os gloquídeos apresentavam comprimento entre 2 e 3 mm, eram rígidos, pontiagudos e providos de pequenas farpas laterais voltadas para base, as mesmas características e dimensões observadas em *Opuntia ficus-indica* (figo da Índia).

Palavras-chave. figo da Índia, espinhos, microscopia de alimentos, matérias estranhas, segurança alimentar, legislação.

ABSTRACT

In a sample of candied fruit “panettone” sent to the Food Microscopy Laboratory of the Instituto Adolfo Lutz, Ribeirão Preto, because of the presence of foreign bodies, the analyses were performed to determine the origin of these structures. By means of a binocular stereomicroscope and a light microscope, the found foreign bodies were compared with the spines from vegetative and reproductive portions of species of several plant families, as Cactaceae, Caryocaraceae, Malvaceae and Cyperaceae. The foreign materials contained in the panettone were areola of glochidia, a barbed hair or bristle commonly found in fruits and stems of species of *Opuntia* (Cactaceae) genus. The glochidia were 2 to 3 mm in length, hard, prickly and with small lateral barbs, the same characteristics found in *Opuntia ficus-indica* (Indian fig Opuntia).

Key words. Indian fig Opuntia, glochidium, food microscopy, foreign matter, food safety, legislation.

INTRODUÇÃO

A Microscopia de Alimentos atua na elucidação de casos de matérias estranhas prejudiciais à saúde humana presentes em alimentos e/ou aquelas indicativas da não adoção de Boas Práticas de Fabricação, além de fixar a identidade e qualidade, caracterizando os elementos histológicos de vegetais próprios (composição) ou os estranhos (fraudes) presentes nos alimentos.

Denúncias ou reclamações de consumidores com relação à presença de diferentes matérias estranhas contidas em vários tipos de alimentos são comumente realizadas através dos órgãos de defesa do consumidor, como delegacias de polícia, departamentos de vigilância sanitária, ou mesmo junto às empresas, através dos serviços de atendimento ao consumidor (SAC). Vários trabalhos relataram a presença de matérias estranhas contidas em diversos tipos de alimentos¹⁻³. Tais contaminantes são reflexos das condições e práticas de higiene adotadas em toda a cadeia produtiva, sendo a análise microscópica uma importante ferramenta indicativa de possíveis falhas e pontos críticos que devem ser monitorados⁴.

De acordo com Germano et al⁵ a presença de matérias estranhas em alimentos fere as normas do direito do consumidor, do direito civil e do direito penal, sendo relevante o número de consumidores que recorrem à justiça para pedir indenizações.

A Resolução RDC nº 175, de 08/07/03, da ANVISA/MS⁶, estabelece as disposições gerais para avaliação de matérias estranhas em alimentos embalados, considerando impróprio para o consumo as relacionadas ao risco à saúde humana abrangendo, entre outras, a presença de objetos rígidos, pontiagudos e/ou cortantes, que possam causar danos ao consumidor. Já a Portaria nº 326/1997, da SVS/MS⁷, define como contaminação, a presença de substâncias ou agentes estranhos, de origem biológica, química ou física que sejam considerados nocivos ou não à saúde humana. Os Regulamentos Técnicos Específicos (Instruções Normativas, Portarias e Resoluções) do Ministério da Saúde e do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, no item 2 – descrição, também são legislações utilizadas na área de microscopia de alimentos.

De acordo com a Lei 8.078/1990⁸, artigo 18, parágrafo 6º - Código de Defesa do Consumidor, os produtos com prazos de validade vencidos, os produtos deteriorados, alterados, adulterados, avariados, falsificados, corrompidos, fraudados, nocivos à vida

ou à saúde, perigosos ou em desacordo com as normas de fabricação, distribuição ou apresentação ou que se revelem inadequados ao fim a que se destinam também são considerados impróprios ao uso e consumo.

O presente trabalho teve como objetivos investigar a origem de corpos estranhos contidos em panetone, através de um estudo comparativo com espinhos presentes em estruturas reprodutivas e vegetativas de diversas famílias de angiospermas, elaborar a descrição morfológica desses espinhos e fornecer subsídios para a investigação da possível etapa da contaminação na cadeia de produção.

MATERIAL E MÉTODOS

Em janeiro de 2009, uma amostra de panetone de frutas cristalizadas fabricado em um supermercado do município de Ribeirão Preto/SP foi encaminhada ao Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas do Centro de Laboratório Regional do Instituto Adolfo Lutz – CLR VI de Ribeirão Preto para a identificação de corpos estranhos presentes no produto. A partir da porção mastigada pelo consumidor, dos corpos estranhos extraídos de sua boca (língua e mucosa jugal) e de amostras retiradas diretamente do referido panetone foram feitas análises comparativas com espinhos e acúleos de porções vegetativas (caules e folhas) e reprodutivas (frutos e sementes) de algumas angiospermas que apresentam esses tipos de estruturas, como espécies de Cactaceae, Caryocaraceae, Malvaceae e Cyperaceae⁹. Adicionalmente foram realizadas comparações com ilustrações de espinhos presentes na literatura¹⁰.

As análises foram feitas com auxílio de estereomicroscópio binocular (lupa), da marca Micronal e microscópio óptico, da marca Olympus CBA, utilizando-se água glicerinada a 2%. Em seguida as lâminas foram cobertas com lamínulas e observadas e fotografadas com auxílio de um microscópio óptico da Marca Leica DM 500.

Por parte do fabricante do produto foram realizadas investigações dos hábitos alimentares do paciente por anamnese clínica, revisão de procedimentos operacionais padronizados e de fluxo na produção do panetone (desde o recebimento e armazenagem de matérias primas), verificação das condições ambientais e de manipulação de alimentos, além da rastreabilidade dos ingredientes da receita, identificação de pontos críticos durante a coleta, produção, embalagem e transporte por parte dos fornecedores e distribuidores de frutas cristalizadas, farináceos e demais produtos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No início do trabalho existia forte suspeita que os corpos estranhos encontrados nas amostras coletadas se tratavam de espinhos de sementes de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb. Caryocaraceae). Ao serem analisados foi constatado que os espinhos, objetos do presente estudo, apresentavam comprimento entre 2 e 3 mm, eram rígidos, pontiagudos e providos de pequenas farpas laterais voltadas para base, sendo esta última a característica inexistente nos espinhos de semente de pequi (Figura 1).

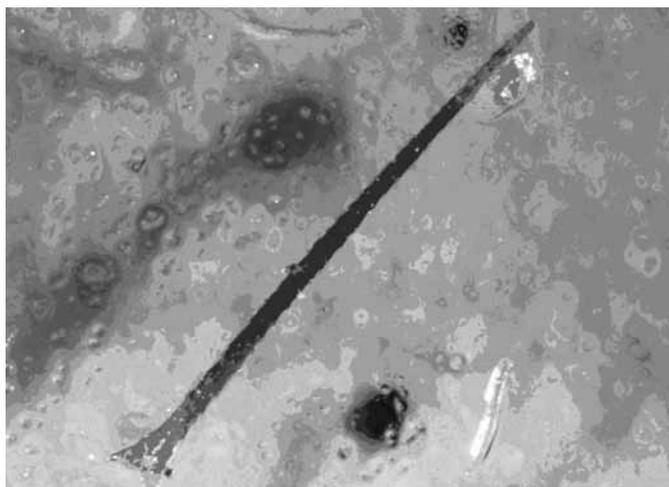


Figura 1. Vista geral do espinho presente na amostra de panetone

Após vários estudos comparativos com diversas espécies vegetais ficou confirmado, através das lâminas que foram preparadas e analisadas com o uso de microscópio óptico, que se tratavam de gloquídeos (um tipo de espinho) comum em frutos e caules de espécies pertencentes à família Cactaceae, principalmente às do gênero *Opuntia*. As estruturas analisadas estavam presentes no panetone e na porção mastigada pelo consumidor que foi fornecida pelo médico que lhe prestou os primeiros atendimentos. Apesar do gênero *Opuntia* apresentar muitas espécies nativas e exóticas (cultivadas como ornamentais e/ou para produção de frutos), através das análises comparativas dos gloquídeos com as amostras coletadas no panetone, também foi possível a identificação ao nível de espécie. Trata-se de uma espécie denominada de *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill., conhecida como Figo da Índia, cultivada no Brasil para produção de frutos. Em ambos os espinhos analisados (frutos e amostras de panetone) as características morfológicas eram idênticas. O tamanho, a coloração acastanhada, assim como a constatação da

presença de farpas laterais extremamente pontiagudas e voltadas para base dos espinhos encontrados no panetone eram as mesmas características dos gloquídeos observados em *Opuntia*¹⁰ (Figura 2).

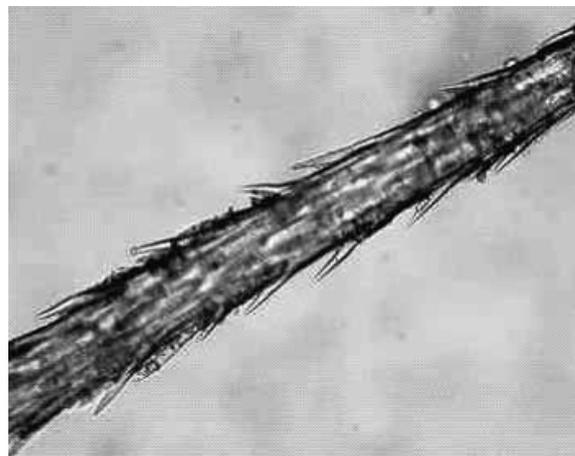


Figura 2. Detalhe das farpas laterais dos espinhos de Figo da Índia observadas ao microscópio óptico (aumento 20X)

Alguns autores já relataram casos em que consumidores sofreram lesões na região bucal decorrente da ingestão inadvertida de sementes ou partes de frutos que contém espinhos. Ramos e Rodrigues¹¹ realizaram biópsia de paciente com dor epigástrica e diagnosticaram gastrite reativa causada por espinhos de pequi. Nesse caso, havia histórico de ingestão de pequi há 15 dias, durante viagem de turismo ao centro-oeste do Brasil.

Com base nos resultados laboratoriais, por parte do fabricante do produto (panetone), foi possível concluir que a contaminação provavelmente ocorreu junto ao fornecedor da matéria prima, durante a etapa de fracionamento em maquinário, uma vez que a dimensão e o formato do corpo estranho se assemelham ao corte e a coloração da fruta cristalizada prévia ao cozimento. Isso pode ter ocorrido pela inadequada remoção de sujidades entre diferentes produtos processados, aliado ao processo de envase em grandes volumes sem uma inspeção sistemática, possibilitando a permanência do mesmo até a etapa de preparo do produto final.

Diante do ocorrido, o fabricante do produto intensificou o treinamento dos manipuladores de alimentos dos setores envolvidos, quanto à separação de ingredientes e estímulo a verificação organoléptica. O fornecedor foi notificado diante da necessidade de intervenção no processo de pré-seleção de produtos para o microprocessamento e da higienização com remoção de sujidade entre lotes e diferentes alimentos.

O atendimento hospitalar e demais tratamentos foram custeados ao consumidor e tomadas medidas de ressarcimento, conforme previsto no Código de Defesa do Consumidor - Lei Ordinária nº 8.078, de 11 de setembro de 1990.

CONCLUSÃO

A análise microscópica foi de grande relevância na elucidação do caso apresentado, demonstrando ser uma excelente ferramenta de investigação e pesquisa no controle de qualidade dos alimentos. Além disso, ressalta-se a importância da experiência e treinamento do profissional da área na elucidação dos casos relacionados à pesquisa de matérias estranhas macro e microscópicas contidas em alimentos. A identificação dos espinhos de *Opuntia ficus-indica* (Figo da Índia) e a descrição morfológica, principalmente do tamanho, coloração, assim como, a constatação das farpas laterais extremamente pontiagudas e voltadas para base, conforme descrito no presente trabalho, servirão como material de referência para a atuação na área de microscopia de alimentos. O presente estudo também forneceu novos elementos para o estabelecimento de pontos críticos na cadeia de produção, desde os fornecedores de matéria prima, distribuidores e fabricantes do produto final a ser consumido, auxiliando na melhoria das Boas Práticas de Fabricação.

REFERÊNCIAS

1. Martini MH, Chiarini PFT, Silva CL, Daros VSMG, Pereira U, Savignano LV. Observações macro e microscópicas de matérias estranhas em alimentos, segundo denúncias do consumidor, no período de 1997 a 2001 nas regiões de Campinas e Santo André/SP. *Hig Aliment*. 2004;18(116/117):47-9.
2. Carneiro RJ, Lírio VS, Dias Mantesso IS, Mazzocatto JA, Melão JC, Ferreira, MAM. Matérias estranhas em alimentos provenientes de denúncia de consumidores no município de São Paulo. In: *Anais do Encontro Nacional de Analistas de Alimentos*; CD-ROM. jun 2007; Fortaleza, BR. Fortaleza, Hotel Oásis Atlântico; 2007.
3. Diefenbach LMG, Bandinelli LG, Fleischut E, Souza GAG, Radiske A. Matérias estranhas em alimentos envolvidos em reclamações de consumidores no Rio Grande do Sul em 2008. In: *Anais do Encontro Nacional de Analistas de Alimentos*; CD-ROM. 2009; Belo Horizonte, BR. Belo Horizonte: Minascentro; 2009. 1.
4. Rodrigues RMMS, Nogueira MD. Fiscalização de alimentos por análise microscópica. In: Muradian LBA, Penteado MDVC. *Vigilância Sanitária: tópicos sobre legislação e análise de alimentos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2007. p. 73-80.
5. Germano PML, Boanova AB, Germano MIS. Direito do Consumidor: Larva em bombom gera indenização por danos morais. *Rev Direito Sanit*. 2009;10(2):166-82.
6. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 175, de 08 de julho de 2003. Regulamento Técnico de Avaliação de Matérias Macroscópicas e Microscópicas Prejudiciais à Saúde Humana em Alimentos Embalados. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 09 de jul 2003. Seção 1.
7. Brasil. Secretaria de Vigilância Sanitária (SVS) do Ministério da Saúde. Portaria nº 326, de 30 de julho de 1997. Regulamento Técnico sobre Condições Higiênicas-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 01 de ago 1997. Seção 1.
8. Brasil. Presidência da República, Casa Civil. Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1990. Dispõe sobre a proteção do consumidor e dá outras providências. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, nº 176, 12 set 1990. Suplemento, p.1-12.
9. Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF, Donoghue MJ. *Plant Systematics: A phylogenetic approach*. Second Edition. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA; 2002.
10. Harris JG, Harris MW. *Plant identification terminology: an illustrated glossary*. Spring Lake Publishing, Utah; 1994.
11. Ramos AMO, Rodrigues SJP. Lesão Gástrica. *Foro de diagnóstico por imagem*. Natal, RN;2002. [acesso em 17 mar. 2010]. Disponível em: <http://pat.uninet.edu/zope/pat/casos/C066/>.

Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus reuteri* contra bactérias de interesse alimentar

Antimicrobial activity of *Lactobacillus reuteri* against bacteria of nourishment concern

RIALA6/1334

Helen Silvestre da SILVA*, Roberta Juliano RAMOS, Andréia CIROLINI, Marília MIOTTO, Andressa Mara BASSEGIO, Cleide Rosana Werneck VIEIRA

Endereço para correspondência: ¹Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Rodovia Admar Gonzaga, 1346, Itacorubí, Florianópolis, SC, Brasil. CEP 88034-001. Tel: 47 8805-3705. E-mail: helen_silves@yahoo.com.br

Recebido: 09.08.2010 – Aceito para publicação: 29.12.2010

RESUMO

Lactobacillus reuteri é uma espécie heterofermentativa que reside nos tratos gastrointestinal (GI), vaginal e oral do homem e de outros animais de sangue quente. A ação probiótica de *L. reuteri* é atribuída a sua capacidade de exercer um efeito inibitório sobre micro-organismos patogênicos pela combinação de diversos mecanismos, incluindo-se a produção de ácido lático, peróxido de hidrogênio e produção de bacteriocinas. A reuterina é um composto neutro, de baixo peso molecular, solúvel em água, ativa em uma larga faixa de pH e resistente a ação de enzimas proteolíticas e lipolíticas. Neste estudo foi avaliado o efeito inibitório de *L. reuteri* sobre bactérias patogênicas ou deteriorantes de alimentos. *L. reuteri* apresentou capacidade de inibir o crescimento de *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella tiphymurium*, *Staphylococcus aureus* e *Vibrio cholerae*. Sugere-se que o antimicrobiano produzido pelo *L. reuteri* seja a reuterina.

Palavras-chave. reuterina, *L. reuteri*, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Lactobacillus reuteri is a heterofermentative species that lives in the gastrointestinal (GI), vaginal and oral tracts of humans and other warm-blooded animals. The action of probiotic *L. reuteri* is derived from its ability to exert an inhibitory effect on pathogens, combining several mechanisms, including the production of lactic acid, hydrogen peroxide and bacteriocin production. The reuterin is a neutral compound of low molecular weight, water soluble, active in a wide pH range, and resistant to proteolytic and lipolytic enzymes. This study evaluated the inhibitory effect of *L. reuteri* on pathogenic bacteria or food deterioration. *L. reuteri* showed ability to inhibit the growth of *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella tiphymurium*, *Staphylococcus aureus* and *Vibrio cholerae*. It is suggested that the antibiotic produced by *L. reuteri* is the reuterin.

Key words. reuterin, *L. reuteri*, antimicrobial activity.

INTRODUÇÃO

Lactobacillus reuteri é uma espécie heterofermentativa que reside no trato gastrointestinal (GI), vaginal e oral do homem e outros animais de sangue quente¹. A ação probiótica de *L. reuteri* é atribuída a sua capacidade de exercer um efeito inibitório sobre micro-organismos patogênicos com uma combinação de diversos mecanismos, incluindo a produção de ácido lático, peróxido de hidrogênio e produção de bacteriocinas². Um composto primário produzido por *L. reuteri*, reuterina, é produzido durante a fermentação do glicerol. Reuterina, β -hydroxypropionaldeído (3-HPA), é produzida em condições de anaerobiose e apresenta efeitos de amplo espectro contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bem como fungos, leveduras e protozoários. A reuterina é um composto neutro, de baixo peso molecular, é solúvel em água, ativa em uma larga faixa de pH e resistente a ação de enzimas proteolíticas e lipolíticas³.

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia antimicrobiana da cultura celular e do extrato de *Lactobacillus reuteri* contra bactérias de interesse em alimentos.

MATERIAL E MÉTODOS

Micro-organismos e condições de cultivo

Lactobacillus reuteri ATCC 1428, foi mantido em Caldo MRS com 20% de glicerol a $\pm 20^\circ\text{C}$. As seguintes cepas foram usadas como indicadoras: *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117, *Proteus vulgaris* ATCC 13315, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enterica* ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Vibrio cholerae* ATCC 15748. Para reativação, as cepas indicadoras foram cultivadas em caldo triptona de soja (TSB) e *L. reuteri* em caldo MRS. Meios seletivos foram usados para a contagem das cepas indicadoras utilizadas nos ensaios de inibição em caldo. Os meios foram selecionados utilizando-se com base a metodologia de contagem ou pesquisa descrita no APHA⁴ para cada espécie.

Produção do extrato de *Lactobacillus reuteri* por fermentação do glicerol

A produção do extrato seguiu a metodologia descrita por Cleusix⁵ com algumas modificações. A partir da cultura de *L. reuteri* (10 mL) pré-reativada, o volume total foi transferido

para um frasco contendo 50 mL de caldo MRS e incubado a $\pm 37^\circ\text{C}$ por 12 horas. Todo o volume foi transferido para um frasco contendo 500 mL de caldo MRS e incubado a $\pm 37^\circ\text{C}$ por 24 horas. As células foram colhidas por centrifugação em 1500 x g por 10 minutos a 20°C , lavadas com tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,0), ressuspendidas em 300 mL de solução estéril aquosa de glicerol (200 mM) e incubadas por 3 horas a 37°C em cuba de anaerobiose (Anaerogen®). As células foram removidas por centrifugação (8000 x g, 10 minutos) e 150 mL do sobrenadante foram esterilizados por filtração em membrana 0,22 μm (Millipore).

Ensaio de inibição

Os ensaios de inibição em meio sólido foram realizados através do Método de Difusão em Ágar pela técnica de poços⁶. Nos poços foram adicionados 50 μL do extrato ou da cultura. Cada ensaio foi feito em triplicata e, após o período de incubação, procedeu-se à leitura e interpretação dos resultados, através da medida do diâmetro da zona sem crescimento da cepa indicadora. Os ensaios de antagonismo em meio líquido foram realizados por Método Simultâneo e Método *Deferred*, seguindo a metodologia descrita por Batista⁷. Para os dois experimentos o controle foi a cultura da cepa indicadora em caldo TSB. Após a incubação, a contagem final da cepa indicadora em meio seletivo foi realizada para os dois métodos e para o controle.

Análise Estatística

O resultado dos ensaios em caldo foi submetido à análise de variância (ANOVA), seguida de teste de Tukey para avaliar a diferença estatística entre o controle e o tratamento. As análises foram realizadas com auxílio do programa STATISTICA® 9.0 (StaSoft).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De todas as culturas indicadoras testadas, duas apresentaram crescimento inibido pela cultura de *L. reuteri* em meio sólido, *Proteus vulgaris* e *Vibrio cholerae*, com zonas de inibição médias de 3,3 mm e 7,8 mm de diâmetro. Resultados pouco expressivos foram observados nos ensaios em meio sólido quando se avaliou a inibição usando uma cultura de *L. reuteri*. O caldo de crescimento e o ensaio de inibição ocorreram todos em aerobiose, desta forma, a produção de antimicrobianos por *L. reuteri* pode ter sido insuficiente para inibir o crescimento da maioria das cepas indicadoras. Segundo Ruch et al⁸, os micro-organismos

que têm a capacidade de produzir reuterina como *L. reuteri* e *K. pneumoniae* apresentam essa produção apenas em anaerobiose e produção bastante reduzida em aerobiose.

Os ensaios feitos com o extrato de *L. reuteri*, apresentaram resultados positivos para cinco cepas indicadoras, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus* e *Vibrio cholerae*, com zonas de inibição médias de 5,0 mm; 2,3 mm; 5,0 mm; 4,3 mm e 5,9 mm, respectivamente.

A capacidade de algumas cepas de *L. reuteri* de inibir o crescimento de *V. cholerae* foi testada por Spinler et al³, eles verificaram que todas elas apresentaram efeito inibitório contra este microrganismo. Segundo os autores, as cepas de *L. reuteri* apresentam diferenças na síntese de reuterina, o que revela diferenças na expressão gênica. No entanto, o composto produzido por todas as cepas apresentou-se semelhante, quanto à capacidade de inibição contra as cepas indicadoras testadas. Os autores utilizaram neste estudo uma solução de reuterina que foi produzida de forma semelhante ao extrato de *L. reuteri* usado no presente trabalho. Ainda, o estudo de Spinler et al³, apresenta resultados de inibição da solução de reuterina contra cepas patogênicas de *E. coli*.

El-Ziney et al⁹ já haviam relatado a capacidade inibitória de reuterina produzida por *L. reuteri* contra cepas de *Bacillus cereus* com Concentração Inibitória Mínima (MIC) de 2 UA/mL.

Para os ensaios realizados em meio líquido pode-se observar que pelo Método Simultâneo *L. reuteri* apresentou efeito inibitório baixo contra todas as cepas testadas, porém, quando analisados estatisticamente, apenas os resultados para *E. aerogenes*, *P. vulgaris* e *V. cholerae* apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$). O resultado da contagem do controle comparado ao tratamento pelo Método Simultâneo pode ser observado na Figura 1.

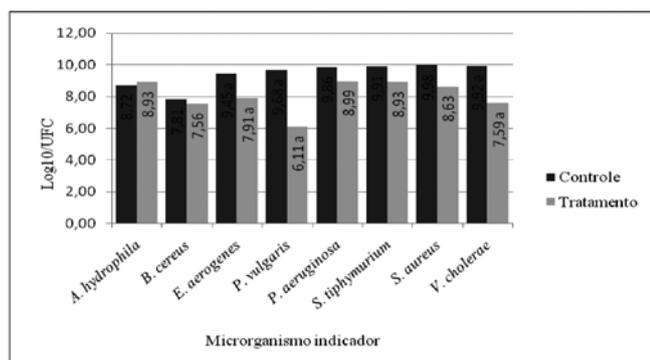


Figura 1. Contagens (Log 10) de diferentes micro-organismos quando tratados com *L. reuteri*, em meio líquido, pelo método Simultâneo. *O símbolo (a) representa diferença estatística entre o controle e o tratamento

O resultado do experimento realizado pelo Método *Deferred* apresentou inibição para todas as cepas indicadoras e, quando submetidas à análise estatística, apresentou diferença ($p < 0,05$) em todas. O resultado da contagem do controle comparado ao tratamento pelo Método *Deferred* pode ser observado na Figura 2.

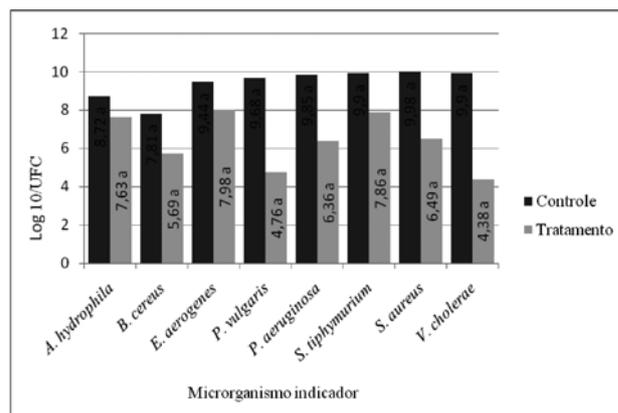


Figura 2. Contagens (Log 10) de diferentes micro-organismos quando tratados com *L. reuteri*, em meio líquido, pelo método *Deferred*. *O símbolo (a) representa diferença estatística entre o controle e o tratamento

Arqués et al¹⁰ em estudo de aplicação de reuterina em leite refrigerado, avaliaram a atividade inibitória deste antimicrobiano contra patógenos Gram-negativos. Os autores observaram que a reuterina foi efetiva contra *E.coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila* e *Campylobacter jejuni*.

Cepas de *Salmonella* sp. apresentam-se sensíveis a antimicrobianos produzidos por *L. reuteri*. Barros et al¹¹ avaliaram a atividade de cepas de *Lactobacillus* sp. isolados de ingluvío e ceco de aves contra *Salmonella* isoladas de vísceras de galinha. *L. reuteri* foi eficiente contra todas as cepas testadas. Spinler et al³ também reportaram a atividade inibitória da reuterina contra *Salmonella enterica*.

A reuterina é efetiva na inibição de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica*, *Shewanella putrefaciens* e outros^{9,12}.

Neste estudo *Lactobacillus reuteri* foi capaz de inibir todas as cepas testadas pelo Método *Deferred*, sugerindo que houve produção de reuterina durante a incubação em anaerobiose, e que a reuterina produzida inibiu o crescimento das cepas indicadoras inoculadas posteriormente.

CONCLUSÃO

L. reuteri produz reuterina através da fermentação do glicerol, e esta é eficiente para a inibição dos micro-organismos testados neste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Hammes W, Hertel C. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: *The Prokaryotes*. 2006. p. 320-403.
2. Casas IA, Dobrogosz WJ. Validation of the probiotic concept: *Lactobacillus reuteri* confers broad spectrum protection against disease in humans and animals. *Microb Ecol Health Dis*. 2000; 12: 247-85.
3. Spinler JK, Taweechotipatr M, Rognerud CL, Ou CN, Tumwasorn S, Versalovic J. Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens. *Anaerobe*. 2008; 14 (3):166-71.
4. APHA. American Public Health Association. Compendium of methods for microbiological examination of foods. 4 ed. Washington; 2001.
5. Cleusix V, Lacroix C, Vollenweider S, Le Blay G. Glycerol induces reuterin production and decreases *Escherichia coli* population in an in vitro model of colonic fermentation with immobilized human feces. *FEMS Microbiol Ecol*. 2008; 63:56-64.
6. Pinto TJA, Kaneko TM, Ohara MT. Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos. 2 ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2003.p.325.
7. Batista CRV. Studies on the cultural properties of smooth and rough forms of *Listeria monocytogenes* and antagonistic interaction with *Bacillus amyloliquefaciens*. [PhD Thesis], Glasgow: University of Strathclyde, 1993.p 314.
8. Ruch FE, Lengeler J, Lin ECC. Regulation of glycerol catabolism in *Klebsiella aerogenes*. *J Bacteriol*. 1974.119:50-6.
9. El-Ziney MG, Debevere JM, Jakobsen M, Reuterin. In: NAYDU, A.S. *Natural Food Antimicrobial Systems*. CRC, Florida; 1997. p. 567-87.
10. Arqués JL, Nunez M, Rodriguez E, Medina M. Antimicrobial Activity of Nisin, Reuterin, and the Lactoperoxidase System on *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in Cuajada, a Semisolid Dairy Product Manufactured in Spain. *J Dairy Sci*. 2007; 91:70-5.
11. Barros MR, Andreatti Filho RL, Lima ET, Crocci JA. Avaliação *in vitro* da atividade inibitória de *Lactobacillus* spp, isolados do ingluvío e cecos de aves sobre *Salmonella*. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2009; 61:863-68.
12. Chung TC, Axelsson L, Lindgren SE, Dobrogosz WJ. *In vitro* studies on reuterin synthesis by *Lactobacillus reuteri*. *Microb Ecol Health Dis*. 1989. 2:137-44.

Total lipids, cholesterol and fatty acids composition of ostrich eggs: a methodological approach

Lipídios totais, colesterol e composição de ácidos graxos de ovos de avestruz: uma abordagem metodológica

RIALA6/1335

Jailane de Souza AQUINO*, João Andrade da SILVA

Endereço para correspondência: *Departamento de Nutrição, Universidade Federal da Paraíba/UFPB, Campus I, Cidade Universitária, CEP 58059-900, João Pessoa/PB, Brasil. E-mail: lalaaquino@hotmail.com

Recebido: 17.03.2010 – Aceito para publicação: 29.12.2010

ABSTRACT

The present study compared the total lipids and lipid fractions contents of ostrich eggs with of chicken eggs, both *in natura*, and the methodologies used for these determinations were assessed. Total lipids were quantified by Folch and Soxhlet technique. Cholesterol contents was quantified by colorimetric method and using a C18 HPLC column, mobile phase composed of acetonitrile: isopropanol (80:20), and the detection level was adjusted to 210 nm. Fatty acids were determined by gas chromatography. No significant differences in the results were found in determining cholesterol by both methods. *In natura* ostrich egg yolk presents higher percentage of mono and polyunsaturated fatty acids and lower percentage of saturated fatty acids when compared to *in natura* chicken egg yolk. Although ostrich egg yolk presented higher lipid contents, the amount of cholesterol was similar in both egg types. *In natura* ostrich egg yolk contains highest rate of monounsaturated, polyunsaturated and saturated, which could be considered as the best nutritional quality fat.

Key words. egg yolk, lipids, ostrich egg.

RESUMO

Neste estudo os valores de lipídios totais e das frações lipídicas dos ovos de avestruzes foram comparados com os dos ovos de galinha *in natura*. Os lipídios totais foram quantificados pela técnica de Folch e Soxhlet. O colesterol foi quantificado pelo método colorimétrico e por HPLC utilizando-se coluna de C18, fase móvel de acetonitrila:isopropanol (80:20) e detecção fixada em 210 nm. Os ácidos graxos foram determinados por cromatografia gasosa. Diferenças significativas foram observadas entre os resultados obtidos pelos métodos de extração de lipídios totais da gema e do ovo integral de avestruz. Não houve diferença significativa nos resultados obtidos pelos dois métodos de determinação de colesterol. A gema *in natura* de ovo de avestruz apresenta maior percentual de ácidos graxos mono e poli-insaturados e menor percentual de ácidos graxos saturados, quando comparados a gema de ovo de galinha *in natura*. Apesar da gema de ovo de avestruz apresentar maior conteúdo lipídico, a quantidade de colesterol entre os dois tipos de ovos foi semelhante. A gema de ovo de avestruz *in natura* contém uma melhor proporção de ácidos graxos mono, poli e saturados, que pode ser considerada como gordura de melhor qualidade nutricional.

Palavras-chave. gema de ovo, lipídios, ovos de avestruz.

INTRODUCTION

Egg is considered one of the most complete foods, which biological and nutritional value has been evaluated and attested by several researchers. Egg is a source of proteins known for their nutrition, biological and technological potential¹. It contains liposoluble vitamins, A, D, E and K, besides vitamins from the vitamin B complex such as thiamine, riboflavin, niacin, pyridoxine and cyanocobalamin. Among minerals, iron, calcium, potassium, sodium, phosphorous and zinc, among others, are found. Egg is an important source of cholesterol and unsaturated fatty acids, mainly oleic acid.

For more than 40 years, publications have informed about the relationship between the consumption of eggs and the risk of coronary diseases. This information is based on three observations: 1. eggs are rich in dietary cholesterol; 2. the dietary cholesterol increases the serum cholesterol and 3. high serum cholesterol induces the appearance of coronary diseases. The high consumption of eggs or any cholesterol-rich foods by diabetic individuals, cancer carriers, and those with hypercholesterolemia can unchain coronary diseases². However, data on healthy population have demonstrated that the consumption of the egg is not associated with the high cholesterol level. In recent researches, was reported that the excessive ingestion of saturated fat is the main responsible for the appearance of cardiovascular diseases and that although dietary cholesterol has influenced the atherogenic and anti-atherogenic cholesterol fractions, these effects are minimum and mainly, they do not affect the proportion between LDL and HDL cholesterol.

The highest concentration of lipids in eggs is in the yolk, among its components, lipoproteins, vitellin and vitellinine can be mentioned; a water-soluble fraction, livetin, and finally phosphovitin. Fats from egg yolk are strongly emulsified, being represented by triacylglycerols and cholesterol.

According to Brum³, lipids extraction is an important determination in biochemical, physiological and nutritional studies of the most several types of foods and, therefore, it should be accomplished with accuracy. Some samples request special care in obtaining the lipid fraction due to factors such as the co-extraction of non-lipid components and undesired oxidation, which could influence the final quality of the lipid fraction.

Egg is a cheap and nutritious food part of the human diet in all social levels, since it is widely used in food industries and in several food preparations. In countries such as Spain and Italy, infertile ostrich eggs (not incubated) are widely used in bakeries, pastry shops and food industries, once each egg weighs between 1.3 and 1.7kg with identical flavor and similar chemical and physical properties as chicken eggs and an ostrich egg is equivalent to approximately 24 chicken eggs.

The objective of this work was to assess the nutritional value of ostrich eggs when the total lipids and lipid fractions of these eggs are compared to *in natura* chicken eggs, as well as to evaluate the methodologies specifically used for these determinations, searching for more data on this type of sample.

MATERIAL AND METHODS

Material

Eggs used in this experiment were provided by Coovestruz-PB (Ostrich Breeders Association of the state of Paraíba), being collected using sterile gloves, conditioned in individual sterile sacks and transported to the laboratory in styrofoam and under cooling. Chicken eggs used in this experiment are label “*Dagama*”, produced at the *Pedra de Fogo* region - Paraíba - Brazil, classified as intermediate (in relation to the size and weight), which were purchased in local supermarkets of João Pessoa - Paraíba - Brazil.

Methods

Total lipids

The extraction of lipids linked to proteins and carbohydrates was performed according to methodology proposed by Folch et al⁴ using the polar solvents, chloroform: methanol (2:1 v/v), as well as Soxhlet for the determination of total lipids.

Fatty acids composition of ostrich and chicken egg yolk Preparation of the methylic esters

The samples consisted of *in natura* ostrich and chicken egg yolks. The method consisted of weighing 0.2g of ostrich egg yolk with the addition of 3.0 mL of hydroxide of methanol potassium to 5.0 N (as hydrolyzing agent). Heat until ebullition and leave to rest until the emergence of a single phase. Later, 7 mL of esterification solution was added (methylic alcohol, ammonium chloride and sulfuric acid),

maintaining the mixture in reflux for 4 minutes more. Soon afterwards, it was transferred into a separation funnel, with the addition of 25 mL of distilled water and 12.5 mL of ethyl ether, shaking gently. This procedure was performed when the separation of the two phases was observed. The lipid fraction was washed three times with 25 mL of distilled water, decanting and discarding the aqueous phase. Finally, the organic phase was filtered with anhydrous sodium sulfate to keep the excess of water.

Identification and quantification of the fatty acids methylic esters

The identification and quantification of the methylic esters were performed at the Flavor Laboratory of the Paraíba Federal University CT-UFPB through gas chromatography connected to a mass spectrophotometer model Saturn 2000 - Varian CG/MS.

Were transferred 990µL of the hexane extract from samples into chromatographic flasks, with 10µL of hexane for the chromatographic analyses. 1µL of this solution was injected into a gas chromatograph equip with capillary column CP Sil - 8 low bleed of 30 m of length x 0.25 mm of internal diameter x 0,25 µm of thickness of the film of 5% phenyl - 95% dimethylpolysiloxane.

The operational conditions of the chromatograph were: temperature of 120°C for injector and detector; initial temperature of 120°C for the column for 1 minute, with increase of 8°C per minute, remaining at 210°C for 10 minutes, with heating ratio of 5°C per minute up to 250°C, remaining at this temperature for 8 minutes. The running time was 38 minutes and 25 seconds. Helium was used as dragging gas, with a flow of 0.1mL min⁻¹.

The fatty acids characterization occurred comparing the spectrum of masses obtained with data from literature using specific *software* installed in the computer coupled the CG-MS device. Based on values of the total area of peaks, which corresponds to 100%, the percentage of fatty acids could be quantified in function of the relative area of each peak.

Ostrich and chicken egg yolk cholesterol determination

Figure 1 represents the flowchart of methods used in this study to determine cholesterol of *in natura* ostrich and chicken egg yolks. For both methods, the total lipids were extracted with chloroform: methanol (2:1), according to Folch et al⁴.

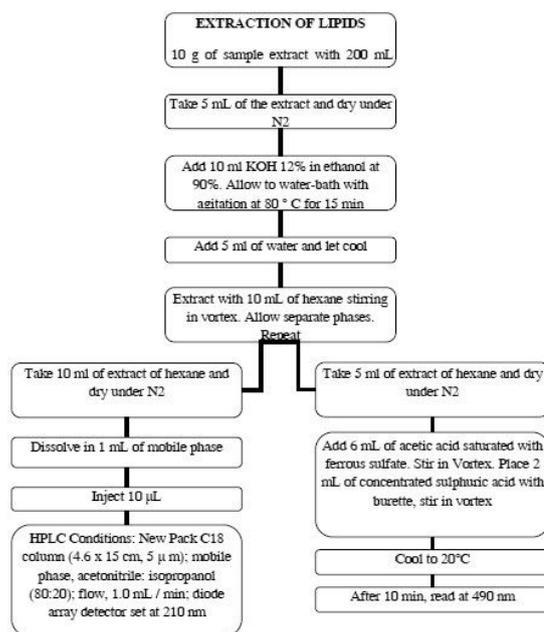


Figure 1. Flowchart for cholesterol determination through HPLC and colorimetry

Cholesterol determination through colorimetry method

Cholesterol was determined through colorimetry method using *in natura* ostrich and chicken egg yolk as samples according to methodology described by Bragagnolo e Rodriguez-Amaya⁵. Were weighed 0.25 g of sample in test tubes with twist cap of 70 mL and 10 mL of 2% KOH in absolute ethanol was added. Later, the tubes were put in water bath at 50°C with agitation for 2 hours. Soon afterwards, 5 mL of distilled water was added and cooled. For the extraction of the unsaponifiable matter, 10 mL of hexane mL was added stirring in vortex for one minute. After separation, the entire hexane phase was transferred into a tube of 50 mL with twist on lid. The extraction was repeated twice. The last stage was the color reaction that was performed with tubes involved in aluminum paper, without incidence of light. 5mL of the hexanic extract were taken to dry in nitrogen and water-bath at 55°C, with the addition of acetic acid, being later saturated in FeSO₄ and titled with concentrated sulfuric acid.

The reading was performed in UV-vis scanning spectrophotometer label Quimis model Q798U2VS after 10 minutes at wavelength of 490nm. A calibration curve for cholesterol (from 0.5 to 5 mL) was performed before the entire process with the sample. The result is presented as the cholesterol content in mg/g sample according to the following formula:

$$\text{mg/g of cholesterol} = \frac{C \times D \times V \times 100}{A \times P \times v}$$

C - cholesterol concentration

A - Bracket of the hexane extract for the color reaction (5mL)

D - dilution of the sample

P - weigh of the sample

V - real volume of the hexane extract

v - ideal volume of the hexane extract

Cholesterol determination through HPLC

For the cholesterol determination through HPLC, a liquid chromatograph label Varian Pro Star composed by isocratic pump with manual injector Reody, with sampling loop of 20 μ l and coupled to diode array detector (DDA) was used. The column chromatograph used was: New column Pack C18 with 15 x 4.6cm and 5 μ m of particle diameter.

Standard cholesterol in hexane solutions was prepared after drying and resuspension in acetonitrile, and their concentrations were determined by means of the absorbance measured in the HPLC. The standard solutions were conditioned in flasks wrapped up with aluminum paper and stored at -10°C. The manipulation of the standards and samples during the extraction was performed in environment with low brightness.

The extracts were filtered in membranes Millipore Fluoropore 0.5 μ m to be soon later injected in the chromatograph column. The separation of the cholesterol column from the reverse phase was performed through an isocratic system.

As mobile phase, the acetonitrile/isopropanol (80:20) mixture was used at the flow rate of 1ml/min, being necessary 10 min of chromatographic operation and 5min of reconditioning of the column between injections. Wavelength of 210nm was used for the cholesterol detection.

For identification, the comparison of the retention times obtained standards at the same chromatograph conditions was used, and the absorption spectra obtained in the DAD. The quantification was accomplished according to external standardization method.

Statistical analysis

The results of the research were submitted to statistical tests with the aid of the statistical package SPSS - Statistical Package for Social the Science version 11.0.

The results of the cholesterol analysis and the comparison between methods for the determination of lipids of white egg presented normal distribution, and the *t* Student test was applied for difference of averages at the level of significance of 5%. The data of the comparison between methods for lipid determination in yolk and whole egg did not present normal distribution; therefore, the test Mann-Whitney U was applied for difference of averages at the level of significance of 5%.

RESULTS AND DISCUSSION

Total lipids - Comparison of results obtained through Folch and Soxhlet methods

There were significant differences ($p < 0.05$) between results obtained using different methods for the extraction of lipids in yolk and whole ostrich egg. The percentage of lipids from the ostrich egg yolk was 38.48 ± 1.07 for Folch method and 50.8 ± 0.76 Soxhlet method, while for the whole egg, the percentage of lipids was 11.50 ± 0.44 by Folch method and 34.50 ± 1.32 by Soxhlet method. No significant difference was observed in the percentage of lipids from ostrich egg white determined by the methods of Folch and Soxhlet which were respectively 0.30 ± 0.04 and 0.34 ± 0.04 . However, for the extraction of lipid in white egg, similarity was observed in the lipid quantification, what is explained because egg white presents only traces of lipids substances.

A difference of more than 20% could be observed in results obtained with the Soxhlet method in relation to the Folch method, in the quantification of lipids in yolk and whole egg. This evident difference could be mainly due to particularities of the different samples and to the choice of the solvents used (polarity of solvents).

The method of Folch et al⁴ is known as a cold extraction method when compared with the Soxhlet method, this method has demonstrated to be very efficient in the determination of total lipids in foods rich in phospholipids such as eggs. Solvents chloroform and methanol used in the Folch method are more polar than n-hexane, used in the Soxhlet method and hence, polar and non-polar lipids are efficiently extracted³. The liposoluble vitamins and pigments are unsaponifiable and, therefore they cannot be extracted through the Folch method.

Solvent n-hexane used in the Soxhlet method, due to its non-polar characteristic, extracts not only lipids (triglycerides, phospholipids and cholesterol), but also non-polar substances³ such as liposoluble vitamins and pigments, what could overestimate the lipid fraction in the egg fat, once this is the source of all liposoluble vitamins (A, D, E, K), besides containing many carotenoid pigments in the yolk that grant its characteristic color.

Moreover, in the Soxhlet method, where the sample is submitted to heat for more than 4 consecutive hours, lipid oxidation could occur, once this is favored by factors such as the water content, the time and the exposition temperature, the exposition degree of the sample to the light, among other factors, leading to the formation of compounds of higher molecular weight (peroxides, aldehydes, oxidized acids, etc.).

Fatty acids

In natura ostrich egg yolk presents higher percentile of mono and polyunsaturated fatty acids and lower percentile of saturated fatty acids when compared to *in natura* chicken egg yolk (Table 1).

The fatty acids identified in this study were the same as those identified by Mazalli⁶ in *in natura* and dehydrated chicken egg yolks. The main fatty acids identified in this study were the same as those identified by Di Meo et al⁷ in *in natura* of ostrich egg yolks. Among the fatty acids identified in the samples, one can highlight the saturated fatty acids (SFA): tetradecanoic, pentadecanoic, hexadecanoic, octadecanoic, monounsaturated fatty acids (MUFA): hexadecenoic and octadecenoic and polyunsaturated fatty acids (PUFA): octadecadienoic, docosahexaenoic and eicosapentanoic.

Table 1. Main fatty acids present in chicken and ostrich egg yolk

Ostrich egg	Yolk	
	Chicken <i>in natura</i>	Ostrich <i>in natura</i>
Total saturated fatty acids - SFA (%)	26.94% ^a	25.61% ^b
Tetradecanoic	0.27% ^a	0.20% ^b
Pentadecanoic	10.27% ^b	10.78% ^b
Hexadecanoic	9.33% ^a	8.34% ^b
Octadecanoic	7.07% ^a	6.29% ^b
Total monounsaturated fatty acids - MUFA (%)	52.64% ^a	53.98% ^b
Hexadecenoic	0.33% ^b	1.03% ^a
Octadecenoic	52.31% ^b	52.95% ^a
Total polyunsaturated fatty acids - PUFA (%)	18.42% ^b	19.41% ^a
Octadecadienoic	13.93% ^b	15.31% ^a
Docosahexaenoic	0.30% ^b	0.90% ^a
Eicosapentanoic	1.30% ^b	1.75% ^a
Other fatty acids	2.85%	1.45%
ω-6/ ω-3 Ratio	8.49	5.77

*Averages followed by same letters in same row means no statistic difference ($p > 0.05$)

**For lipids present in whole egg yolk, the Mann-Whitney U test was applied, and for egg white, the T-Student test was applied

The fatty acids composition of fat from yolk can be modified by diet, and the amount of dietary unsaturated fatty acids can modify the proportions of fatty acids present in yolk, what can explain the difference between the percentile of fatty acids present in chicken egg yolk when compared to ostrich egg yolk. It was observed that

only the results of polyunsaturated fatty acids were similar to those obtained by Sussi et al⁸ in a study conducted in Italy in which ostrich egg yolks presented 36.26% of saturated of fatty acids, 47.61% of monounsaturated fatty acids and 15.45% of polyunsaturated fatty acids. Among the unsaturated fatty acids, the highest percentile observed

was of linoleic acid, and in the study conducted by Sussi et al⁸ and considering monounsaturated fatty acids; the highest percentile found was of oleic acid.

In the last decades, studies have reported that diets with appropriate amounts of polyunsaturated fatty acids omega 3 (PUFAs ω -3) and omega 6 (PUFAs ω -6) play important role in the prevention and treatment of several diseases.

According to documents published, the relationship between ω -6: ω -3 from 10 to 5:1 is considered satisfactory. In this context, values presented by *in natura* chicken egg yolk and *in natura* ostrich egg yolk are within this range.

Cholesterol - Comparison of the results obtained through both colorimeter and HPLC methods

The amount of cholesterol present in the *in natura* chicken egg yolk assessed in this study through the colorimeter method is of 13.23 ± 2.22 mg/g, similar to that found in ostrich egg yolk, also determined through colorimetry, which is 12.70 ± 1.47 mg/g.

Moreover, no statistic difference between the cholesterol contents found in chicken egg yolk obtained through HPLC, which was of 12.71 ± 1.54 and the cholesterol contents found in ostrich egg yolk obtained through HPLC, which was of 12.17 ± 1.36 mg/g was observed.

With the aid of the statistical analysis, it was observed that the results of both methods (colorimetry and HPLC) were equivalent for both *in natura* chicken egg yolk and ostrich egg yolk samples. In a similar study conducted by Bragagnolo e Rodriguez-Amaya⁹ in meats, equivalence was also verified between cholesterol contents by both methods. However, the same authors have suggested that the HPLC method showed better repeatability, because the repeatability of the colorimetry method depended on the rigorous control of the reaction conditions.

The cholesterol level in the organism of birds is more dependent on its endogenous synthesis than on its dietary contribution. However, the place and the cholesterol synthesis vary with the species, age and feeding. Approximately two thirds of the synthesis occurs in the liver, 25% in the carcass and 6% in the intestine and in the skin.

The results obtained are close to those reported by Bragagnolo e Rodriguez-Amaya⁵, who also performed this determination through the colorimetry method and presented a variation range in the cholesterol value of chicken eggs between 10.33 and 18.86 mg/g yolk. The results obtained for the amount of cholesterol in the ostrich egg yolk corroborate with that found by Horbanczuk et

al¹⁰, which was of 13 mg/g yolk. Therefore, the amount of cholesterol present in the ostrich egg yolk is similar that found in the chicken egg yolk.

The most efficient method for the total lipids quantification in eggs is that developed by Folch et al⁴. The colorimetry method used to determine cholesterol is cheaper; however it can present many other variables, requiring rigorous control of the conditions and stages accomplished in this method. The HPLC method is more expensive but presents no other variables for its performance; however it requires qualified technicians for the use of its apparatus.

CONCLUSIONS

Although ostrich egg yolk presents higher lipid content, the amount of cholesterol between the two types of eggs was similar. However, in terms of fatty acids, *in natura* ostrich egg yolks presented higher percentile of mono and polyunsaturated fatty acids and lower percentile of saturated fatty acids, being a fat of better nutritional quality.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to Cooperativa de Criadores de Avestruz do Estado da Paraíba - COOVESTRUZ for the samples, but also by encouraging and concentration of effort for this research and to CNPq for a Master's scholarship awarded during the search.

REFERENCES

1. Machado FF, Coimbra JSR, Rojas EEG, Minim LA, Oliveira FC, Sousa RCS. Solubility and density of egg white proteins: Effect of pH and saline concentration. *LWT-Food Sci Tech*. 2007; 40: 1304-7.
2. Kritchevsky SB. A Review of Scientific Research and Recommendations Regarding Eggs. *J Am Coll Nutr*. 2004; 23 (90006): 596-600.
3. Brum AAS. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica [dissertação de mestrado]. Piracicaba (SP): Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"; 2004.

4. Folch J, Lees M, Sloon-Stanley GN. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biological Chem*. 1957; 226 (1): 497-509.
5. Bragagnolo N, Rodriguez-Amaya DB. Avaliação comparativa de três métodos para determinação de colesterol em gema de ovo. *Arq Biol Tecno*. 1993; 36 (2): 237-51.
6. Mazalli, MR. Efeito do processamento térmico e tempo de estocagem na formação de óxidos de colesterol e na alteração da composição de ácidos graxos em ovos. [tese de doutorado]. Campinas (SP): Universidade de Campinas; 2006.
7. Di Meo C, Stanco G, Cutrignelli MI, Castaldo S, Nizza UM. Physical and chemical quality of ostrich eggs during the laying season. *Br Poultry Sci*. 2003; 33(44): 386-90.
8. Sussi C, Superchi P, Sabbioni A, Zambini EM, Beretti V, Zanon A. Relationship between nutrition and reproductive efficiency in ostrich (*Struthio camelus*): yolk fatty acid content and fertility. *Ann Fac Med Vet*. 2003; 23(1):253-60.
9. Bragagnolo N, Rodriguez-Amaya DB. Determinação de colesterol em carne: comparação de um método colorimétrico e um método por cromatografia líquida de alta eficiência. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2001; 60(1): 53-7.
10. Horbánczuk JO, Sales J, Ziebra G, Reklewski T, Celeda T, Kozaczynski K. Lipid cholesterol content and fatty acid composition of ostrich eggs as influenced by subspecies. *Arch Geflügelkunde*. 1999; 63(5): 234-6.

Use of the real-time polymerase chain reaction in the HTLV-1 and HTLV-2 infections diagnostic testing algorithm

Costa EAS. **Introdução da reação em cadeia da polimerase em tempo real no algoritmo de testes laboratoriais para o diagnóstico de infecção por HTLV-1 e HTLV-2.** São Paulo, SP. 2010. [Dissertação de Mestrado - Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo]. Orientadora: Adele Caterino-de-Araujo.

Taking into account the difficulties in diagnosing the human T-cell lymphotropic virus type 1 and type 2 (HTLV-1 and HTLV-2) in Instituto Adolfo Lutz of São Paulo, the present study was conducted aiming at evaluating the cut-off values of screening enzyme immunoassays (EIAs) and the tests algorithms, emphasizing the use of polymerase chain reaction (PCR) as confirmatory assay. Of 3,271 blood samples routinely analyzed from 1998 to 2010: (a) 2,312 serum samples (1998-2006) were assessed for the best cut-off value by using the receiving operating characteristics analyses (ROC); (b) 313 blood samples (2009) were tested following the algorithm which employs two sequential blood collection, and (c) 73/959 blood samples (2007-2010) showing reactive results on screening testing were employed for comparative analysis of serologic (Western blot - WB) and molecular confirmatory assays [PCR (*tax* and *pol*) and real time PCR (*pol*)]. The PCRs were optimized using the cells lines infected with HTLV-1 (C91-PL) and HTLV-2 (BBF), and the human albumin gene. The ROC analysis showed that an adjustment of the cut-off value in the third generation EIAs increased their specificity in 7.8%. The use of the sequential blood collection algorithm for serological diagnosis was completely inefficient and a unique blood collection in an anticoagulant-containing tube seems to be the most appropriate. The WB confirmatory assay resulted to be more sensitive (90.56%) than the standard PCRs (77.36%) and the real-time PCR (79.25%), probably owing to the low HTLV-1 and HTLV-2 proviral load in asymptomatic carriers' blood. However, the PCRs were able in elucidating the samples with indeterminate WB profile, thereby standing the serologic and molecular assays as complementary tests. In conclusion, because of the low cost, rapidity, reliability and easiness to perform, the real-time PCR could be used as the first confirmatory assay for performing the HTLV-1 and HTLV-2 diagnosis, followed by the WB technique.

Key words. human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1); HTLV-2; enzyme immunoassay (EIA); Western blot (WB); polymerase chain reaction (PCR); real time PCR.

Dissertação disponível na Biblioteca da Coordenadoria de Controle de Doenças
da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.
E-mail: manuavelar@yahoo.com.br

Atividade antioxidante dos extratos de shiitake (*Lentinus edodes*) e de cogumelo do sol (*Agaricus blazei*) aplicados em óleo de soja sob aquecimento

Silva, AC. **Antioxidant activity of shiitake (*Lentinus edodes*) and sun mushroom (*Agaricus blazei*) extracts applied in soybean oil under heating.** São José do Rio Preto, SP. 2010 [Dissertação de Mestrado – Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Biociência, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP São José do Rio Preto]. Orientadora: Prof. Dr^a. Neuza Jorge.

O presente trabalho teve como objetivos: conhecer a atividade antioxidante do shiitake (*Lentinus edodes*) e do cogumelo do sol (*Agaricus blazei*), conforme os métodos DPPH[•] e sistema β -caroteno/ácido linoleico; avaliar a estabilidade oxidativa do óleo de soja adicionado dos extratos que apresentaram maior atividade antioxidante e a influência dos extratos de cogumelos na retenção de tocoferóis em óleo de soja, quando submetido ao teste de estocagem acelerada. Os extratos de cogumelos foram obtidos com solventes de diferentes polaridades, água, metanol:água (1:1), etanol:água (1:1), metanol e etanol e dois tipos de extração, lenta (*shaker*, 3 horas, 120 rpm) e rápida (liquidificador, 30 minutos). Os tratamentos: Controle (óleo de soja sem antioxidantes), TBHQ (óleo de soja + 100 mg/kg de TBHQ), BHT (óleo de soja + 100 mg/kg de BHT), Shiitake (óleo de soja + 3.500 mg/kg de extrato de shiitake) e Cogumelo do sol (óleo de soja + 3.500 mg/kg de extrato de cogumelo do sol) foram preparados e submetidos ao teste de estabilidade oxidativa por meio do Rancimat (100°C, 20L/h) e ao teste de estocagem acelerada em estufa (60°C, 15 dias). As amostras foram recolhidas a cada 3 dias e analisadas quanto ao índice de peróxidos, dienos conjugados e tocoferóis. De acordo com o método DPPH[•], os extratos de shiitake e de cogumelo do sol obtidos na extração rápida, apresentaram atividades antioxidantes máximas de 92,84 e 95,10%, respectivamente. Para o sistema β -caroteno/ácido linoleico, os valores foram 93,06% para o extrato de shiitake e 78,96% para o de cogumelo do sol, ambos em extração lenta. A estabilidade oxidativa do óleo de soja adicionado dos extratos metanólicos da extração lenta de shiitake e de cogumelo do sol apresentou período de indução médio de 19,85 horas. Ao final de 15 dias de aquecimento, os tratamentos TBHQ, Cogumelo do sol e Shiitake apresentaram índices de peróxidos e de dienos conjugados de 6,47, 8,81 e 41,53 meq/kg e 0,37, 0,40 e 0,67%, respectivamente. Os tratamentos TBHQ e Cogumelo do sol contribuíram, também, para a retenção dos tocoferóis totais e seus isômeros no óleo submetido à estocagem acelerada, sendo que ao final de 15 dias de estocagem, o teor de tocoferóis totais para o TBHQ foi de 457,50 mg/kg e para o Cogumelo do sol, 477,20 mg/kg. Os resultados revelaram o shiitake e o cogumelo do sol como potentes antioxidantes para a estabilidade do óleo de soja.

Palavras-chave. cogumelos, antioxidantes, estabilidade oxidativa, estocagem acelerada, tocoferóis, óleo de soja.

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: ac.dasilva@yahoo.com.br

Influência de hábitos maternos na concentração de bifenilos policlorados (PCBs) em soro de cordão umbilical

Mohr, S. **Influence of maternal habits on polychlorinated biphenyls (PCBs) concentration in umbilical cord serum**. Santa Maria, RS. 2010. [Dissertação de Mestrado – Área de Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria – UFSM]. Orientadora: Ijoni Hilda Costabeber. Co-orientador: Roger Wagner.

Os bifenilos policlorados (PCBs) são compostos químicos sintéticos utilizados industrialmente desde a década de 30 como fluidos dielétricos em capacitores e transformadores. A partir de estudos realizados constatou-se o seu efeito tóxico, tornando-se um desafio abolir o seu uso. A principal causa da contaminação humana é a ingestão de alimentos contaminados, em especial, os alimentos de origem animal. O objetivo do presente trabalho foi determinar os níveis de PCBs em soro de cordão umbilical de 148 doadoras que tiveram filhos no Hospital Universitário de Santa Maria no ano de 2006, verificando sua associação com os dados das doadoras e dos recém-nascidos. A determinação dos resíduos de PCBs foi realizada por GC- μ ECD após extração através de hidrólise ácida, seguida de confirmação por GC-MS. Foram encontrados os seguintes valores médios de resíduos: PCB 138 (2,45 ng mL⁻¹) > PCB 52 (1,71 ng mL⁻¹) > PCB 180 (1,49 ng mL⁻¹) > PCB 153 (0,82 ng mL⁻¹) > PCB 28 (0,18 ng mL⁻¹). As concentrações dos PCBs 138 e 180 foram correlacionadas com o baixo desenvolvimento dos recém-nascidos, afetando negativamente o seu comprimento. A alta concentração do PCB 153, no grupo das doadoras que necessitaram de um parto com fórceps, diferiu significativamente dos outros grupos de parto, enquanto as doadoras residentes fora de Santa Maria tiveram maiores concentrações dos PCBs 153 e 180. O grupo de recém-nascidos classificado com baixo peso ao nascimento também obteve concentrações mais altas do PCB 52, com diferença significativa do grupo de bebês com o peso normal. Em relação à presença de malformação nos bebês, houve diferença significativa com as concentrações dos PCBs 28, 52 e 180, as quais foram detectadas em níveis mais elevados no grupo dos bebês malformados. Os resultados do presente estudo demonstram que a presença de PCBs no soro do cordão umbilical, em níveis significativos, pode influenciar negativamente na formação e no desenvolvimento do recém-nascido, resultando no nascimento de um bebê com baixo peso, menor comprimento e com presença de malformação. Assim como o bebê, a mãe também pode sofrer consequências com níveis significativos de PCBs no soro do cordão umbilical, tais como dificuldades no momento do parto. Não foram encontradas referências na literatura sobre a influência de PCBs na malformação de bebês, o que nos leva a deduzir que este seja o primeiro estudo realizado sobre o tema.

Palavras-chave. bifenilos policlorados, hábitos maternos, soro de cordão umbilical, malformação.

Dissertação disponível na Biblioteca do Centro de Ciências Rurais da
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM.
E-mail: susana@viamicro.com.br

Errata

RIAL 69(3), 2010

Página 131

Onde se lê: Maria Lucia Mutagama

Leia-se: Maria Lucia Utagawa

Página 419

Onde se lê: Aceito para publicação: 19.02.2010 - Recebido: 13.08.2010

Leia-se: Recebido: 19.02.2010 - Aceito para publicação: 13.08.2010

■ COLABORADORES

Agradecimentos aos relatores

O Corpo Editorial agradece a todos os relatores abaixo relacionados que, com seu trabalho voluntário e anônimo ao longo de 2010, contribuíram para o bom andamento das atividades e elevação do nível dos artigos publicados pela Revista.

- **Adagmar Andriolo** Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Medicina, Hospital São Paulo, Laboratório Patologia Clínica. São Paulo, SP
- **Adelaide Beleia** Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos. Londrina, PR
- **Adhemar Longatto Filho** Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina. São Paulo, SP
- **Adriano Gomes da Cruz** Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Tecnologia de Alimentos. Campinas, SP
- **Aginaldo Ribeiro Pinto** Universidade Federal de Santa Catarina, Laboratório de Imunologia Aplicada, Departamento de Microbiologia e Parasitologia. Florianópolis, SC
- **Alceu Afonso Jordão Junior** Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Clínica Médica. Ribeirão Preto, SP
- **Alcina Maria Liserre** Instituto de Tecnologia de Alimentos, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios. Campinas SP
- **Alessandra Santos Lopes** Universidade Federal do Pará, Instituto de Tecnologia, Faculdade de Engenharia de Alimentos. Belém, PA
- **Alexandre da Trindade Alfaro** Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus de Francisco Beltrão, Francisco Beltrão, PR
- **Alexandre Tourino Mendonça** Universidade Vale do Rio Verde. Três Corações, MG
- **Almir Carlos Andrade** Universidade Federal do Paraná, Setor Litoral. Matinhos, PR
- **Amanda Latércia Tranches Dias** Universidade Federal de Alfenas, Departamento de Ciências Biomédicas, Laboratório de Microbiologia. Alfenas, MG
- **Ana Carolina Conti e Silva** Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto. São José do Rio Preto, SP
- **Ana Flávia Santos Coelho** Universidade Federal do Tocantins, Laboratório de Microbiologia de Alimentos. Palmas, TO
- **Ana Lucia Barretto Penna** Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos. São José do Rio Preto, SP
- **Ana Lúcia da Silva Correa** Instituto de Tecnologia de Alimentos, Secretaria da Agricultura e do Abastecimento, Centro de Tecnologia de Carnes. Campinas, SP
- **Ana Maria Centola Vidal Martins** Centro Universitário de Rio Preto, Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal, Curso de Medicina Veterinária. São José do Rio Preto, SP
- **Ana Paula Lança Bento** Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ciências Médicas. Ribeirão Preto, SP
- **Anderson de Souza Sant'Ana** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Laboratório de Microbiologia de Alimentos. São Paulo, SP
- **Andreimar Martins Soares** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Departamento de Análises Clínicas Toxicologia e Bromatologia. Ribeirão Preto, SP
- **Ângela Corrêa de Freitas-Almeida** Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Centro Biomédico, Faculdade de Ciências Médicas. Rio de Janeiro, RJ
- **Ângela Faustino Jozala** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. São Paulo, SP
- **Ariene Gimenes Fernandes Van Dender** Instituto de Tecnologia de Alimentos, Secretaria da Agricultura e do Abastecimento do Estado de São Paulo, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Laticínios Tecnol. Campinas, SP
- **Antonio Silvio do Egito Vasconcelos** Embrapa Caprinos, Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos. Sobral, CE
- **Beatriz Thie Iamanaka** Instituto de Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos. Campinas, SP
- **Benedito Correa** Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Microbiologia. São Paulo, SP
- **Bianca Ramos Marins** Fundação Oswaldo Cruz, Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio. Rio de Janeiro, RJ
- **Carla Rosane Barboza Mendonça** Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Ciências Domésticas, Departamento de Ciência dos Alimentos. Pelotas, RS
- **Carlos Prentice Hernández** Universidade Federal do Rio Grande, Laboratório de Tecnologia de Alimentos, Departamento de Química. Rio Grande, RS
- **Carlos Wanderlei Piler Carvalho** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos. Rio de Janeiro, RJ

- **Célia Maria Carvalho Pereira Araujo Romão** Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Rio de Janeiro, RJ
- **Celso Spada** Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas. Florianópolis, SC
- **Cesar Reis** Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Química. Viçosa, MG
- **Christiane Soares Pereira** Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, RJ
- **Cid Aimbire de Moraes** Universidade Federal do Paraná, Departamento de Farmácia. Curitiba, PR
- **Cíntia Guarienti** Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Farroupilha. Santo Augusto, RS
- **Claudete Rodrigues Paula** Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Microbiologia. São Paulo, SP
- **Claudia Lúcia de Oliveira Pinto** Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Centro Tecnológico da Zona da Mata. Viçosa, MG
- **Claudio Dias Timm** Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária. Pelotas, RS
- **Conceição Angelina dos Santos Pereira** Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Nutrição e Saúde. Viçosa, MG
- **Cristiane Gattini Sbampato** Universidade Vale do Rio Verde. Três Corações, MG
- **Cristiane Yumi Koga Ito** Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal. São José dos Campos, SP
- **Cyntia Maria Telles Fadel Picheth** Universidade Federal do Paraná, Laboratório de Bacteriologia Clínica. Curitiba, PR
- **Daniel Granato** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. São Paulo, SP
- **Daniela Helena Pelegrine Guimarães** Universidade de Taubaté. Taubaté, SP
- **Denise Perdomo Azeredo** Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, RJ
- **Dermânio Tadeu Lima Ferreira** Faculdade Assis Gurgacz, Laboratório de Trigo. Cascavel, PR
- **Djalva Maria da Nóbrega Santana** Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos. Seropédica, RJ
- **Edimir Andrade Pereira** Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, PR
- **Eduardo Alexis Lobo Alcayaga** Universidade de Santa Cruz do Sul, Departamento de Biologia. Santa Cruz do Sul, RS
- **Ernani Porto** Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Departamento de Alimentos Agroindústria e Nutrição. Piracicaba, SP
- **Edna Regina Amante** Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Florianópolis, SC
- **Elaine Cristina Pereira De Martinis** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Departamento de Análises Clínicas Toxicologia e Bromatologia. Ribeirão Preto, SP
- **Elaine Cristina Pinto Moreschi** Companhia Industrial e Comercial Brasileira de Produtos Alimentares Nestlé, Nestlé São Paulo, Centro de Garantia da Qualidade. São Paulo, SP
- **Elayse Maria Hachich** Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. São Paulo, SP
- **Eliana Badiale Furlong** Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Departamento de Química, Laboratório de Micotoxinas. Rio Grande, RS
- **Eliana de Fátima Marques de Mesquita** Universidade Federal Fluminense, Faculdade de Veterinária, Laboratório do Pescado. Rio de Janeiro, RJ
- **Eliete Vaz de Faria** Instituto de Tecnologia de Alimentos, Laboratório de Análises Físicas Sensoriais e Estatística. Campinas, SP
- **Elisa Helena Siegel Moecke** Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Florianópolis, SC
- **Elizabeth A. Accioly** Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Nutrição “Josué de Castro”. Rio de Janeiro, RJ
- **Elizabeth de Souza Nascimento** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia. São Paulo, SP
- **Elton Nunes Britto** Coordenação de Pesquisas em Biologia Aquática. Manaus, AM
- **Ernani Porto** Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Departamento de Alimentos Agroindústria e Nutrição. Piracicaba, SP
- **Esmeralda Paranhos dos Santos** Universidade Federal da Paraíba, Centro de Formação de Tecnólogos, Departamento de Tecnologia Rural. Bananeiras, PB
- **Fabiane Cristina Ceruti** Universidade Estadual do Centro-oeste, Departamento de Engenharia Ambiental, Setor de Ciências Agrárias e Ambientais. Irati, PR
- **Fabiano Cleber Bertoldi** Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina, Estação Experimental de Itajaí. Itajaí, SC
- **Fabio Correia Sampaio** Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Odontologia Clínica e Social, Laboratório de Biologia Bucal. João Pessoa, PB

- **Fernando Mauro Pereira Soares** Universidade Federal do Amazonas, Instituto de Saúde e Biotecnologia. Coari, AM
- **Francisca Martins Bion** Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Nutrição. Recife, PE
- **Geni Rodrigues Sampaio** Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Nutrição. São Paulo, SP
- **Gerson Antonio Pianetti** Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Departamento de Produtos Farmacêuticos. Belo Horizonte, MG
- **Gina Maria Bueno Quirino Cardozo** Instituto de Tecnologia de Alimentos, Secretaria de Agricultura e Abastecimento, Unidade Laboratorial de Referência de Análises Físicas Sensoriais e Estatísticas. Campinas, SP
- **Guilherme Prado** Fundação Ezequiel Dias. Belo Horizonte, MG
- **Gutemberg de Melo Rocha** Universidade São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Biologia Celular, Molecular e Bioagentes Patogênicos. Ribeirão Preto, SP
- **Helena Rodrigues Lopes** Universidade Federal Fluminense, Instituto Biomédico, Centro de Ciências Médicas. Niterói, RJ
- **Helenice de Lima Gonzalez** Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Veterinária Preventiva. Pelotas, RS
- **Hércia Stampini Duarte Martino** Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Nutrição e Saúde. Viçosa, MG
- **Irmtraut Araci Hofmann Pfrimer** Universidade Católica de Goiás, Departamento de Ciências Biomédicas, Laboratório de Imunologia. Goiânia, GO
- **Isa Beatriz Noll** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Departamento de Ciências dos Alimentos. Porto Alegre, RS
- **Izildinha Moreno** Instituto de Tecnologia de Alimentos, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Laticínios. Campinas, SP
- **Jane Martha Graton Mikcha** Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências de Saúde. Maringá, PR
- **Jéfferson Malveira Cavalcante** Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia Química. Fortaleza, CE
- **Jerusa Souza Andrade** Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus, AM
- **Jesui Vergilio Visentaine** Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Química, Centro de Ciências de Saúde. Maringá, PR
- **Jesus Nazareno Silva de Souza** Universidade Federal do Pará, Faculdade de Engenharia de Alimentos. Belém, PA
- **João Andrade da Silva** Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Nutrição, João Pessoa, PB
- **João Borges Laurindo** Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos. Florianópolis, SC
- **João Evangelista Fiorini** Universidade José do Rosário Vellano, Instituto de Farmácia e Nutrição, Departamento de Biologia. Alfenas, MG
- **Jorge Mancini Filho** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. São Paulo, SP
- **José Almiro da Paixão** Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde. Recife, PE
- **Juliane Elisa Welke** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Química. Porto Alegre, RS
- **Julliana Izabelle Simionato** Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Itapetinga, BA
- **Karen Signori Pereira** Universidade Federal do Rio de Janeiro, Engenharia de Alimentos, Escola de Química, Centro de Tecnologia, Departamento Engenharia Bioquímica. Rio de Janeiro, RJ
- **Karla Silva Ferreira** Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Laboratório de Tecnologia de Alimentos. Campos dos Goytacazes, RJ
- **Kátia Gianni de Carvalho Lima** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Microbiologia de Alimentos. São Paulo, SP
- **Larissa Lagoa Ribeiro Furtini** Universidade Federal de Lavras, Departamento de Ciência dos Alimentos. Lavras, MG
- **Leonor Almeida de Souza Soares** Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande, RS
- **Lilian Viana Teixeira** Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Departamento de Tecnologia e Inspeção. Belo Horizonte, MG
- **Lívia Melo Villar** Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Hepatites Virais. Rio de Janeiro, RJ
- **Lucia Maria Guedes Diefenbach** Fundação Estadual de Produção e Pesquisa Em Saúde, Laboratório Central de Saúde Pública do RS, Divisão de Análise de Produtos. Porto Alegre, RS
- **Luciana Maria Ramires Esper** Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP
- **Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman** Universidade de São Paulo, Instituto de Medicina Tropical. São Paulo, SP
- **Luisa Patricia Fogarolli de Carvalho** Universidade José do Rosário Vellano, Faculdade de Ciências Médicas Hospital Universitário. Alfenas, MG
- **Luiza Terezinha Madia de Souza** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Virologia. São Paulo, SP
- **Márcia Barreto da Silva Feijó** Universidade Federal Fluminense, Centro de Ciências Médicas, Faculdade de Farmácia. Niterói, RJ
- **Márcia de Mello Luvielmo** Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Ciência dos Alimentos, Campus do Capão do Leão. Pelotas, RS

- **Maricê Nogueira de Oliveira** Universidade de São Paulo. São Paulo, SP
- **Márcia Regina Beux** Universidade Federal do Paraná, Departamento de Patologia Básica, Centro Politécnico, Setor de Ciências Biológicas. Curitiba, PR
- **Marcos dos Santos Lima** Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano. Petrolina, PE
- **Maria Crystina Igarashi** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. São Paulo, SP
- **Maria das Graças de Luna Gomes** Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia. Rio de Janeiro, RJ
- **Maria de Fátima Costa Pires** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Procedimentos Interdisciplinares, Núcleo de Microscopia Eletrônica. São Paulo, SP
- **Maria de Lurdes de Azevedo Rodrigues** Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal. Seropédica, RJ
- **Maria Helena Matte** Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Prática de Saúde Pública. São Paulo, SP
- **Maria Ivone Martins Jacintho Barbosa** Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos. Seropédica RJ
- **Maria José Cavaliere** Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Araraquara, SP
- **Maria José de Carvalho Costa** Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Nutrição. João Pessoa, PB
- **Maria José Moreira Batatinha** Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária, Departamento de Patologia e Clínicas. Salvador, BA
- **Maria Petronilia Oliveira Hellqvist** Laboratório de Ciências do Mar, Laboratório de Macroalgas. Fortaleza, CE
- **Mariangela Tirico Auricchio** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes, Núcleo de Ensaio Físicos e Químicos em Medicamentos. São Paulo, SP
- **Maristela Nascimento Silva** Instituto de Tecnologia de Alimentos, Laboratório de Microbiologia. Campinas, SP
- **Marize Silva de Oliveira** Fundação Ezequiel Dias, Instituto Otávio Magalhães, Divisão de Vigilância Sanitária. Belo Horizonte, MG
- **Michele Hoeltz** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Departamento de Ciências dos Alimentos. Porto Alegre, RS
- **Milton Luiz Pinho Espírito Santo** Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande, RS
- **Moacir Evandro Lage** Universidade Federal de Goiás, Departamento de Medicina Veterinária. Goiânia, GO
- **Nairo Massakazu Sumita** Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Hospital das Clínicas. São Paulo, SP
- **Nancy da Rós** Instituto Butantan. São Paulo, SP
- **Nancy dos Santos Dorna** Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Humanas e Sociais, Departamento de Economia Doméstica. Seropédica, RJ
- **Nelma de Mello Silva Oliveira** Universidade José do Rosário Vellano, UNIFENAS, Laboratório de Biologia e Fisiologia de Microrganismo, Alfenas MG
- **Nélio José de Andrade** Universidade Federal de Viçosa, Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Departamento de Tecnologia de Alimentos. Vicoso, MG
- **Nilcimelly Rodrigues Donato** Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Educação e Saúde. Cuité, PB
- **Obdulio Gomes Miguel** Universidade Federal do Paraná, Departamento de Farmácia, Setor de Ciências da Saúde. Curitiba, PR
- **Paola Cardarelli Leite** Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Departamento de Microbiologia. Rio de Janeiro, RJ
- **Patricia Bortman Rozenchan** Universidade Federal de São Paulo. São Paulo, SP
- **Paula Juliana Antoniazio Zamaro** Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Departamento de Biologia. São José do Rio Preto, SP
- **Paulo Roberto Nogueira de Carvalho** Instituto de Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos (CCQA). Campinas, SP
- **Pedro Paulo Chieffi** Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, Departamento de Ciências Patológicas, Ensino. São Paulo, SP
- **Rafael Noal Moresco** Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. Santa Maria, RS
- **Rafaella de Andrade Mattietto** Embrapa Amazônia Oriental, Embrapa, Laboratório de Agroindústria. Belem, PA
- **Regina Baptista dos Reis** Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Nutrição, Departamento de Alimentos e Nutrição. Cuiabá, MT
- **Regina Celi Araujo Lago** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Agroindústria de Alimentos. Rio de Janeiro, RJ
- **Regina Maura Bueno Franco** Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, SP

- **Renata Fernandes Rabello** Universidade Federal Fluminense. Niterói, RJ
- **Renata Golin Bueno Costa** Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais. Juiz de Fora, MG
- **Ricardo Targino Moreira** Universidade Federal da Paraíba, Centro de Tecnologia, Departamento de Tecnologia Química e de Alimentos. João Pessoa, PB
- **Rinaldo Cardoso dos Santos** Universidade Federal de Ouro Preto, Escola de Nutrição, Departamento de Alimentos. Ouro Preto, MG
- **Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga** Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Nutrição. Laboratório de Bromatologia. João Pessoa, PB
- **Roberta Hilsdorf Piccoli** Universidade Federal de Lavras, Departamento de Ciência dos Alimentos. Lavras, MG
- **Roberto Dimenstein** Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências. Natal, RN
- **Roberto Pontarolo** Universidade Federal do Paraná, Departamento de Farmácia. Curitiba, PR
- **Rosângela Andréa Van Laere Borioli** ZorgSaam de Honte Zeeuws Vlaanderen, Klinisch Laboratorium, Terneuzen, Holanda
- **Sally Müller Affonso Prado** Instituto Butantan, Coordenadoria dos Institutos de Pesquisa, Serviço de Bacteriologia. São Paulo, SP
- **Sandra Garcia** Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, CCA. Londrina, PR
- **Silvana Gonçalves Brito de Arruda** Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória. Vitória de Santo Antão, PE
- **Simone Cristina Marques** Universidade Federal de Lavras, Departamento de Biologia. Lavras, MG
- **Suzana Caetano da Silva Lannes** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. São Paulo, SP
- **Suzete Contrera de Moura Pedro** Prefeitura do Município de São Paulo. São Paulo, SP
- **Suzy Sarzi Oliveira** Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará, Belém, PA
- **Tatiana de Sousa Fiúza** Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas. Goiânia, GO
- **Tatiana Valesca Rodriguez Alicio** Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS
- **Thelma de Filippis** Centro Universitário de Belo Horizonte. Belo Horizonte, MG
- **Vanessa Dias Capriles** Universidade Federal de São Paulo. Santos, SP
- **Vera Bongertz** Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Departamento de Imunologia. Rio de Janeiro, RJ
- **Vanessa Kava-Cordeiro** Universidade Federal do Paraná, Departamento de Genética, Laboratório de Genética de Microrganismos, Setor de Ciências Biológicas. Curitiba, PR
- **Verônica Ortiz Alvarenga** Universidade Federal de Rondônia. Ariquemes, RO
- **Victor Eduardo Arrúa Arias** Centro de Referência da Saúde da Mulher Hospital Pérola Byington, Núcleo de Patologia. São Paulo, SP

Agradecimento especial pela revisão do inglês

Dra. Mirthes Ueda

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

A Revista do Instituto Adolfo Lutz (RIAL), iniciada em 1941, é uma publicação trimestral com a missão de divulgar resultados de investigações científicas relacionadas às ações de promoção à saúde, prevenção e controle de agravos e doenças de interesse em saúde pública, além de incentivar a produção de artigos científicos nas áreas de vigilância epidemiológica e sanitária e de proporcionar a atualização e aprimoramento de profissionais da área em âmbito nacional e internacional.

A RIAL é inter e multidisciplinar, arbitrada, aberta a contribuições de autores nacionais e estrangeiros. Publica prioritariamente pesquisas originais com contribuições relevantes na área laboratorial em saúde pública, realizadas com rigor científico e que possam ser replicadas e generalizadas.

POLÍTICA EDITORIAL

Editada nos formatos impresso e eletrônico, a RIAL tem interesse por trabalhos originais em todas as áreas laboratoriais em saúde pública. São também publicadas outras contribuições inéditas, desde que sobre temas atuais e importantes – revisões de literatura, comunicações breves e notas científicas – além de resumos de teses e dissertações. Os manuscritos devem destinar-se exclusivamente à RIAL, não sendo permitida sua apresentação simultânea a outro periódico. As contribuições podem ser apresentadas em português ou inglês.

Os manuscritos submetidos são analisados inicialmente pelos editores quanto ao atendimento aos padrões da RIAL e às normas para o envio dos originais. Aqueles manuscritos selecionados são encaminhados para avaliação por pares externos de área pertinente, sempre de instituições distintas àquela da origem do manuscrito, sendo garantido o anonimato e a confidencialidade durante todo o processo de avaliação. Após receber os pareceres, o Corpo Editorial, que detém a decisão final sobre a publicação ou não do texto, avalia a aceitação do texto sem modificações, a recusa ou a devolução ao autor com as sugestões apontadas pelos relatores.

Os manuscritos submetidos devem atender à política editorial da RIAL e às Instruções aos Autores, que seguem os *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication* (<http://www.icmje.org>).

Os critérios éticos da pesquisa devem ser respeitados. Os autores devem explicitar em MÉTODOS que a pesquisa foi conduzida dentro dos padrões exigidos pela Declaração de Helsink e aprovada por comissão de ética (CEP) reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) – vinculada ao Conselho Nacional de Saúde (CNS) – bem como registro dos estudos de ensaios clínicos em base de dados, conforme recomendação aos editores da Lilacs e Scielo, disponível em: <http://bvsmodelo.bvsalud.org/site/lilacs/homepage.htm>. O nome da base de dados, sigla e/ou número do ensaio clínico, assim como o número do processo e o nome da comissão de ética que aprovou o projeto, deverão ser colocados ao final do RESUMO. Nos casos de ensaios envolvendo animais, estes deverão atender a Lei Federal 9605 contra crimes ambientais, a Lei Federal 6638/76 e a Lei 11.794/08, que normatiza a utilização de animais em pesquisa científica. Os autores deverão ter em seu poder todos os documentos referentes a este procedimento, que poderão ser solicitados em qualquer momento pelos editores.

Os autores serão responsáveis por reconhecer e revelar conflitos financeiros, de interesse comercial e/ou associativo, relacionados ao material de trabalho ou outros que possam influenciá-los, apresentando uma declaração sobre a existência ou não de tais conflitos. Os relatores também devem revelar aos editores qualquer conflito que possa influir ou impedir as suas avaliações.

Os manuscritos publicados são de propriedade da RIAL. A transferência de direitos autorais será solicitada após a aprovação do manuscrito para publicação.

INFORMAÇÕES GERAIS

Os manuscritos submetidos à publicação na RIAL devem ser apresentados de acordo com as Instruções aos Autores.

São aceitos manuscritos nos idiomas: português e inglês.

O manuscrito deve ser encaminhado em formato eletrônico (e-mail) ou impresso, aos cuidados do editor-chefe da RIAL, no seguinte endereço:

Revista do Instituto Adolfo Lutz (RIAL)

Núcleo de Acervo

Av. Dr. Arnaldo, 355 - Cerqueira César - São Paulo - SP - Brasil - CEP: 01246-902

Ou por meio eletrônico em rial@saude.sp.gov.br

Pormenores sobre os itens exigidos para apresentação do manuscrito estão descritos a seguir.

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.
- As referências bibliográficas, limitadas a 40, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.
- Os resumos em português e em inglês (*abstract*) devem ter até 200 palavras, com a indicação de 3 a 6 palavras-chave (*key words*).

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

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

Informações complementares:

- Devem ter até 25 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.
- As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 03 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas.
- 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 (*key words*).

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.
- As referências bibliográficas, limitadas a 15, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.
- Os resumos em português e em inglês (*abstract*) devem ter até 200 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (*key words*).
- Sua apresentação deve acompanhar as mesmas normas exigidas para artigos originais.

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

Informações complementares:

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

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

Informações complementares:

- Devem ter até 03 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.
- As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 02 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas.
- As referências bibliográficas, limitadas a 10, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.
- Os resumos em português e em inglês (*abstract*) devem ter até 200 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (*key words*).
- Devem apresentar Introdução, Relato de caso, Discussão e Conclusão, na forma de texto único.

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

Informações complementares:

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

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

2.1 PÁGINA DE IDENTIFICAÇÃO: Deve constar:

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

Autores: De acordo com o *International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE)*, são considerados autores aqueles que contribuíram substancialmente para a concepção e planejamento, ou análise e interpretação dos dados; contribuíram significativamente na elaboração do rascunho ou na revisão crítica do conteúdo

e participaram da aprovação da versão final do mesmo. Somente a aquisição de financiamento, a coleta de dados ou supervisão geral de grupos de pesquisa não justificam autoria – maiores esclarecimentos sobre autoria podem ser encontrados na página do ICMJE (<http://www.icmje.org>). Deve constar o nome completo, sem abreviações e com último sobrenome em caixa alta (exemplo: Ana Maria Camargo da SILVA) e o e-mail do autor responsável. O autor responsável para troca de correspondência deve estar assinalado com asterisco (*) e apresentar também o endereço completo.

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

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

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

2.2 PREPARO DO MANUSCRITO:

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

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

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

Estrutura do texto:

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

B) Material e Métodos: Os procedimentos adotados devem ser descritos claramente, bem como as variáveis analisadas, com a respectiva definição, quando necessária, e a hipótese a ser testada. Devem ser descritas a população e a amostra, instrumentos de medida, com a apresentação, se possível, de medidas de validade e conter informações sobre a coleta e processamento de dados. Deve ser incluída a devida referência para os métodos e técnicas empregados, inclusive os métodos estatísticos; métodos novos ou substancialmente modificados devem ser descritos, justificando as razões para seu uso e mencionando suas limitações. Os critérios éticos da pesquisa devem ser respeitados; os autores devem explicitar que a pesquisa foi conduzida dentro de padrões éticos e foi aprovada por comitê de ética, indicando o nome do comitê de ética, número e data do registro.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Exemplos:**Artigos de periódicos:**

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

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

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

Livros:

Ringsven MK, Bond D. *Gerontology and leadership skills for nurses*. 2ª ed. Albany (NY):Delmar Publishers;1996.

Lopez D, organizador. *Estudos epidemiológicos qualitativos*. São Paulo: James Martim; 2009.

Institute of Medicine (US). *Looking at the future of the Medicaid program*. Washington (DC): The Institute; 1992.

Foley KM, Gelband H, editors. *Improving palliative care for cancer*. Washington: National Academy Press 2001 [acesso 2003 Jul 13]. Disponível em: [http://www.nap.edu/catalog.php?record_id=10149].

Capítulos de livro:

Wirdh L. História da Epidemiologia. *In*: Lopez D, organizador. *Estudos epidemiológicos qualitativos*. São Paulo: James Martim; 2009.p.64-76.

Dissertações, teses e monografias:

Santos EP. Estabilidade química da manteiga da terra [dissertação de mestrado]. Bananeiras (PB): Universidade Federal da Paraíba;1995.

Moreschi ECP. Desenvolvimento e validação de métodos cromatográficos e avaliação da estabilidade de vitaminas hidrossolúveis em alimentos [tese de doutorado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2006.

Trabalhos de congressos, simpósios, encontros, seminários e outros:

Barboza et al. Descentralização das políticas públicas em DST/AIDS no Estado de São Paulo. III Encontro do Programa de Pós-Graduação em Infecções e Saúde Pública; agosto de 2004; São Paulo: *Rev Inst Adolfo Lutz*. p. 34 [resumo 32-SC].

Dados eletrônicos:

Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo – SABESP. O que fazemos/Qualidade da água. [acesso 2008 Set 17]. Disponível em: [<http://www.sabesp.com.br/CalandraWeb/CalandraRedirect/?temp=4&proj=sabesp&pub=T&db=&doc>].

Legislação:

Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. *Diário Oficial* [da] República 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*. 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 en 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 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.
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.

ISSN 0073-9855



9 770073 985009