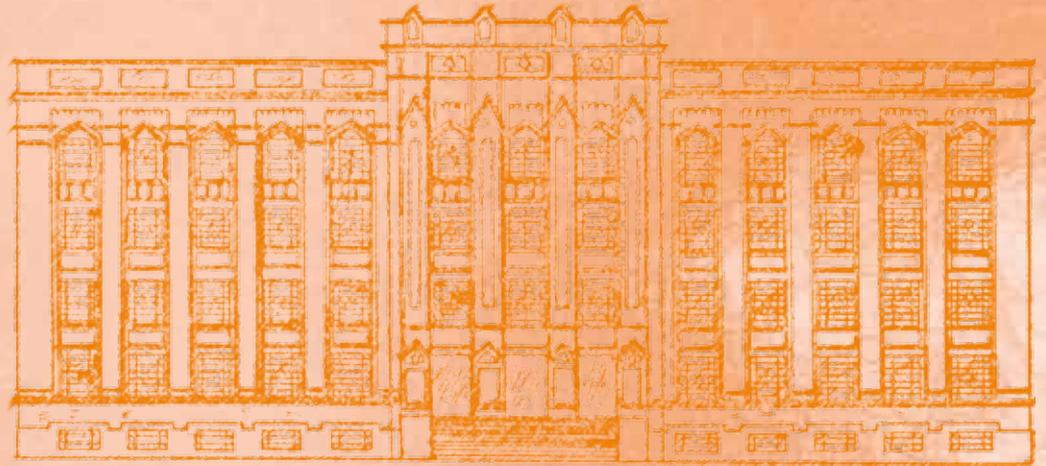


REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

ISSN 0073-9855
RIALA6



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE

Volume 69 número 3, 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 3, 2010
Julho - Setembro 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 Restreppo, 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(3)

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; AGRINDEX; 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

- 1289 Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão**
Microbial biofilms in the food industry: a review
MAÍRA MACIEL MATTOS DE OLIVEIRA, DANILO FLORISVALDO BRUGNERA,
ROBERTA HILSDORF PICCOLI.....277-284

▪ ARTIGOS ORIGINAIS/ORIGINAL ARTICLES

- 1290 Contaminação fúngica em barras de cereais comercializadas**
Fungi contamination in cereal bars commercialized
MARIA MAGALI STELATO, MARIANE MAZZONI CONCON, DANIELA SHIMADA,
SILVANA MARIANA SREBERNICH.....285-290
- 1291 Comparação entre métodos para a análise de coliformes totais e *E. coli* em amostras de água**
Comparison of methods for analysis of total coliforms and *E. coli* in water samples
MARINA CHIARELLI MARQUEZI, CLÁUDIO ROSA GALLO, CARLOS TADEU DOS SANTOS DIAS.....291-296
- 1292 Chemical and bacteriological evaluation of the water and mussels from Santos bay, São Paulo, Brazil**
Avaliação química e bacteriológica na água e mexilhões da baía de Santos, São Paulo, Brasil
LUIZ MIGUEL CASARINI, MARCELO BARBOSA HENRIQUES, ROBERTO GRAÇA-LOPES,
MARCELO RICARDO DE SOUZA.....297-303
- 1293 Qualidade microbiológica e físico-química da polpa e mix de açaí armazenada sob congelamento**
Microbiological quality and physical-chemical characteristics of the frozen pulp and blended açaí
DENISE KAORI ETO, ALINE MIDORI KANO, MARIA TERESA MENDES RIBEIRO BORGES, CAETANO BRUGNARO,
SANDRA REGINA CECCATO-ANTONINI, MARTA REGINA VERRUMA-BERNARDI.....304-310
- 1294 Desempenho de planos de amostragem de 2-classes e de 3-classes para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos**
Performance of two- and three-classes sampling schemes for assessing the food microbiological quality
José Benício Paes CHAVES, Consuelo Domenici ROBERTO, Genilson de PAIVA,
Leandro Dias ARAÚJO.....311-317
- 1295 Avaliação do processo produtivo de polpas de frutas congeladas**
Evaluation of the productive quality for processing the frozen fruit pulps
ESTELA SEBASTIANY, ELIZANILDA RAMALHO DO REGO, MARCOS JOSÉ SALGADO VITAL.....318-326
- 1296 Influência da suplementação proteica sobre a concentração de proteína e imunoglobulina A do leite materno**
Protein supplementation effects on human milk protein and A immunoglobulin concentrations
ELIANA FAGUNDES QUEIROZ BORTOLOZO, LYS MARY BILESKI, ALINE OLIVEIRA COLOMBO,
GUATAÇARA DOS SANTOS JUNIOR.....327-332

-
- 1297 **Caracterização química parcial das Proteínas das Amêndoas da Munguba (*Pachira aquatica Aubl*)**
 Partial Chemical Charaterization of the proteins of the nuts of Munguba (*Pachira aquatica Aubl*)
 BERNADETE DE LOURDES DE ARAÚJO SILVA, PUSHKAR SINGH BORA,
 CLAUDIA CARNEIRO DE AZEVEDO.....333-340
- 1298 **Composition, sensory evaluation and melting properties of caprine ice cream produced with different fat sources**
 Composição, avaliação sensorial e propriedades de derretimento do sorvete de leite de cabra produzido a partir de
 diferentes fontes de gordura
 PRISCILLA DINIZ LIMA DA SILVA, MAGDIELY STEFANES SANTANA VARELA,
 ROBERTA TARGINO PINTO CORREIA.....341-345
- 1299 **Queijo Prato com teor reduzido de gordura adicionado de enzima proteolítica: características físicas e sensoriais**
 Reduced fat Prato cheese added of proteolytic enzyme: physical and sensorial characteristics
 GRAZIELE APARECIDA CHIUCHI GARCIA, ANA LÚCIA BARRETTO PENNA.....346-357
- 1300 **Características físico-químicas e sensoriais de marcas comerciais de queijo mozzarella de leite de búfala**
 Physical-chemical and sensorial characteristics of marketed buffalo mozzarella cheese
 AUGUSTO LUDVIK FILIP MARINO, MARIA TERESA MENDES RIBEIRO BORGES, CAETANO BRUGNARO,
 SOLANGE GUIDOLIN CANNIATTI-BRAZZACA, MARTA HELENA FILLET SPOTO,
 MARTA REGINA VERRUMA-BERNARDI.....358-363
- 1301 **Estudo das características sensoriais e da composição química de queijo de coalho industrializado**
 Sensorial characteristics and chemical composition of manufactured *coalho* cheese
 MARIA EUGÊNIA DE OLIVEIRA MAMEDE, ARÃO CARDOSO VIANA, ADRIANA LUCIA COSTA SOUZA,
 SAYONARA ANDRADE DE OLIVEIRA FARIAS, POLLYANA ALVES DE ARAUJO.....364-370
- 1302 **Efeito da remoção de fenilalanina sobre o perfil peptídico de hidrolisados proteicos da farinha de trigo**
 Phenylalanine removal effect on the peptide profile of hydrolyzed protein from wheat flour
 RAQUEL LINHARES CARREIRA, VIVIANE DIAS MEDEIROS SILVA, MAURO RAMALHO SILVA, HARRIMAN ALEY MORAIS,
 MARIALICE PINTO COELHO SILVESTRE.....371-378
- 1303 **Avaliação físico-química e aceitação sensorial de biscoitos tipo *cookies* elaborados com farinha de resíduos de acerola**
 Physical-chemical and sensory characteristics of cookies formulated with acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) residues flour
 ANA CAROLINA MOURA DE SENA AQUINO, RAISA SOARES MÔES, KARINA MAGNA MACENA LEÃO,
 ANA VIRGINIA DANTAS FIGUEIREDO, ALESSANDRA ALMEIDA CASTRO.....379-386
- 1304 **Polpa de açaí congelada: características nutricionais, físico-químicas, microscópicas e avaliação da rotulagem**
 Frozen açaí pulp. Study on the nutritional and physical-chemical characteristics, and microscopic and product labelling analyses
 BRISA MARIA FREGONESI, CRISTINA EICO YOKOSAWA, ISAURA AKEMI OKADA, GISELE MASSAFERA,
 TELMA MARIA BRAGA COSTA, SONIA DE PAULA TOLEDO PRADO.....387-395
- 1305 **Composição química de misturas de farinhas de banana verde com castanha-do-brasil**
 Chemical composition of mixtures with green banana and nut Brazil flours
 MARLENE JARDIM MEDEIROS, PALMIRA ANTONIA ALVES CRUZ DE OLIVEIRA, JOANA MARIA LEITE DE SOUZA,
 REGINALDO FERREIRA DA SILVA, MARIA LUZENIRA DE SOUZA.....396-402
- 1306 **Atividade antifúngica do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* sobre leveduras isoladas de candidíase bucal em gestantes HIV positivas**
 Antifungal activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil on yeasts isolated from HIV positive pregnant women with oral candidiasis
 ANNA CAROLINA BORGES PEREIRA DA COSTA, GUILHERME RODRIGUES TEODORO, TATIANE MORAIS FERREIRA,
 FERNANDO DE SÁ SILVA, AGUIDA MARIA, SÔNIA KHOURI.....403-407

1307	Avaliação do controle da qualidade realizado nos produtos vacinais para sarampo, caxumba, rubéola utilizados no Programa Nacional de Imunizações do Brasil no período de 1999 a 2007 Evaluation of the quality control data records for the measles, mumps, rubella vaccine products used in the Brazilian National Immunization Program in the period from 1999 to 2007 EDUARDO JORGE RABELO NETTO, EDUARDO CHAVES LEAL, ISABELLA FERNANDES DELGADO, KATIA CHRISTINA LEANDRO.....	408-414
 ▪ COMUNICAÇÃO BREVE/BRIEF COMMUNICATION		
1308	Quantificação do retinol em leite de cabra e sua importância na alimentação infantil Determining the retinol contents in goat milk and its nutritious value in the infant feeding ROBERTO DIMENSTEIN, CIRO UCHÔA DE MELO, LÍGIA REJANE SIQUEIRA GARCIA, LARISSA QUEIROZ DE LIRA.....	415-418
1309	Estudo da toxicidade <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> em produtos de papel para fins sanitários e sua avaliação microbiológica Study the toxicity <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> in papers with sanitary purposes and microbiological quality assessment LÍGIA LURIKO MIYAMARU, MARIA CRISTINA SANTA BÁRBARA, ADRIANA BUGNO, ADRIANA APARECIDA BUZZO ALMODOVAR, TATIANA CALDAS PEREIRA, ÁUREA SILVEIRA CRUZ, TAMIKO ICHIKAWA IKEDA, REZOLINA PEREIRA DOS SANTOS.....	419-422
1310	Avaliação de rotulagem nutricional, composição centesimal e teores de sódio e potássio em batatas-palha Centesimal composition, mineral contents and nutritional labeling in matchstick potatoes HAYLA FÉLIX RODRIGUES, LUIZ FERNANDO MIRANDA DA SILVA, KARLA SILVA FERREIRA, FERNANDA DOS SANTOS NOGUEIRA.....	423-427
1311	Histórico e aspectos tecnológicos do processamento da linguiça <i>cuiabana</i> Historical and technological aspects of the <i>cuiabana</i> sausage manufacturing procedure CATHARINA CALOCHI PIRES DE CARVALHO, FRANCISCO LOPES FILHO, FERNANDO LEITE HOFFMANN, PEDRO FERNANDO ROMANELLI.....	428-433
▪ INSTRUÇÕES AOS AUTORES.....		434

Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão

Microbial biofilms in the food industry: a review

RIALA6/1289

Maíra Maciel Mattos de OLIVEIRA^{1*}, Danilo Florisvaldo BRUGNERA¹, Roberta Hilsdorf PICCOLI¹

*Endereço para correspondência: ¹Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000, Lavras, MG, Brasil, Tel.: 35 3829 1392. E-mail: mmacielmattos@yahoo.com.br

Recebido: 07.09.2009 – Aceito para publicação: 28.06.2010

RESUMO

Biofilmes podem ser definidos como comunidades microbianas envoltas por uma matriz de polímeros extracelulares e aderidas a superfícies. Na indústria de alimentos, os microrganismos podem se aderir a resíduos orgânicos e inorgânicos presentes na superfície de equipamentos e utensílios, caso o processo de higienização seja aplicado incorretamente. Células sésseis, presentes no biofilme, além de reduzir a eficiência e vida útil de equipamentos, em função do fenômeno denominado corrosão microbiologicamente induzida, são mais resistentes ao processo de desinfecção. As células podem se desprender e contaminar os alimentos que passam pelo local, que causam prejuízos econômicos e risco de ocorrência de toxinfecções alimentares. A compreensão do conceito de biofilmes microbianos e de aspectos inerentes a sua estrutura e composição, bem como de seu processo de formação, são fundamentais para efetuar o desenvolvimento de estratégias de controle efetivas e entendimento do risco que estes representam para as indústrias de alimentos. Na presente revisão bibliográfica, estão descritos os principais aspectos de biofilmes microbianos de importância na indústria de alimentos: i) definição, estrutura e composição; ii) etapas envolvidas na formação; iii) mecanismos de resistência a antimicrobianos; iv) riscos; v) microrganismos envolvidos; vi) importância da higienização como ferramenta de controle.

Palavras-chave. aderência bacteriana, contaminação de alimentos, higiene.

ABSTRACT

Bacterial biofilms are defined as microbial communities surrounded by an extracellular matrix of polymers and adhered to surfaces. In food industry, the microorganisms can adhere to organic and inorganic waste occurring on the equipment and utensils surfaces, if the cleaning and sanitization procedures are done incorrectly. The presence of sessile cells in the biofilm reduces the efficiency and durability of equipments through the phenomenon called microbiologically induced corrosion. Additionally, they show much greater resistance to the sanitization process; the cells can be loosen and contaminate foods that pass through the place, causing economic losses and risk of occurrence of foodborne diseases. Understanding the concept, the structure and composition inherent aspects, and also the producing process of microbial biofilms, are fundamental for establishing effective control strategies and being assured on the risks that they represent to the food industry. This article reviews the crucial aspects concerned with microbial biofilms in the food industry i) definition, structure and composition; ii) steps involved in the formation; iii) mechanisms of resistance to antimicrobials; iv) risks; v) involved microorganisms; and vi) importance of hygienization as a control strategy.

Key words. microbial adhesion, food contamination, hygienization.

INTRODUÇÃO

O termo biofilme surgiu para descrever a forma de vida microbiana sésil, caracterizada pela adesão de microrganismos a suportes sólidos, com consequente produção de substâncias poliméricas extracelulares, constituindo uma rede gelatinosa que imobiliza e protege as células. A formação de biofilmes provoca alterações fenotípicas das células planctônicas, que podem ser descritas como estratégias de sobrevivência dos microrganismos em ambientes com condições adversas¹.

A presença de biofilmes em áreas de processamento de alimentos é caracterizada, inicialmente, pelo acúmulo de materiais orgânicos e inorgânicos em superfícies, sobre as quais comunidades bacterianas podem se desenvolver. Biofilmes podem se tornar fortemente aderidos à superfície e, posteriormente, partes deles podem se desprender e contaminar outras superfícies ou produtos alimentícios². Microrganismos em biofilme são mais resistentes a agentes antimicrobianos do que células em estado planctônico, podendo persistir e sobreviver mesmo após processos de sanitização, representando fonte original de contaminação de alimentos, com consequentes perdas econômicas e veiculação de toxinfecções alimentares³.

Para fornecer ao consumidor um produto seguro, além de controlar a presença de microrganismos em alimentos, é essencial verificar e monitorar as condições higiênico-sanitárias de equipamentos e utensílios utilizados no processamento. Assim, é necessário um programa efetivo de limpeza e sanitização para inativar microrganismos e prevenir o acúmulo de células microbianas ou biofilmes nas superfícies⁴.

O objetivo desta revisão bibliográfica é descrever os principais aspectos, de importância na indústria de alimentos, relacionados a biofilmes microbianos: i) definição, estrutura e composição; ii) etapas envolvidas na formação; iii) mecanismos de resistência a antimicrobianos; iv) riscos; v) microrganismos envolvidos; e vi) importância da higienização como ferramenta de controle.

Biofilmes microbianos: conceito, estrutura e composição

Biofilmes podem ser definidos como formas de existência microbiana espacial e metabolicamente estruturadas em comunidades embebidas nas matrizes de substâncias poliméricas extracelulares e aderidas a superfícies bióticas ou abióticas⁵.

Em ambientes naturais, 95% a 99% dos microrganismos existem na forma de biofilmes, que podem ser encontrados em quase todos os substratos que possuam nível de umidade suficiente para suportar seu crescimento⁵. Desta forma, a forma de vida bacteriana livre ou planctônica pode ser observada, simplesmente, como um mecanismo de translocação entre superfícies⁶.

Biofilmes microbianos podem existir como agregados mais ou menos confluentes, em camadas únicas ou arquiteturas tridimensionais. Quando constituídos por várias camadas de células, apresentam canais que permitem o fluxo de líquido e gases, a dispersão de nutrientes e o descarte de componentes⁷.

No que diz respeito à composição, observa-se que água é a fração mais significativa, podendo chegar a 97% da matriz do biofilme. Os microrganismos, por sua vez, representam somente pequena parte, frequentemente 2 a 5% da matriz do biofilme, embora excretem substâncias poliméricas que predominam na matéria orgânica da massa seca do biofilme. A matriz de substâncias poliméricas extracelulares de origem microbiana é responsável pela morfologia, estrutura, coesão e integridade funcional do biofilme. Ainda que haja a predominância de polissacarídeos em sua composição, esta também pode ser constituída por proteínas, como glicoproteínas, fosfolipídios e ácidos nucleicos⁸.

Etapas envolvidas no processo de formação de biofilmes microbianos

A formação de biofilmes inicia-se com a adsorção de moléculas orgânicas ou inorgânicas à superfície, formando o filme condicionante. Em instalações de indústrias alimentícias, resíduos proteicos, lipídicos e de carboidratos, oriundos de produtos derivados do leite ou de carnes, são elementos importantes para formar a camada condicionante⁶. Esses resíduos, aderidos aos equipamentos e utensílios, em razão de falhas no procedimento de higienização, são fontes potenciais de contaminação.

A fixação de células livres provenientes do meio líquido nas superfícies sólidas ocorre em seguida, poucos minutos após o transporte e adsorção de substâncias orgânicas e inorgânicas dissolvidas no meio aquoso.

Microrganismos, em seu estilo de vida planctônico, recebem algum estímulo que os leva a aderir em alguma superfície. Embora esse processo

necessite de maior elucidação, alguns fatores passíveis de influenciá-lo já são descritos: pH, concentração e biodisponibilidade de nutrientes, autoindutores de *quorum sensing*, presença de compostos orgânicos, inorgânicos e temperatura⁹.

Propriedades da superfície da célula, como presença de flagelo, fímbrias, pili, proteínas adesinas, lipopolissacarídeos, ácido lipoteicoico e cápsula, influenciam na aderência à superfície¹⁰, que ocorre em dois estágios: adesão reversível seguida por adesão irreversível¹¹.

A adesão reversível se dá pela interação inicial fraca da bactéria com o substrato. Isso envolve forças de atração de Van der Waals, forças eletrostáticas e forças de interações hidrofóbicas. Durante a adesão reversível, bactérias ainda exibem movimentos Brownianos e são facilmente removidas pela aplicação de forças mínimas⁶.

A adesão irreversível resulta do ancoramento de apêndices (pili, flagelo, proteínas adesina) e/ou da produção de substâncias poliméricas extracelulares, fazendo com que as ligações entre as células e a superfície se fortaleçam¹². A união entre apêndices da bactéria e o substrato envolve interações dipolo-dipolo, pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas, ligações covalentes e iônicas. Essa união geralmente ocorre com poucas horas de contato. Vários estudos indicam que a adesão irreversível das células pode começar após 20 minutos de contato variando no máximo até 4 horas a 4-20°C^{13,14}. A remoção de células aderidas irreversivelmente é difícil e requer aplicação de forte força mecânica ou interrupção química da força de aderência pela aplicação de enzimas, detergentes, surfactantes, sanitizantes ou calor¹⁵. No entanto, de acordo com Oliveira et al¹⁶, há uma elevada probabilidade de que as células aderidas irreversivelmente permaneçam mesmo após a higienização, sendo essa uma das principais razões para a formação de biofilmes em superfícies que entram em contato com alimentos.

Após multiplicação das bactérias presentes na estrutura do biofilme, formando microcolônias envoltas pela matriz de polímeros extracelulares¹⁷, pode ocorrer, dentro de dias ou meses, a adesão de outros microrganismos presentes no meio aquoso circundante, denominados colonizadores secundários¹².

A formação do biofilme maduro ocorre de 3 a 6 dias após a adesão inicial, podendo chegar a 10 dias¹⁸. A maturidade acontece, principalmente, por meio do aumento da densidade populacional e, também,

pela pronunciada produção e deposição de polímeros extracelulares, aumentando a espessura do biofilme¹⁹.

Com o aumento da população microbiana, o ambiente torna-se anaeróbio no interior do biofilme, provocando aumento da concentração de ácidos e gases insolúveis, que enfraquecem a estrutura, causando o desprendimento de células únicas ou de fragmentos¹⁰, situação que pode ocorrer após 9 a 12 dias dos eventos iniciais²⁰. No momento em que o biofilme atinge massa denominada crítica, o equilíbrio dinâmico é alcançado e a camada microbiana mais externa de sua estrutura inicia a produção de células bacterianas planctônicas²¹. O desprendimento também pode ser reflexo do fluxo do meio aquoso que passa pelo local.

Todavia, ainda que o biofilme não tenha atingido uma massa denominada crítica ou se desenvolvido completamente, microrganismos viáveis aderidos à superfície irão apresentar a habilidade de se desprender mesmo que o número de células presentes seja baixo ou variado dentro de determinada área. Esse fenômeno é denominado potencial de biotransferência e pode ser definido como a habilidade que o microrganismo presente na superfície do equipamento, antes ou após o procedimento de higienização, possui de contaminar produtos alimentícios durante o processamento²².

A contaminação de alimentos por células microbianas sésseis já foi demonstrada em diversos estudos. Recentemente, Salustiano et al²³ avaliaram a recontaminação pós-pasteurização do leite por *Bacillus cereus* utilizando ribotipagem automática. Sete ribogrupos foram identificados e um mesmo ribogrupo foi isolado de quatro superfícies e de amostras de leite, indicando que as superfícies são reservatórios desta espécie. Ravishankar et al²⁴, estudando a ocorrência de contaminação cruzada, demonstraram que *Salmonella enterica* serovar Newport, presente em carne de frango, foi capaz de contaminar a faca de aço inoxidável e a tabua de corte de polietileno, sendo, em seguida, transferida para folhas de alface. A taxa de transferência da bactéria foi maior quando nenhum tratamento de higienização foi aplicado aos utensílios.

Tanto o desprendimento de células ou agregados celulares da estrutura do biofilme, como o desenvolvimento primário e a maturação, são dependentes da densidade populacional e modulação da expressão gênica, controlados por moléculas sinalizadoras, processo este denominado *quorum*

sensing. Bactérias Gram-negativas tipicamente produzem N-acil-homoserinas lactonas (AHLs) e Gram-positivas oligopeptídeos. A concentração externa destas moléculas autoindutoras aumenta em função de elevações na densidade populacional bacteriana. Bactérias são capazes de detectar a acumulação de limiares mínimos de estimulação desses autoindutores, alterando sua expressão gênica e, por conseguinte, seu comportamento. Pela utilização desse sistema de sinalização bactérias sincronizam comportamentos particulares em escala populacional, agindo como organismos multicelulares²⁵.

Hammer e Bassler²⁶ observaram que o sistema *quorum sensing* controla a síntese de exopolissacarídeos em *Vibrio cholerae*. Já Labbate et al²⁷ relatam que o *quorum sensing* controla a agregação de células na formação do biofilme por *Serratia liquefaciens*.

Mecanismos de resistência de biofilmes a agentes antimicrobianos

Mecanismos de resistência proporcionam as células sésseis condições favoráveis de sobrevivência, o que as torna menos suscetíveis à erradicação quando comparadas aos mesmos microrganismos sob a forma planctônica²⁸.

Vários fatores têm sido sugeridos para explicar a resistência de biofilmes a agente antimicrobianos: bactérias em biofilmes, particularmente aquelas presentes nas camadas mais internas, apresentam reduzidas taxas metabólicas e de crescimento; a matriz de polímeros extracelulares age como um adsorvente, reduzindo a quantidade de antimicrobiano disponível para interagir com as células do biofilme; adicionalmente, a matriz de substâncias poliméricas extracelulares pode reduzir fisicamente a penetração do agente antimicrobiano; e células em biofilme são fisiologicamente distintas de células planctônicas e expressam fatores de proteção específicos, tais como bombas de efluxo e regulons²⁹.

Além de limitar a difusão de sanitizantes, a matriz de exopolissacarídeos pode reagir e causar a inativação dos mesmos³⁰, pois sabe-se que alguns sanitizantes químicos podem ter sua ação reduzida ou mesmo eliminada na presença de compostos orgânicos, como proteínas, polissacarídeos e lipídeos. Um exemplo é o hipoclorito de sódio (NaClO), muito utilizado em indústrias de alimentos, especialmente em laticínios.

A aplicação incorreta de detergentes e sanitizantes pode também ser responsável pela aquisição da resistência. Segundo Gilbert et al²⁹, isso está relacionado à utilização de doses subletais de agentes biocidas aplicadas em células em biofilmes.

A densidade bacteriana no interior do biofilme é outro fator que parece estar envolvido no aumento da resistência. Além disso, biofilmes formados por diferentes espécies, como os que são encontrados nas indústrias de alimentos, representam um maior risco, uma vez que estas podem proteger umas às outras durante a aplicação de agentes químicos. Esse fato é causado pela diferente resistência de uma respectiva espécie microbiana contra os agentes utilizados³⁰.

Impactos causados pela presença de biofilmes microbianos na indústria de alimentos

Uma vez instalados, biofilmes microbianos agem como camadas isolantes e ocasionam o processo denominado corrosão microbiologicamente induzida³¹, prejudicando a transferência de calor entre superfícies e reduzindo a vida útil dos equipamentos. Em consequência, há perdas de energia e despesas acrescidas de manutenção pela substituição de peças dos equipamentos precocemente deterioradas, bem como diminuição da qualidade dos produtos.

No que se refere aos aspectos microbiológicos, sabe-se que, caso não haja implantação de sistemas de qualidade nas indústrias alimentícias e aplicação efetiva de agentes de limpeza e sanitizantes, microrganismos podem não ser completamente removidos das superfícies e instalações que entram em contato com os alimentos. A retenção e acúmulo de resíduos e microrganismos em tais ambientes contribuirão para o desenvolvimento de biofilmes. A adesão a superfícies pode ser realizada por microrganismos deteriorantes ou patogênicos, resultando em sérios problemas de saúde pública ou de ordem econômica.

Microrganismos envolvidos no processo de adesão e formação de biofilmes

Biofilmes podem ser formados por quase todos os tipos de microrganismos sob condições favoráveis. Entretanto, nas indústrias de alimentos são as bactérias que mais frequentemente produzem biofilmes, ainda que umas apresentem maior aptidão que outras.

Dentre as bactérias deteriorantes, destacam-se: *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas fluorescens*, *Micrococcus* sp. e *Enterococcus faecium*^{32,33}. Como exemplos de bactérias patogênicas, encontram-se: *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* O157:H7, *S. aureus* e *B. cereus*^{32,34,35}.

A investigação da composição microbiana de biofilmes, presentes em indústrias de alimentos, tem sido realizada em diversos estudos. Esses estudos revelam que os biofilmes formados são constituídos por várias espécies de microrganismos, as quais podem variar dependendo, principalmente, dos fatores intrínsecos e extrínsecos do ambiente em que se encontram. Marouani-Gadri et al³⁶, avaliando as superfícies de uma indústria de processamento de carnes, encontraram bactérias pertencentes a diversos gêneros, como *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Aeromonas* e *Pseudomonas*. Timke et al³⁷ pesquisaram os microrganismos presentes no biofilme formado em uma planta de processamento de cervejas engarrafadas e encontraram bactérias pertencentes aos gêneros *Methylobacterium*, *Paracoccus*, *Acinetobacter*, *Enhydrobacter*, *Luteimonas*, *Stenotrophomonas*, *Pseudoxanthomonas*, *Xanthomonas* e *Citrobacter*, dentre outros.

Contudo, além da determinação das espécies existentes, o número de microrganismos presentes na superfície também é um parâmetro importante, capaz de determinar se há a formação de biofilme maduro ou somente adesão bacteriana. Segundo Andrade et al³³, para se considerar um biofilme, é necessário um número mínimo de 10^7 UFC/cm², enquanto Ronner e Wong³⁸ e Wirtanen et al³⁹ consideram como biofilme um número de células aderidas de 10^5 e 10^3 UFC/cm², respectivamente. Entretanto, é necessário salientar que, mesmo que o número de células microbianas aderidas à superfície esteja abaixo do necessário para se considerar a formação de um biofilme maduro, já existe o risco de contaminação microbiológica do alimento a partir de microrganismos sésseis presentes na superfície.

Importância da higienização no controle de biofilmes microbianos na indústria de alimentos

Nas indústrias de alimentos, a higienização é dividida em duas etapas muito bem definidas: limpeza e

sanitização. A limpeza tem como objetivo a remoção de resíduos orgânicos e inorgânicos aderidos às superfícies, constituídos principalmente por proteínas, carboidratos, gorduras e sais minerais⁴⁰. Após a limpeza, o número de microrganismos sobreviventes ainda é elevado, o que faz da sanitização procedimento obrigatório.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da portaria nº 15, de 23 de Agosto de 1988, define sanitizantes ou desinfetantes como formulações que têm na sua composição substâncias microbicidas que apresentam efeito letal sobre microrganismos não esporulados. Os sanitizantes mais utilizados em superfícies de equipamentos e utensílios nas indústrias alimentícias brasileiras são aqueles que possuem princípios ativos dos grupos: quaternários de amônio, compostos inorgânicos liberadores de cloro ativo, compostos orgânicos liberadores de cloro ativo, compostos à base de ácido peracético, iodo e derivados⁴¹. A escolha do agente sanitizante depende, principalmente, do tipo de microrganismo a ser destruído, assim como da natureza do equipamento a ser sanitizado.

Os sanitizantes utilizados nas indústrias dentro das condições indicadas pelos fabricantes são aprovados em testes como os de suspensão e diluição de uso, pesquisas que utilizam bactérias planctônicas⁴. Em contrapartida, existem algumas recomendações a sanitização de superfícies industriais que levam em consideração o número de células microbianas aderidas dentro de uma determinada área. Essas exigências são mais válidas do que testes em suspensão por se referirem as células microbianas no estado sésseis. Para a *American Public Health Association* (APHA)⁴², agentes sanitizantes devem eliminar as bactérias patogênicas e reduzir o número de microrganismos deteriorantes em níveis aceitáveis, como, por exemplo, 2 UFC/cm² de microrganismos aeróbios mesófilos para superfícies de aço inoxidável ao fim do processo de higienização. Segundo Andrade et al⁴³, muitas vezes a recomendação americana é considerada rígida para as condições brasileiras e, por isso, alguns pesquisadores e algumas instituições admitem contagens de até 50 UFC/cm² de superfície.

Inúmeras pesquisas, baseadas na redução do número de microrganismos aderidos a superfície após tratamento com sanitizantes químicos, têm sido realizadas. Rossoni e Gayllarde⁴⁴ observaram redução do número de células de *P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. aureus*, aderidas sobre superfície de aço inoxidável,

após tratamento com hipoclorito de sódio. Cabeça et al⁴⁵ verificaram redução do número de células de *L. monocytogenes*, aderidas sobre superfície de aço inoxidável, após tratamento com diferentes sanitizantes (iodo, biguanida, compostos quaternários de amônio, ácido peracético e hipoclorito de sódio).

Neste contexto, alternativas não convencionais de sanitização ou até mesmo novas ferramentas de controle de biofilmes também vêm sendo estudadas, tais como: ruptura da matrix de substâncias poliméricas extracelulares pela ação de enzimas⁴⁶, adsorção de um biossurfactante aniônico a superfícies para auxiliar a sanitização por agentes químicos⁴⁷, aplicação de irradiação gama⁴⁸, óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon nardus*⁴⁹ e nisina⁵⁰.

De maneira geral, para que as recomendações de qualidade microbiológica sejam alcançadas, a adoção de efetivos programas de limpeza e sanitização, bem como a utilização de matéria-prima de qualidade e a adoção de práticas higiênico-sanitárias por parte dos colaboradores, são fundamentais. Para tanto, a aplicação de ferramentas de controle de qualidade é imprescindível. As Boas Práticas de Fabricação (BPF) e os Procedimentos Padrão de Higiene Operacional (PPHO), que são pré-requisitos do sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), abordam, dentre outros, os princípios básicos de higiene industrial, como: higiene de instalações, de equipamentos e de utensílios utilizados no preparo de alimentos. As BPF e os PPHO são os requisitos mínimos para a obtenção de alimentos seguros e devem ser utilizadas por todas as indústrias alimentícias que desejam produzir alimentos com esta característica.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O controle de biofilmes microbianos é de grande importância para a indústria de alimentos, uma vez que estes podem causar prejuízos econômicos ou problemas de saúde pública. Dessa forma, a compreensão do conceito de biofilmes microbianos e de aspectos inerentes a sua estrutura e composição, bem como de seu processo de formação, são fundamentais para o desenvolvimento de estratégias de controle efetivas e entendimento do risco que estes representam as indústrias de alimentos. No que diz respeito a essas estratégias de controle, a utilização de um processo de higienização eficiente, que abranja

corretamente as etapas de limpeza e sanitização, é fundamental. Para isso, a adoção de ferramentas de controle de qualidade é imprescindível.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos da primeira autora, que possibilitou a realização do mestrado. A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999; 284 (5418): 1318-22.
2. Joseph B, Otta SK, Karunasagar I, Karunasagar I. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *Int J Food Microbiol*. 2001; 64 (3): 367-72.
3. Chavant P, Gaillard-Martinie B, Talon R, Hébraud M, Bernardi T. A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. *J Microbiol Methods*. 2007; 68 (3): 605-12.
4. Peng JS, Tsai WC, Chou CC. Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. *Int J Food Microbiol*. 2002; 77 (1/2): 11-8.
5. Nikolaev YA, Plakunov VK. Biofilm - "city of microbes" or an analogue of multicellular organisms? *Mikrobiologija*. 2007; 76 (2): 149-63.
6. Watnick P, Kolter R. Minireview: biofilm, city of microbes. *J Bacteriol*. 2000; 182 (10): 2675-9.
7. Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol*. 2002; 56: 187-209.
8. Sutherland IW. The biofilm matrix - an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol*. 2001; 9 (5): 222-7.
9. Oulahal N, Brice W, Martial A, Degraeve P. Quantitative analysis of survival of *Staphylococcus aureus* or *Listeria innocua* on two types of surfaces: polypropylene and stainless steel in contact with three different dairy products. *Food Control*. 2008; 19 (2): 178-85.

10. Trachoo N. Biofilms and the food industry. *Songklanakarin J Sci and Technol*. 2003; 25 (6): 807-15.
11. Mittelman MW. Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. *J Dairy Sci*. 1998; 81(10): 2760-4.
12. Christensen BE, Characklis WG. Physical and chemical properties of biofilms. In: Characklis WG, Marshall KC, editores. *Biofilms*. New York: John Wiley and Sons, Inc.; 1990. p. 93-130.
13. Hood SK, Zottola EA. Biofilms in food processing. *Food Control*. 1995; 6 (1): 9-18.
14. Smoot LM, Pierson MD. Effect of environmental stress on the ability of *Listeria monocytogenes* Scott A to attach to food contact surfaces. *J Food Prot*. 1998; 61 (10): 1293-8.
15. Sinde E, Carballo J. Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food Microbiol*. 2000; 17 (4): 439-47.
16. Oliveira MMM de, Brugnera DF, Alves E, Piccoli RH. Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface and biotransfer potential. *Braz J Microbiol*. 2010; 41 (1): 97-106.
17. Malone JA, Caldwell DE. Evaluation of surface colonization kinetics in continuous culture. *Microb Ecol*. 1983; 9 (4): 299-305.
18. Heydorn A, Nielsen AT, Hentzer M, Sternberg C, Givskov M, Ersbøll BK et al. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology*. 2000; 146 (10): 2395-407.
19. Cheng G, Zhang Z, Chen S, Bryers JD, Jiang S. Inhibition of bacterial adhesion and biofilm formation on zwitterionic surfaces. *Biomaterials*. 2007; 28 (29): 4192-9.
20. Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, Davies DG. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol*. 2002; 184 (4): 1140-54.
21. Prosser BL, Taylor D, Dix BA, Cleeland R. Method of evaluating effects of antibiotics on bacterial biofilm. *Antimicrob Agents Chemother*. 1987; 31 (10): 1502-6.
22. Verran J. Biofouling in food processing: biofilm or biotransfer potential? *Food Bioprod Process*. 2002; 80 (4): 292-8.
23. Salustiano VC, Andrade NJ, Soares NFF, Lima JC, Bernardes PC, Luiz LMP, Fernandes PE. Contamination of milk with *Bacillus cereus* by post-pasteurization surface exposure as evaluated by automated ribotyping. *Food Control*. 2009; 20 (4): 439-42.
24. Ravishankar S, Zhu L, Jaroni D. Assessing the cross contamination and transfer rates of *Salmonella enterica* from chicken to lettuce under different food-handling scenarios. *Food Microbiol*. 2010; 27 (6): 791-4.
25. Waters CM, Bassler BL. Quorum Sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2005; 21: 319-46.
26. Hammer BK, Bassler BL. Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol*. 2003; 50 (1): 101-4.
27. Labbate M, Queck SY, Koh KS, Rice SA, Givskov M, Kjelleberg S. Quorum Sensing-Controlled Biofilm Development in *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol*. 2004; 186 (3): 692-8.
28. Morck DW, Olson ME, Ceri H. Microbial Biofilms: preservation, control and removal. In: Block, SS, editor. *Disinfection, Sterilization and Preservation*. Lippincott: Williams & Wilkins; 2001. p. 675-681.
29. Gilbert P, Allison DG, McBain AJ. Biofilms *in vitro* and *in vivo*: do singular mechanisms imply cross-resistance? *J Appl Microbiol*. 2002; 92 Suppl: 98S-110S.
30. Vidal DR, Ragot C, Thibault F. Bacterial biofilms and resistance to disinfectants. *Ann Pharm Fr*. 1997; 55 (2): 49-54.
31. Mansfeld F. The interaction of bacteria and metal surfaces. *Electrochim Acta*. 2007; 52 (27): 7670-80.
32. Leriche V, Carpentier B. Viable but nonculturable *Salmonella typhimurium* in single- and binary-species biofilms in response to chlorine treatment. *J Food Prot*. 1995; 58 (11): 1186-91.
33. Andrade NJ, Bridgeman TA, Zottola EA. Bacteriocidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. *J Food Prot*. 1998; 61: 833-8.
34. Smith JL, Fratamico PM. Factors involved in the emergence and persistence of foodborne diseases. *J Food Prot*. 1995; 58 (6): 696-708.
35. Surman SB, Morton LHG, Keevil CW. Biofilms: an overview. *PHLS Microbiol Digest*. 1996; 13 (1): 33-8.
36. Marouani-Gadri N, Augier G, Carpentier B. Characterization of bacterial strains isolated from a beef-processing plant following cleaning and disinfection - Influence of isolated strains on biofilm formation by Sakai and EDL 933 *E. coli* O157:H7. *Int J Food Microbiol*. 2009; 133 (1/2): 62-7.
37. Timke M, Wang-Lieu NQ, Altendorf K, Lipski A. Community structure and diversity of biofilms from a beer bottling plant as revealed using 16S rRNA gene clone libraries. *Appl Environ Microbiol*. 2005; 71 (10): 6446-52.
38. Ronner AB, Wong ACL. Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless-steel and buna-N rubber. *J Food Prot*. 1993; 56: 750- 8.
39. Wirtanen G, Husmark U, Mattila-Sandholm T. Microbial evaluation of the biotransfer potential from surfaces with *Bacillus* biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing systems. *J Food Prot*. 1996; 59: 727-33.
40. Andrade NJ, Pinto CL de O, Rosado MS. Controle da higienização na indústria de alimentos. In: Andrade NJ, editores. *Higiene na Indústria de Alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos*. São Paulo: Varela; 2008. p. 181-226.
41. Brasil. Portaria nº 15 de 23 de agosto de 1988 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Determina que o registro de produtos saneantes domissanitários com finalidade antimicrobiana seja procedido de acordo com as normas regulamentares. Diário oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 05 set. 1988.
42. American Public Health Association (APHA). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Hanover: EPS Group Inc.; 1992.
43. Andrade NJ, Silva, RMM da, Brabes, KCS. Avaliação das condições microbiológicas em unidades de alimentação e nutrição. *Ciênc Agrotec*. 2003; 27 (3): 590-6.

44. Rossoni EMM, Gaylard 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.
45. Cabeça TK, Pizzolitto AC, Pizzolitto EL. Assessment of action of disinfectants against *Listeria monocytogenes* biofilms. *Alimentos e Nutrição*. 2006; 17 (2): 121-5.
46. Xavier JB, Picioreanu C, Rani SA, van Loosdrecht MC, Stewart PS. Biofilm-control strategies based on enzymic disruption of the extracellular polymeric substance matrix – a modelling study. *Microbiology*. 2005; 151(12): 3817-32.
47. Meylheuc T, Renault M, Bellon-Fontaine MN. Adsorption of a biosurfactant on surfaces to enhance the disinfection of surfaces contaminated with *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol*. 2006; 109 (1/2): 71-8.
48. Byun MW, Kim JH, Kim DH, Kim HJ, Jo C. Effects of irradiation and sodium hypochlorite on the micro-organisms attached to a commercial food container. *Food Microbiol*. 2007; 24 (5): 544-8.
49. Oliveira MMM de, Brugnera DF, Cardoso M das G, Alves E, Piccoli RH. Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. *Food Control*. 2010; 21 (4): 549-53.
50. Cabo ML, Herrera JJ, Crespo MD, Pastoriza L. Comparison among the effectiveness of ozone, nisin and benzalkonium chloride for the elimination of planktonic cells and biofilms of *Staphylococcus aureus* CECT4459 on polypropylene. *Food Control*. 2009; 20 (5): 521-5.

Contaminação fúngica em barras de cereais comercializadas

Fungi contamination in cereal bars commercialized

RIALA6/1290

Maria Magali STELATO^{1*}, Mariane Mazzoni CONCON², Daniela SHIMADA³, Silvana Mariana SREBERNICH³

^{1*}Endereço para correspondência: Faculdade de Ciências Biológicas, Pontifícia Universidade Católica de Campinas (PUC-Campinas), Av. John Boyd Dunlop s/n°, Jardim Ipaussurama, CEP 13060-904, Campinas – SP – Brasil, tel (19) 3343-6809 ou 3343-6817, e-mail: magalistelato@puc-campinas.edu.br

² Centro de Ciências da Vida, Faculdade de Ciências Biológicas, PUC-Campinas - SP - Brasil, São Paulo - SP - Brasil

³ Centro de Ciências da Vida, Faculdade de Nutrição, PUC-Campinas - SP - Brasil

Recebido: 11.02.2010 – Aceito para publicação: 15.09.2010

RESUMO

As barras de cereais, ricas em fibras, proteínas, carboidratos, sais minerais e vitaminas, têm sido muito consumidas por indivíduos que se preocupam com alimentação saudável. No entanto, esses nutrientes podem propiciar a proliferação de microrganismos, especialmente fungos que podem causar micotoxicoses. A contaminação por fungos em barras de cereais foi investigada, efetuando-se análise em duplicata de 20 amostras tipo light e 20 tipo não-light, provenientes de dois diferentes lotes e de 10 marcas de produtos comercializados na região de Campinas. No experimento, utilizou-se a metodologia clássica em microbiologia de alimentos realizando-se contagem (UFC/g) e identificação de fungos em meio de cultura dichloran 18% glicerol ágar. Oito amostras (40%) do primeiro lote estavam contaminadas por fungos, sendo quatro amostras de barras light e quatro não-light. No segundo lote, os fungos foram isolados em 11 amostras (55%), sendo três amostras de barras não light e oito tipo light. Foram identificados seis gêneros de fungos (*Aspergillus sp*, *Penicillium sp*, *Rhizopus sp*, *Mucor sp*, *Cladosporium sp* e *Candida sp*), evidenciando a necessidade de melhoria no controle de qualidade desses alimentos, bem como a inclusão da respectiva determinação microbiológica pela legislação brasileira de alimentos.

Palavras-chave. cereais, fungos, contaminação, segurança alimentar.

ABSTRACT

Cereal bars have been widely consumed by persons who for healthy food as they are rich in fibers, protein, carbohydrates, minerals and vitamins. However, these nutrients are prone to cause microorganisms proliferation as fungi, which may cause mycotoxicosis. Fungal contamination in marketed cereal bars was investigated. The study was carried out in duplicate, analyzing 20 light product samples and 20 non-light samples of two different lots from ten brands marketed in the region of Campinas, SP. The conventional food microbial techniques were performed for fungi counting and identification. Eight samples (40%) of the first batch were contaminated with fungi, being four light samples and four samples of non-light bars. From the second batch, 11 samples (55%) showed fungi contamination, being three non-light cereal bars and eight light samples. Six genera of fungi (*Aspergillus sp*, *Penicillium sp*, *Rhizopus sp*, *Mucor sp*, *Cladosporium sp* e *Candida sp*) were isolated, evidencing that the quality control of these foods has to be improved, as well as in including the concerned microorganism analysis by the Brazilian food legislation.

Key words. cereals, fungi, contamination, food safety.

INTRODUÇÃO

As barras de cereais inicialmente visavam satisfazer as necessidades da população consumidora que buscava prazer e comodidade, como acontecia com o consumo de biscoitos e barras doces, embora estes fossem vistos como produtos não saudáveis¹. Posteriormente, o produto foi direcionado no Brasil aos adeptos de esportes e com o tempo conquistou até executivos de banco².

Os consumidores mais assíduos deste tipo de produto são jovens e mulheres, com idade entre 15 e 25 anos, equivalente a 68% de toda a população³. Estas pessoas tendem a ter uma visão mais saudável quanto ao equilíbrio corporal e da saúde¹.

Em 2001, o Brasil consumia cerca de 40 milhões de barras de cereais ao ano, algo em torno de R\$ 80 milhões, enquanto os Estados Unidos consumia US\$ 2,9 bilhões^{4,5}. O crescimento do mercado de barras de cereais na última década, nos Estados Unidos está relacionado à saúde e conveniência, e ao fato de se tratar de um produto inovador⁵.

A relação de saúde feita com as barras de cereais é devida, principalmente, à grande presença de fibras na composição das mesmas. Os cereais e seus produtos são muito importantes para a alimentação humana por sua complexa composição de carboidratos, o elevado índice de proteína e as várias formas de fibra dietética, assim como a abundância dos minerais e das vitaminas do grupo B, especialmente nos produtos integrais. Os principais cereais encontrados nas barras são: aveia, arroz, milho, centeio, trigo e cevada, os quais são grãos cuja estrutura não é alterada pelo processo de refinação. Assim, é mantida a integridade de seus nutrientes (fibras, vitaminas e minerais), ao contrário do que acontece com alguns alimentos refinados, durante os processos industriais de fabricação⁶. Essas fibras acabam por regular os níveis plasmáticos de glicose, colesterol e triglicérides, prevenindo doenças crônicas não transmissíveis como câncer de cólon e reto, arteriosclerose, diabetes, hipertensão, obesidade, entre outras. Além disso, a fibra aumenta a saciedade e o volume fecal, servindo como meio de fermentação para a microbiota intestinal³.

Esse alimento contém grande quantidade de nutrientes, principalmente carboidratos, que são “locais” estratégicos para o crescimento de fungos, pois propiciam uma pressão osmótica elevada, a qual inibe o crescimento bacteriano. Além disso, estes alimentos podem ser contaminados de forma direta por fungos provindos dos cereais, podendo ocorrer essa contaminação durante o

plantio, transporte e estocagem^{7,8}. No entanto, a legislação não preconiza a pesquisa de fungos nessas etapas⁹.

Os fungos podem contaminar os alimentos por diversos meios, como a água, o solo, o ar e manipuladores, podendo causar a deteriorização microbiana, como também alguns fungos filamentosos, como *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp, *Fusarium* sp podem causar sérios riscos à saúde do homem devido ao fato de algumas espécies produzirem micotoxinas, as quais têm atividade carcinogênica, teratogênica, mutagênica, entre outras^{10,11}.

O objetivo deste estudo foi verificar a contaminação por fungos em barras de cereais comercializadas na região de Campinas, realizando a identificação destes microrganismos, para auxiliar na sanidade e segurança desses produtos.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção e preparação das amostras

Foram analisadas 40 amostras de barra de cereais, sendo 20 light e 20 não light, em dois lotes diferentes, provenientes de 10 marcas comercializadas na região de Campinas.

As amostras foram destinadas ao laboratório na embalagem original e estocadas a temperatura ambiente, protegida da umidade, não havendo violação da embalagem antes do início do experimento.

Desinfetou-se a área externa da embalagem com etanol 70% e, em seguida, macerou-se cada barra de cereal (25g) em condições assépticas¹². O produto dessa maceração foi colocado em um erlenmeyer com 225 ml de água salina peptonada tamponada 0,1% (H₂O_p), obtendo-se a diluição de 10⁻¹. Em seguida, o frasco foi agitado e consecutivas diluições foram realizadas até a diluição de 10⁻³, utilizando-se H₂O_p¹².

Detecção e identificação de fungos

Para as diferentes diluições, fez-se inoculação em superfície (duplicata), usando-se 0,1 mL das amostras em meio de cultura dichloran 18% glicerol agar (DG18), que é utilizado para isolamento de fungos em alimentos com atividade de água menor ou igual a 0,95. As placas foram incubadas em estufa a 25°C durante 5 dias¹².

Após o período de incubação, foi realizada a contagem de colônias manualmente, obtendo-se através da média aritmética, os resultados, os quais foram expressos em unidades formadoras de colônias (UFC/g).

As colônias semelhantes foram repicadas em tubos de ensaio contendo meio Agar Batata Dextrose, para posterior identificação¹².

Segundo Larone¹³, as identificações das colônias de fungos foram realizadas com base no aspecto macroscópico (pigmento, textura e topografia) e microscópico (estruturas do micélio vegetativo e reprodutor), utilizando-se microscópio óptico com resolução de 400X. Para melhor visualização das microestruturas de fungos filamentosos e de pseudo-hifas, além de propágulos de leveduras, utilizou-se o método de cultura em lâmina. A identificação de leveduras foi também realizada através de pesquisa de ascósporos, utilizando-se microscópio óptico com resolução de 1000X e provas fisiológicas (fermentação e assimilação de fontes de carbono e nitrogênio, produção de urease e crescimento em ciclohexemida).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No primeiro lote, de um total de 20 amostras de barras de cereais analisadas, verificou-se que 8 amostras (40%) estavam contaminadas com fungos. Dessas 8 amostras, 4 (40%) eram pertencentes ao tipo light e as outras 4 (40%) eram pertencentes ao tipo não light, sendo que para cada tipo de barra existiam 10 amostras. No segundo lote, também composto por 20 amostras, observou-se que 11 amostras (55%) estavam contaminadas, sendo 8 (80%) amostras do tipo light e 3 (30%) amostras do tipo não light, cada um desses tipos constituídos por 10 amostras (Tabela 1).

Portanto, observou-se que as barras de cereais light estavam mais contaminadas. Alguns fatores podem ter contribuído para esse resultado, destacando-se, principalmente, a composição das barras. Normalmente, nas barras light, tem-se a presença de sorbitol e goma acácia, o que pode interferir na atividade de água e, conseqüentemente, no desenvolvimento de microrganismos dessas barras.

Tabela 1. Número e porcentagem de amostras de barras de cereais contaminadas por fungos nos dois lotes estudados

Número e porcentagem de amostras de barras de cereais contaminadas		
Amostras	Tipo light (10 amostras)	Tipo não light (10 amostras)
1º lote (20 amostras)	4 unidades (40%)	4 unidades (40%)
2º lote (20 amostras)	8 unidades (80%)	3 unidades (30%)
Total (40 amostras)	12 unidades	7 unidades

Foi observada maior quantidade de fungos nas amostras de barras de cereais não light do 1º lote, nas quais foi obtida uma variação de contaminação <10 UFC/g a 7,89x10³ UFC/g, sendo encontrada, na amostra 2, a maior quantidade e variedade de fungos, identificando-se quatro gêneros diferentes, *Candida* sp, *Rhizopus* sp, *Mucor* sp e *Aspergillus* sp, seguida da amostra 1 em que houve uma prevalência do gênero *Candida* sp. Outros fungos como *Penicillium* sp e *Cladosporium* sp foram isolados nas amostras do primeiro e segundo lotes (Tabela 2).

Tabela 2. Determinação da contagem fúngica total (UFC/g) e identificação dos gêneros em amostras de barras de cereais não light

Amostras	1º Lote		2º Lote	
	Contagem total (UFC/g)	Fungos	Contagem total (UFC/g)	Fungos
1	6,8x10 ³	<i>Candida</i> sp	1,0x10 ³	<i>Cladosporium</i> sp
2	7,89x10 ³	<i>Candida</i> sp <i>Mucor</i> sp <i>Rhizopus</i> sp <i>Aspergillus</i> sp <i>Aspergillus niger</i>	5,3x10 ³	<i>Aspergillus</i> sp <i>Penicillium</i> sp
3	5,0x10 ¹	<i>Cladosporium</i> sp	<10	-
4	<10	-	<10	-
5	<10	-	<10	-
6	<10	-	<10	-
7	1,0x10 ²	<i>Penicillium</i> sp	1,0x10 ³	<i>Cladosporium</i> sp
8	<10	-	<10	-
9	<10	-	<10	-
10	<10	-	<10	-

Nas amostras obtidas de barras de cereais “light” (Tabela 3), a maior taxa de contaminação foi detectada na amostra 5 do segundo lote. Entretanto, foi a amostra sete, do primeiro lote, que apresentou a maior diversidade fúngica, identificando-se três gêneros fúngicos: *Candida* sp, *Penicillium* sp e *Cladosporium* sp. O gênero *Penicillium* sp foi também detectado em duas outras amostras do primeiro lote, e os outros gêneros citados acima foram encontrados nos dois lotes. *Aspergillus* sp foi isolado em três amostras do segundo lote e *Rhizopus* sp em uma amostra de cada lote (Tabela 3).

Tabela 3. Determinação da contagem fúngica total (UFC/g) e identificação dos gêneros em amostras de barras de cereais light

Amostras	1° Lote		2° Lote	
	Contagem total (UFC/g)	Fungos	Contagem total (UFC/g)	Fungos
1	5,0x10 ¹	<i>Rhizopus</i> sp <i>Penicillium</i> sp	1,0x10 ³	<i>Aspergillus</i> sp
2	<10	-	1,0x10 ³	<i>Aspergillus</i> sp
3	1,5x10 ³	<i>Cladosporium</i> sp	1,7x10 ³	<i>Candida</i> sp
4	<10	-	1,0x10 ¹	<i>Rhizopus</i>
5	5,0x10 ¹	<i>Penicillium</i> sp	2,5x10 ³	<i>Cladosporium</i> sp
6	<10	-	1,0x10 ³	<i>Cladosporium</i> sp
7	8,5x10 ²	<i>Penicillium</i> sp <i>Cladosporium</i> sp <i>Candida</i> sp	1,5x10 ¹	<i>Candida</i> sp
8	<10	-	<10	-
9	<10	-	<10	-
10	<10	-	1,0x10 ²	<i>Aspergillus</i> sp

Neste estudo, foram identificados 6 diferentes gêneros de fungos, sendo dois deles *Penicillium* sp e *Aspergillus* sp (Figura 1), os quais dependendo da espécie, podem produzir micotoxinas. O gênero *Penicillium* sp foi identificado em 5 amostras analisadas (12,5%) (Figura 1), sendo duas barras de cereais não light (Tabela 2) e três light (Tabela 3). Esse fungo está presente geralmente em produtos armazenados e, existem espécies que estão envolvidas no processo de deterioração em cereais e produção de micotoxinas, como a ocratoxina, a qual é potencialmente nefrotóxica e carcinogênica e, patulina que causa efeitos neurotóxicos, imunológicos e alterações gastrointestinais em animais^{10,11}. O gênero *Aspergillus* sp foi detectado em 5 amostras (12,5%) (Figura 1), sendo 2 barras de cereais não light (Tabela 2) e 3 light (Tabela 3). O *Aspergillus* grupo Flavi tem potencial para produzir aflatoxina, considerada altamente tóxica, tendo o fígado como alvo principal. Quando ingerida em alta concentração, tem efeito agudo e causa necrose e degeneração gordurosa e em baixa concentração, por exposição prolongada possui efeito crônico, sendo hepatocarcinogênica^{10,11}.

Os principais fatores que levam a contaminação por fungos estão relacionados com a susceptibilidade dos cereais à contaminação durante o período de plantio e, principalmente, no armazenamento¹⁴.

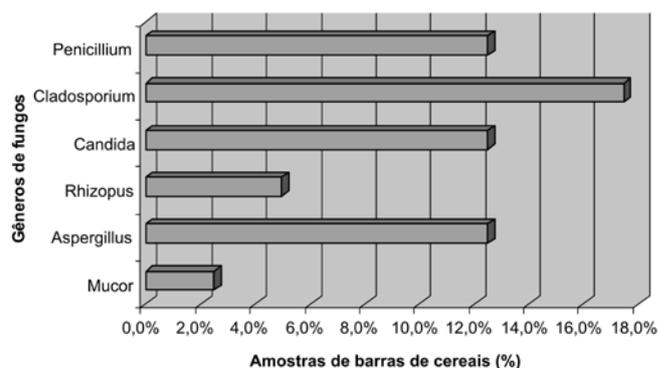


Figura 1. Frequência relativa de gêneros de fungos encontrados nas amostras de barras de cereais light e não light utilizados no estudo

A maior parte dos estudos para verificar a qualidade microbiológica de barras de cereais se refere a amostras desenvolvidas em nível de laboratório, sendo raros os estudos que envolvem amostras comerciais, conforme pode ser observado no estudo realizado por Gutkoski et al¹⁵, que desenvolveram barras de cereais à base de aveia com alto teor de fibra alimentar e não encontraram contaminação por fungos. No entanto, existem pesquisas que demonstram que os fungos podem contaminar cereais desde o plantio, como o de Dilkin et al¹⁶, que identificaram a microbiota fúngica em híbridos de milho recém colhidos e o de Concová et al¹⁷, que pesquisaram fungos e micotoxinas em trigo antes do armazenamento, sendo que ambos estudos observaram contaminação fúngica por *Penicillium* sp (4,3%), (72,3%); *Aspergillus* sp (23,6%), (81,8%) e *Fusarium* sp (57,1%), (95,5% e 70,5%), respectivamente.

Corina e Tofan¹⁸ analisaram diferentes grãos de cereais (milho, cevada, trigo e aveia) em fazenda e os fungos predominantes nas amostras foram *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp e *Fusarium* sp, reforçando, assim, os resultados obtidos no presente estudo.

Em um outro estudo, no qual foi pesquisada a ocorrência de fungos e detecção micotoxinas (aflatoxinas e zearalenona) em grãos de milho armazenados por um período de cinco meses, foram encontrados os fungos *Aspergillus flavus*, *Fusarium roseum*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium graminearum* e *Penicillium* sp¹⁹.

Marini et al⁸ analisaram a qualidade de grãos de aveia em vários períodos do armazenamento e detectaram maior incidência de fungos de campo do que de armazenamento, havendo baixa incidência dos que têm potencial toxigênico (*Aspergillus* sp, *Fusarium* sp e *Penicillium* sp). Relataram, ainda, que os fungos de campo causam perdas metabólicas nos grãos e, durante o período de armazenamento, foram

progressivamente substituídos pelos fungos xerófilos, principalmente dos gêneros *Aspergillus* sp e *Penicillium* sp, chamados de fungos de armazenamento. Na presente pesquisa, foram encontrados esses dois gêneros de fungos (Figura 1) nas barras de cereais, ratificando o que foi relatado por esses pesquisadores.

Weidenbörner e Kunz⁷, com intuito de enumerar e identificar a micoflora presente em diversos tipos de flocos de cereais (flocos de trigo, aveia, cevada e centeio), detectaram 23 gêneros fúngicos diferentes. Destes, a maior incidência também foi do gênero *Penicillium* sp (25 espécies), seguindo-se do gênero *Aspergillus* sp (7 espécies). Em flocos de aveia, um dos principais constituintes de barra de cereais, foi detectada também a presença de outros gêneros como, *Rhizopus* sp, *Cladosporium* sp e *Mucor* sp, que também foram encontrados no presente trabalho (Figura 1).

Em estudo realizado pelos autores citados, foi feita a identificação de fungos em diferentes cereais que compõem os “mueslis”, o gênero *Penicillium* sp foi encontrado em maior quantidade (19 espécies). *Aspergillus* sp, *Mucor* sp, *Cladosporium* sp e *Rhizopus* sp também foram identificados, porém em menor quantidade²⁰. Nessa pesquisa, o fungo encontrado em maior quantidade nas barras de cereais foi o *Cladosporium* sp, seguido dos gêneros *Penicillium* sp, *Aspergillus* sp e *Candida* sp (12,5%) (Figura 1).

Vecchia et al²¹ pesquisaram os fungos micotoxigênicos *Aspergillus* sp, *Fusarium* sp e *Penicillium* sp em granola, nas diferentes estações do ano, e encontraram baixa incidência de *Fusarium* sp em todas as estações. O fungo *Penicillium* sp foi identificado no verão e inverno e o gênero *Aspergillus* sp foi o predominante no verão, outono e inverno. A granola é uma mistura de grãos de cereais, frutas secas, linhaça, trigo, flocos de milho e de arroz, sementes oleaginosas, como o amendoim e a castanha-do-pará, tendo composição semelhante a de barras de cereais estudadas no presente trabalho, onde foram encontrados 12,5% de *Aspergillus* sp e *Penicillium* sp no total das amostras analisadas (Figura 1).

Além dos fungos filamentosos, a levedura do gênero *Candida* sp foi isolada em 5 amostras (12,5%), sendo duas em de barras de cereais não light (Tabelas 2) e três em light (Tabelas 3), demonstrando a falta de medidas higiênico-sanitárias durante a manipulação do alimento, já que esta levedura está presente na microbiota normal da cavidade oral e intestinal do corpo humano²². Silva et al²³ verificaram a presença de leveduras do gênero *Candida* sp como a mais frequente (34,8 %) encontrada

nas mãos dos manipuladores. Essa levedura é um patógeno oportunista e pode causar doença cutâneo-mucosa e sistêmica em indivíduos que possuam algum fator predisponente, normalmente causam doença em pacientes imunossuprimidos e naqueles submetidos a terapia prolongada²² de antibiótico.

Diante desses resultados, verifica-se que as barras de cereais não estão isentas de contaminação fúngica, porém a Resolução RDC nº12, de 02 de janeiro de 2001 da ANVISA⁹, que estabelece os padrões microbiológicos sanitários em alimentos, não apresenta controle de fungos nesse tipo de alimento, o que representa um risco adicional à saúde do consumidor, pois dependendo da espécie de fungo encontrada, pode haver indícios de contaminação por micotoxinas. Portanto, torna-se necessária a realização de controle de qualidade microbiológico em todo o processo de produção desse alimento, desde a análise dos ingredientes até o produto final.

REFERÊNCIAS

1. Bower IA, Whitten R. Sensory characteristics and consumer liking for cereal bar snack foods. *J Sens Stud*. 2000; 15(3):327-45.
2. Freitas DGC, Moretti RH. Caracterização e avaliação sensorial de barra de cereais funcional de alto teor protéico e vitamínico. *Cienc Tecnol Aliment*. 2006; 26(2):318-24.
3. Brito IP, Campos JM, Souza TFL, Wakiyama C, Azeredo GA. Elaboração e avaliação global de barras de cereais caseiras. *Bol Centro Pesq Process Aliment*. 2004; 22(1):35-50.
4. Francal Feiras. Barras de cereais: grande filão para o comércio com EUA. [Acesso 20 ago. 2007] Available from: http://www.francal.com.br/2005/codigo/p_noticias_conteudo.asp?noticia_ID=758.
5. Palazollo G. Cereal bars: They're not just for breakfast anymore. *Cereal Foods World* 2003; 48(2):70-2.
6. Stella R. Barrinhas de saúde. 2004. [acesso em 08 abr. 2007]. Available from: http://www.uol.com.br/cybernet/colunas/021018_nut_barra_cereais.htm.
7. Weidenbörner M, Kunz B. Mycoflora of cereal flakes. *J Food Prot*. 1994; 58(7):809-12.
8. Marini LJ, Gutkoski LC, Elias MC, Santin JA. Qualidade de grãos de aveia sob secagem intermitente em altas temperaturas. *Cienc Rural*. 2007;37(5):1268-73.
9. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução nº 12, de 02 de jan. 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Dispõe sobre o regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. [acesso 20 abr. 2007]. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>.
10. Pitt JI, Basilico JC, Abarca ML, Lopes C. Micotoxins and toxigenic fungi. *Med Mycol*. 2000; 38 (Suppl 1):41-6.

11. Richard JL, Payne GA, Desjardins AE, Maragos C, Norred WP, Pestka JJ et al. *Mycotoxins: Risks in Plant, Animal and Human Systems*. Iowa: Council for Agricultural Science and Technology; 2002.
12. Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA. *Manual de métodos de análise Microbiológica de alimentos*. 2 ed. São Paulo: Varela; 2001.
13. Larone DH. *Medically Important Fungi: a guide to identification*. 4 ed. Washington: ASM Press; 2002.
14. Soares LMV, Furlani RPZ. Survey of Aflatoxins, Ocratoxins A, Zearalenone and Sterigmatocystin in health foods and breakfast cereals commercialized in city of Campinas, São Paulo. *Cienc Tecnol Aliment*. 1996; 16(2):126-9.
15. Gutkoski LC, Bonamigo JMA, Teixeira DMF, Pedo I. Desenvolvimento de barras de cereais à base de aveia com alto teor de fibra alimentar. *Cienc Tecnol Aliment*. 2007; 27(2):355-63.
16. Dilkin P, Mallmann AC, Santuario JM, Hickmann JL. Classificação macroscópica, identificação da microbiota fúngica e produção de aflatoxinas em híbridos de milho. *Cienc Rural*. 2000; 20(1):137-41.
17. Conková E, Laciánková A, Stiriak I, Czerwiecki L, Wilczinska, G. Fungal contaminations and the levels of micotoxins (DON and OTA) in cereal sample from Poland and East Slovakia. *Czech J Food Sci*. 2006; 24(1): 33-40.
18. Corina DN, Tofan C. Cereal contamination with toxigenic moulds. *J Agroaliment Proc Technol*. 2008; 14:237-40.
19. Pezzini V, Valduga E, Cansian RL. Incidência de fungos e micotoxinas em grãos de milho armazenados sob diferentes condições. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2005; 64(1):91-6.
20. Weidenbörner M, Kunz B. Contamination of different muesli components by fungi. *Mycol Res*. 1994; 98(5):583-6.
21. Vecchia AD, Castilhos-Fortes R. Contaminação fúngica em granola comercial. *Cienc Tecnol Aliment*. 2007; 27(2): 324-7.
22. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC. *Tratado de Micologia Médica*. 9 ed. São Paulo: Sarvier, 2002.
23. Silva JO, Capuano DM, TakayanaguI OM, Giacometti EJ. Enteroparasitoses e onicomicoses em manipuladores de alimentos do município de Ribeirão Preto, SP. *Rev Bras Epidemiol*. 2005; 8(4):385-92.

Comparação entre métodos para a análise de coliformes totais e *E. coli* em amostras de água

Comparison of methods for analysis of total coliforms and *E. coli* in water samples

RIALA6/1291

Marina Chiarelli MARQUEZI^{1*}, Cláudio Rosa GALLO¹, Carlos Tadeu dos Santos DIAS²

Endereço para correspondência: ¹Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP) Avenida Pádua Dias, 11. CP 09. CEP 13418-900. Piracicaba – SP, Fone: (19) 3429-4131, email: marinamarquezi@gmail.com

²Departamento de Ciências Exatas, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP)

Recebido: 24.06.2010 – Aceito para publicação: 30.09.2010

RESUMO

Neste estudo foram realizadas as contagens de coliformes totais e de *E. coli* por meio de três metodologias (fermentação em tubos múltiplos - FTM, Colilert e Colitag) em amostras de água coletadas de três diferentes pontos (abastecimento, bica e rio). O desempenho analítico dessas metodologias foi comparado analisando-se 90 amostras de água. Nas contagens de coliformes totais em amostras de água provenientes de bica e de abastecimento e nas contagens de *E. coli* em amostras de água coletadas de abastecimento, bica e rio, as técnicas Colilert e Colitag mostraram resultados equivalentes aos da metodologia FTM. Nas análises de coliformes totais em amostras de água do rio, a técnica de FTM apresentou diferenças significativas quando comparada aos testes rápidos. Esta diferença pode ter ocorrido pela presença de *Aeromonas* nas amostras ou, possivelmente, pela maior capacidade das técnicas Colilert e Colitag em recuperar as células danificadas. Dessa forma, nos casos em que as técnicas rápidas forem equivalentes à metodologia convencional, dá-se preferência ao uso dos primeiros testes, por serem mais rápidos, práticos e de menor custo.

Palavras-chave. coliformes, *E. coli*, análise de água.

ABSTRACT

The total coliform and *E. coli* counts were performed using three methodologies (Multiple-Tube Fermentation - MTF, Colilert and Colitag) in water samples collected from three different points (water supply, spout and river). The performances of three methodologies were compared analyzing ninety water samples. In the analysis of total coliform of water samples from spout and supply and analysis of *E. coli* of water samples from supply, tap and river, Colilert and Colitag techniques were equivalent to MTF in counting these bacteria. However, for analyzing the total coliform in water samples collected from river, the MTF technique differed significantly from those rapid tests. This significant difference may be due to the presence of *Aeromonas* in water samples, or possibly because of the increased capacity of Colilert and Colitag techniques in recovering the injured cells. Thus, in event of the rapid technique were equivalent to conventional ones, the former should be used, as they are fast, practical and inexpensive.

Key words. coliforms, *E. coli*, water analysis.

INTRODUÇÃO

A água é o alimento mais consumido pela população e, por ser um importante veículo de transmissão de doenças, está associada a grandes riscos à saúde pública¹. Dentre as doenças comumente transmitidas pela água podem ser citadas: cólera, shigelose, leptospirose².

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 80% das doenças relatadas em países em desenvolvimento tem como veículo de transmissão a água de má qualidade¹. Uma vez tratada, a água deixa de ser um veículo de agentes patogênicos, garantindo a saúde pública.

Os microrganismos transmitidos pela água tem como principal rota de contaminação a fecal-oral, sendo disseminados na água a partir da contaminação desta com esgoto não tratado ou tratado inadequadamente². Assim, o controle da qualidade da água a ser consumida pela população é uma atividade de extrema importância.

A identificação de patógenos na água é possível, porém é uma prática difícil; sendo assim, é preferível realizar as análises de microrganismos indicadores de contaminação fecal, tais como as bactérias do grupo coliformes³. As bactérias deste grupo estão presentes no intestino humano e de animais de sangue quente, e são eliminadas em grandes quantidades nas fezes e quantificadas por métodos simples. Porém, neste grupo, há também bactérias de origem não exclusivamente fecal⁴.

A *E. coli* é uma bactéria pertencente ao grupo coliforme, que tem como habitat primário o intestino do homem e de animais de sangue quente, representando 95% das bactérias do grupo coliformes encontradas nas fezes humanas e de animais. Por ser uma bactéria de fácil isolamento e identificação em água e por seu período de sobrevivência ser semelhante ao dos patógenos mais comuns, a *E. coli* é considerada a melhor indicadora de contaminação fecal, sendo a tendência atual o uso da detecção específica de *E. coli*, e não mais de bactérias do grupo coliformes termotolerantes^{4,5}.

Dentre os métodos utilizados para a contagem de coliformes totais e *E. coli* em amostras de água, se destacam o método convencional fermentação em tubos múltiplos (FTM) e os métodos rápidos Colilert e Colitag. O método FTM apresenta como desvantagem o fato de ser muito trabalhoso e demorado (até 96 horas). Já os métodos rápidos Colilert e Colitag se tornam vantajosos por utilizarem somente um meio e demorarem apenas 24 horas para darem o resultado da análise, possibilitando

ações corretivas, caso seja detectada a contaminação da água, impedindo o consumo de uma água possivelmente contaminada pela população.

Os métodos Colilert e Colitag são aprovados pela United States Environmental Protection Agency (USEPA), sendo o Colilert na década de 90 e o Colitag em 2004⁶, com o fim da patente da IDEXX sobre esta metodologia. Dessa forma, por ser mais novo, poucos trabalhos são encontrados na literatura envolvendo o método Colitag. O mecanismo de detecção de coliformes totais e *E. coli* desses métodos rápidos são os mesmos, assim como a metodologia utilizada.

Segundo os fabricantes do Colitag, esse produto promove a reativação e posterior detecção de *E. coli* danificadas pelo cloro. Esse método é confiável e de acordo com a USEPA gera 0,0% de resultados falso-negativos e 5,0% de resultados falso-positivos para coliformes totais e *E. coli*⁷.

No campo de pesquisa, o uso de métodos rápidos se torna vantajoso por diminuir o tempo de análise e, conseqüentemente, aumentarem a produtividade laboratorial.

O objetivo deste trabalho foi comparar a equivalência entre os métodos FTM, Colilert e Colitag na determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e *E. coli* em amostras de água provenientes de abastecimento, bica e rio.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de água foram obtidas na cidade de Piracicaba – SP nos períodos de fevereiro/2009 a julho/2009. Foram coletadas amostras de três diferentes pontos, sendo 30 do abastecimento público municipal (SEMAE), captada em uma residência localizada no bairro Alto, 30 do rio Piracicamirim, na Avenida Professor Alberto Vollet Sachs e 30 de uma bica, localizada na Rua Silva Jardim, totalizando 90 amostras analisadas. As coletas foram realizadas segundo Silva et al⁴, e as amostras seguiram em caixas isotérmicas para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos, no Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, da ESALQ/USP, em Piracicaba, onde foram prontamente analisadas.

A determinação do NMP de coliformes totais e *E. coli* pelos métodos FTM, Colilert e Colitag foi realizada de acordo com Hunt e Rice⁸.

A análise estatística foi feita pela análise de variância e aplicou-se o teste de Tukey, usando o sistema computacional SAS⁹.

RESULTADOS

Pela análise estatística exploratória foram encontrados alguns problemas, tais como escala, outliers (pontos discrepantes) e heterogeneidade de variâncias. Para resolver estes problemas, foi utilizado o método de transformação potência ótima de Box e Cox¹⁰, o qual sugeriu a transformação logarítmica na base 10 dos dados obtidos.

O resultado das análises dos dados obtidos para coliformes totais nos três pontos estudados pelos três métodos analisados, na escala transformada, mostraram uma interação entre pontos e métodos. Dessa forma, as médias de cada método foram estudadas dentro de cada ponto, e vice-versa, a partir do desdobramento da interação, conforme a Figura 1.

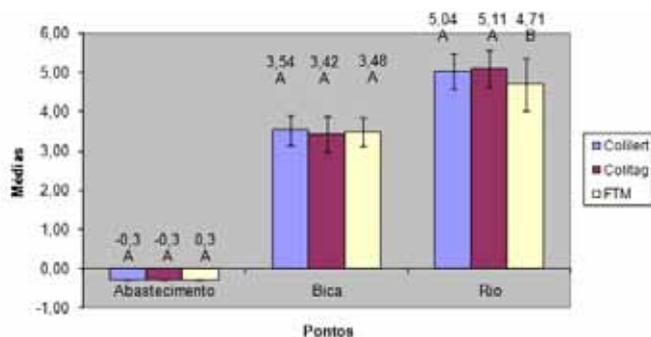


Figura 1. Contagens de coliformes totais em cada método dentro de cada ponto. Médias e comparações obtidas a partir da transformação logarítmica dos dados. Médias seguidas de mesma letra maiúscula em um mesmo ponto não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância

Nas amostras de água de abastecimento, não foram detectadas a presença de coliformes totais em nenhuma das 30 amostras; sendo assim, os métodos não apresentaram diferenças significativas entre si.

Nas amostras de água da bica, a menor contagem foi encontrada pelo método Colitag e, a maior pelo método Colilert. O método FTM apresentou contagens intermediárias. Apesar disso, não foi encontrada diferença significativa entre os métodos utilizados.

Nas amostras de água do rio, o método FTM apresentou a menor média e, o Colitag a maior. O método Colilert apresentou contagens intermediárias. Nesse caso, foi encontrada diferença significativa entre o método FTM e Colilert e entre FTM e Colitag.

Na análise estatística dos dados obtidos para a contagem de *E. coli*, não foi observada uma interação entre pontos e métodos. Dessa forma, a comparação das metodologias foi feita dentro de cada ponto.

Nas amostras de água de abastecimento, não foi detectada a presença de *E. coli* em nenhuma das 30 amostras. Assim, não foi encontrada diferença significativa entre os três métodos utilizados.

As médias obtidas a partir da transformação logarítmica dos dados para a contagem de *E. coli* em amostras de água da bica podem ser observadas na Figura 2.

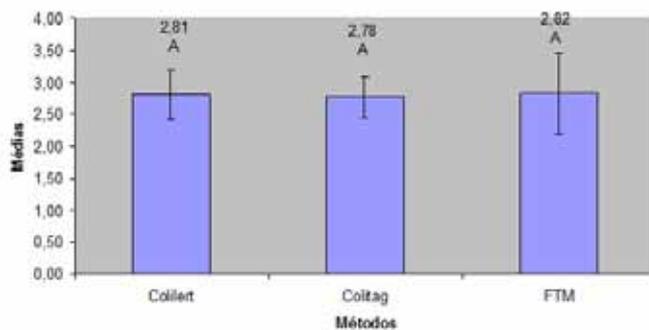


Figura 2. Médias das contagens encontradas para *E. coli* em amostras de água da bica. Médias encontradas a partir da transformação logarítmica dos dados. Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância

Nas amostras de água da bica, o método Colitag foi o que apresentou uma menor média. A maior média foi encontrada pelo método FTM, ficando o Colilert com contagens intermediárias. Apesar de tais diferenças, os métodos não diferiram entre si.

A Figura 3 mostra as médias encontradas a partir da transformação logarítmica das contagens encontradas para *E. coli* em amostras de água do rio.

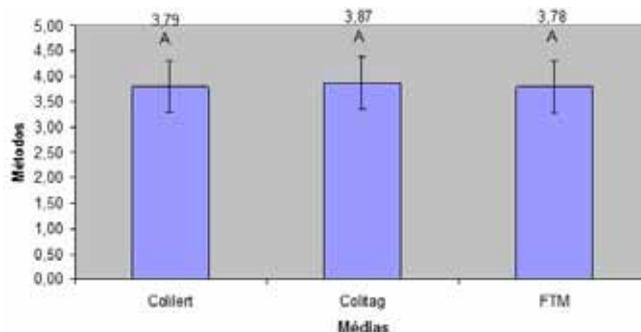


Figura 3. Médias das contagens encontradas para *E. coli* em amostras de água do rio. Médias encontradas a partir da transformação logarítmica dos dados. Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância

Nas análises de água do rio, o método FTM apresentou a menor contagem de *E. coli*. Já o método Colitag, a maior contagem, ficando o método Colilert com

contagens intermediárias. Apesar de tais diferenças entre as contagens, não foi observada diferença significativa entre os métodos.

DISCUSSÃO

Foi encontrada uma variação muito grande nos dados obtidos, o que era esperado pela natureza do substrato. Por ela ser pobre em nutrientes, as bactérias normalmente não se multiplicam na água, apenas sobrevivem e são veiculadas e, se apresentam heterogeneamente dispersas. Dessa forma, as alíquotas pipetadas podem ora conter e ora não conter as bactérias alvo.

A equivalência dos métodos rápidos e dos métodos convencionais tem sido muito estudada. Um estudo avaliou as condições higiênico-sanitárias da água tratada, coletadas nos pontos finais da rede de distribuição, pelos métodos Colilert e FTM. Foi observada a equivalência desses métodos na quantificação de coliformes totais e de *E. coli*, tanto nos resultados positivos quanto na ausência destas bactérias, destacando a rapidez e simplicidade do Colilert¹¹.

Outro estudo comparou os métodos da membrana filtrante, FTM, Colilert nas análises de água potável, e para recreação. Para as amostras de água potável observou-se que o método Colilert foi mais sensível na detecção de coliformes totais que os métodos convencionais utilizados (coeficiente de correlação 0,77). Para a detecção de *E. coli*, os três métodos apresentaram sensibilidades iguais (coeficiente de correlação 0,84). Apesar disso, os métodos se mostraram equivalentes, sendo o método Colilert considerado tão bom quanto, ou melhor que os métodos convencionais estudados. Nas amostras de água de recreação, o método Colilert apresentou sensibilidade igual a dos métodos convencionais na detecção de *E. coli*. Na detecção de coliformes totais, foram encontrados problemas na confirmação da presença destas bactérias em amostras analisadas pelo Colilert. Algumas delas apresentaram resultado ácido positivo, porém gás negativo, indicando a necessidade de novos estudos¹².

Em outro trabalho, foram comparadas as metodologias Colitag e FTM. O Colitag se mostrou tão sensível quanto o método convencional na detecção de coliformes em água de recreação, tanto em contagens altas como em baixas. Não foram observadas diferenças significativas entre os métodos, destacando a rapidez do método Colitag¹³.

Na comparação dos métodos FTM com os métodos rápidos Colilert e ReadyCult em amostras de água

subterrânea, de superfície e tratada, foi observado que as técnicas que utilizam substratos definidos apresentaram uma alta sensibilidade e especificidade (>95%) na detecção de coliformes totais, e coeficiente kappa próximo de 1, indicando ótima concordância com o método FTM. Tanto a detecção de coliformes totais quanto de *E. coli* foi maior pelos métodos rápidos, devido à maior capacidade de recuperação e crescimento das células de coliformes desses métodos e por eles serem específicos para *E. coli*, enquanto que o método FTM não tem tal especificidade. Apesar destas observações, os métodos não apresentaram diferenças significativas entre si¹⁴.

No presente trabalho, também não foi observada uma diferença significativa entre os métodos rápidos Colilert e Colitag e o método convencional FTM nas contagens de coliformes totais em amostras de água de abastecimento e bica e na contagem de *E. coli* em amostras de água de abastecimento, bica e rio, concordando com a literatura pesquisada.

As contagens encontradas para coliformes totais em amostras de água do rio apresentaram uma diferença significativa ao nível de 5% de significância. Tal diferença pode ser resultado da presença de microrganismos não coliformes que geram resultados falso-positivos nos métodos rápidos, tais como *Aeromonas*. Esta bactéria pode apresentar uma pequena produção da enzima β -galactosidase, enzima presente nas bactérias do grupo coliforme e usada para a detecção destas nos métodos rápidos utilizados. Assim, quando a *Aeromonas* está presente em amostras de água, essa enzima pode reagir com o substrato cromogênico do meio (ONPG), resultando em uma coloração amarela. Tal cor, nesses métodos, é indicativa da presença de coliformes totais na amostra. Os métodos Colilert e Colitag apresentam, na formulação de seus meios, mecanismos para a inibição de *Aeromonas*, mas, nesse caso, tal inibição pode ter sido insuficiente.

A ocorrência de resultados falso-positivos também foi destacada em outros trabalhos. Na comparação entre dez metodologias que utilizam substratos definidos para a detecção de coliformes totais e *E. coli*, incluindo os métodos Colilert e Colitag, foram inoculadas, em amostras de água, duas diferentes cepas de *Aeromonas*, com a finalidade de comparar a capacidade dos métodos em inibir tais organismos. Foi encontrada uma grande variação nos resultados e uma diferença significativa entre os métodos na capacidade de inibição de microrganismos não coliformes capazes de gerar resultados falso-positivos, tais como *Aeromonas*.

De modo geral, o Colilert e o Colitag apresentaram uma capacidade de inibição de *Aeromonas* aceitável, mas apresentaram alguns resultados falso-positivos⁶.

Em outro estudo, foi feita a comparação entre os métodos Colilert e a técnica da membrana filtrante. Ocasionalmente o método Colilert obteve resultados falso-positivos em amostras contendo um alto nível de contaminação por *Aeromonas*¹⁵.

Outro fato que pode explicar a diferença significativa entre os métodos rápidos e o FTM é a capacidade de recuperação de células injuriadas, que normalmente é maior nos primeiros. Dessa forma, nas amostras de água do rio poderia haver um número grande de células bacterianas injuriadas que foram recuperadas e, conseqüentemente, detectadas pelos métodos Colilert e Colitag. Como a capacidade de recuperação pelo FTM normalmente é menor, estas células não foram detectadas por este método. Ainda, poderia ser considerado o fato da não produção da enzima lactose permease, a qual é responsável pela fermentação da lactose e produção de gás, que em células injuriadas pode não ser produzida no tempo de incubação recomendado pela metodologia, o que pode gerar falso-negativos na técnica FTM. A diferença na recuperação e detecção de células bacterianas do grupo coliforme injuriadas entre os métodos rápidos e os convencionais também foi destacada em outros estudos^{12,14,16,17}.

De acordo com a literatura, o método Colitag tem como vantagem sobre o Colilert a sua capacidade de recuperação de células de *E. coli* danificadas pelo cloro. Porém, neste trabalho, tal vantagem não foi observada pela ausência dessa bactéria em amostras de água de abastecimento (clorada).

CONCLUSÃO

Em amostras de água de abastecimento e da bica, os métodos rápidos Colilert e Colitag se mostraram equivalentes ao método convencional FTM nas contagens de coliformes totais e *E. coli*.

Na análise de coliformes totais em amostras de água do rio, o método convencional FTM diferiu significativamente dos métodos rápidos Colilert e Colitag. Na comparação entre os métodos rápidos para esta mesma análise, não foi observada diferença significativa entre eles.

Na análise de *E. coli* em amostras de água do rio, ao contrário do observado para a análise de coliformes

totais, não foi encontrada diferença significativa entre os métodos utilizados (FTM, Colilert e Colitag).

Por não apresentarem diferença significativa nas contagens de coliformes totais em amostras de água de abastecimento e de bica e nas análises de *E. coli*, em todos os tipos de amostras analisadas, é recomendado o uso dos métodos rápidos Colilert e Colitag como substituto do método convencional FTM. Tal substituição se faz vantajosa devido ao menor tempo necessário para a realização das análises (24 horas nos métodos rápidos e 96 horas no convencional), ao menor custo, não à necessidade da realização de testes confirmatórios e pelos métodos rápidos serem menos trabalhosos. Com a obtenção de resultado em um período de tempo menor, é possível evitar o uso de água contaminada pela população.

REFERÊNCIAS

1. Macedo JAB de. Águas e águas. 3ª ed. Belo Horizonte:CRQ-MG; 2007.
2. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiologia. 8ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2005.
3. Franco BDGM, Landgraf M. Microbiologia dos alimentos. São Paulo: Atheneu; 2008.
4. Silva N, Catanúsio Neto R, Junqueira VCA, Silveira NFA. Manual de métodos de análise microbiológica da água. São Paulo: Varela; 2005.
5. Jay JM. Microbiologia de alimentos. 6ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2005.
6. Olstadt J, Schauer JJ, Standridge J, Kluender S. A comparison of ten USEPA approved total coliform/*E. coli* tests. *J Water Health*. 2007;5(2):267-82.
7. BioAmerica. Colitag: Exatidão, Simplicidade e Segurança. [acesso 2010 Set 29]. Disponível em: [<http://www.grupos.com.br/group/engenhariadeaquicultura/Messages.html?action=download&year=07&month=9&id=1189445991709878&attach=>].
8. Hunt HE, Rice EW, coordinators. Microbiological examinations. In: Standard methods for the examination of water & wastewater, 21ª ed. Washington: APHA; 2005. Part 9000, p. 9-1 – 9-169.
9. SAS Institute. SAS/STAT User Guide: version 6.08. Carrey. 1997. v. 2.
10. Box GEP, Cox DR. An analysis of transformations. *J R Stat Soc Series B Stat Methodol*. 1964;26:211-46.
11. Cantusio Neto R. Comparação entre os métodos de tubos múltiplos e o substrato cromogênico enzimático (ONPG/MUG), para detecção de coliformes na água tratada. *Hig Aliment*. 2001;15(90/91):64-7.

12. Eckner KF. Comparison of membrane filtration and multiple-tube fermentation by the Colilert enterolert methods for detection of waterborne coliform bacteria, *Escherichia coli* and Enterococci used in drinking water and bathing water quality monitoring in southern Sweden. *Appl Environ Microbiol*. 1998;64(8):3079-83.
13. Hsieh JJ. A comparison of the Multiple-tube fermentation method and Colitag method for the detection of waterborne coliform bacteria. [Acesso 2008 Jul 25]. Disponível em: [<http://socrates.berkeley.edu/~es196/projects/2001final/Hsieh.pdf>.]
14. Greggi S de Q. Avaliação da eficiência de métodos rápidos usados para detecção de coliformes totais e coliformes fecais em amostras de água em comparação com a técnica da fermentação em tubos múltiplos [dissertação de mestrado]. Araraquara (SP): Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”; 2005.
15. Cowburn JK, Goodall T, Fricker EJ, Walter KS, Fricker CR. A preliminary study of the use of Colilert for water quality monitoring. *Lett Appl Microbiol*. 1994;19:50-2.
16. Fricker EJ, Illingworth KS, Fricker CR. Use of two formulations of Colilert and Quantitray for assessment of the bacteriological quality of water. *Water Res*. 1997;31(10):2495-9.
17. Chao KK, Chao CC, Chao WL. Suitability of the traditional microbial indicators and their enumerating methods in the assessment of fecal pollution of subtropical freshwater environments. *J Microbiol Immunol Infect*. 2003;36(4):288-93.

Chemical and bacteriological evaluation of the water and mussels from Santos bay, São Paulo, Brazil

Avaliação química e bacteriológica na água e mexilhões da baía de Santos, São Paulo, Brasil

RIALA6/1292

Luiz Miguel CASARINI*, Marcelo Barbosa HENRIQUES, Roberto GRAÇA-LOPES, Marcelo Ricardo de SOUZA

*Endereço para correspondência: Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio do Pescado Marinho – Instituto de Pesca – APTA – SAA, Av. Bartolomeu de Gusmão, 192, Santos, SP, Brasil, 11030-906. e-mail: lumicas@pesca.sp.gov.br

Recebido: 27.04.2010 – Aceito para publicação: 03.09.2010

ABSTRACT

The seawater and *Perna perna* mussels samples were bimonthly collected from Santos bay from December 2006 to April 2008, and the occurrence of heavy metals, organic compounds and bacteria were investigated. Water and mussel meat quality were assessed following the Brazilian legislation. The analyses on heavy metals mercury, lead, zinc and cadmium contents were performed using atomic absorption spectrometry. The mussel meat was investigated by analytical methodologies following the international recommendations. Among the analyzed seawater samples, at least one sample showed chlorine, phosphorus, sulfide, total fluoride, ammoniac nitrogen, aluminum, lead and iron contents out of the established limits. In one mussel meat sample only a high peak of zinc concentration was found. The bacteriological agents found in water and mussel meat samples were sporadically above the recommended values.

Key words. *Perna perna*, mussel natural beds, bacteriological contamination, heavy metals, mussel breeding, tropical waters.

RESUMO

Amostras de água do mar e de mexilhão *Perna perna*, coletadas bimestralmente da baía de Santos, no período de dezembro de 2006 a abril de 2008, foram analisadas quanto à presença de metais pesados, compostos orgânicos e bactérias. A qualidade da água e da carne de mexilhão foi avaliada seguindo-se a legislação brasileira. As análises dos metais pesados mercúrio, chumbo, zinco e cádmio foram realizadas pela técnica de espectrometria de absorção atômica. As amostras de carne de mexilhão foram analisadas de acordo com as recomendações internacionais. Entre as amostras de água do mar, pelo menos uma apresentou teor de o cloro, fósforo, sulfeto, fluoreto total, nitrogênio amoniacal, alumínio, chumbo e ferro fora dos limites estabelecidos. Apenas uma amostra de carne do mexilhão apresentou pico elevado de concentração de zinco. Os agentes bacteriológicos analisados nas amostras de água e de carne estavam esporadicamente acima dos valores recomendados.

Palavras-chave. *Perna perna*, banco de mexilhões, contaminação bacteriológica, metais pesados, cultivo mexilhões, águas tropicais.

INTRODUCTION

Bivalve mollusks of the Mytilidae family, commonly called mussels, are widely used in the human diet as a source of animal protein. They present low cost and high nutritional value, and are represented in Santos bay and estuary by the species *Perna perna*, *Mytella falcata* and *M. guyanensis*¹.

The bay-estuary complex of Santos continually gives rise to concern regarding its biological and social characteristics, since it is not only considered a nursery and mussel producer, but also shelters human communities that survive through extracting these resources. This environment is intensely impacted by many anthropic activities that may have implications for public health due to human consumption of mussels².

At certain concentrations, organic compounds and heavy metals present in the water can make consumption of extracted bivalves impossible. Disease outbreaks relating to eating these organisms have been reported on several continents, especially associated with gastrointestinal problems, with some reports of fatal cases³.

High concentrations of metals in the water directly affect these organism's physiology, causing valve closure for long periods, thus damaging growth⁴. Pessatti et al⁵ reported that the effect of lead on *P. perna* mussels decreases food absorption, thereby negatively altering the energy flow of the animal's metabolism.

Considering the importance of *Perna perna* mussel consumption within the local scenario and the possibility of implementation of future commercial cultivation in the region, the chemical and bacteriological aspects of the seawater and soft tissue (meat) of individuals of this species, extracted from the bay of Santos, were evaluated.

MATERIALS AND METHODS

Samples of *P. perna* mussels and seawater were gathered every two months (December 2006, February 2007, April 2007, June 2007, August 2007 and November 2007) in Santos bay (Figure 1). This area is located on the south coast of the state of São Paulo and is a part of the estuarine complex of Santos. It is geographically delimited by the island of São Vicente to the north and by two rocky promontories to the east and west, and three different municipalities border the bay: Guarujá, Santos and São Vicente.

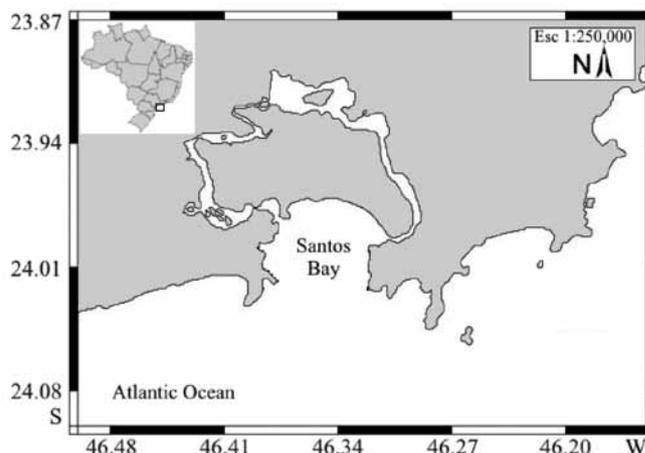


Figure 1. Map of Santos bay with the latitude (S) and longitude (W) coordinates in degrees
(Fonte: NOAA/NGDC Marine Geology and Geophysics Division)

Each sample consisted of 3.0 kg of the bivalves, extracted from the natural mussel beds. The samples were washed with seawater at the location and were stored in an isothermal box for transportation to the laboratory, where all the encrusted organisms were removed.

The water analyses followed the recommendations of Article 18 of the National Environmental Council (Conselho Nacional de Meio Ambiente – CONAMA) Resolution No. 357 of 2005⁶, regarding Class 1 saline waters, i.e. waters ideal for breeding aquatic organisms.

The following parameters were evaluated: thermotolerant coliforms; chemical elements/inorganic substances (aluminum, arsenic, barium, beryllium, boron, cadmium, lead, cyanide, residual chlorine, copper, chromium, iron, fluoride, phosphorus, manganese, mercury, nickel, nitrate, nitrite, ammoniacal nitrogen, silver, selenium, sulfides, thallium, uranium and zinc) and organic pesticide substances: aldrin/dieldrin, benzene, benzinidine, benzo(a)anthracene, benzo(a)pyrene, benzo(b)fluoranthene, benzo(k)fluoranthene, carbaryl, chlordane, 2-chlorophenol, chrysene, DDT, demeton, dibenzo(a,h)anthracene, dichlorobenzidine, dichloroethane, dichloroethene, dodecachloride, endosulfan, endrin, ethylbenzene, total phenols, gution, heptachlorine, hexachlorobenzene, indeno(1,2,3-cd)pyrene, lindane, malathion, methoxychlor, monochlorobenzene, PCBs (polychlorinated biphenyls), pentachlorophenol, tetrachloroethene, toluene, toxaphene, tributyltin, trichlorobenzene, trichloroethene and trichlorophenol.

The recovery standards were carried out with dibromofluoromethane, toluene-d8 and bromofluorobenzene, selected as representatives of the

different classes of volatile organic compounds (VOC). The validation parameters of the method were the estimated precision, based on the coefficient of variation between repetitions, and the accuracy of the mean recovery between repetitions, detection limits and quantification⁷.

The analytical methods followed the recommendations of the Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods⁸ and the Bacteriological Analytical Manual⁹.

The analysis of bacteriological contamination followed Directive RDC No. 12, 7a of Jan 2, 2001, from the National Agency of Sanitary Surveillance (Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA), Ministry of Health, which establishes the following maximum values: coliform bacteria of fecal origin must not surpass 10². 25g⁻¹ of meat; absence of *Salmonella* sp in 25 g of meat; most probable number (MPN) of 10³.g⁻¹ for *Staphylococcus aureus* and does not provide values for *Vibrio parahaemolyticus*.

Contamination by heavy metals (mercury, lead, zinc and cadmium) was evaluated by means of atomic absorption spectrometry in accordance with EPA 3050/6010B (USA). To prepare the samples, the method described by the Association of Official Analytical Chemists was used¹⁰.

The concentrations of zinc in the mussel meat were compared with the maximum allowed value (MAV) as stated by CONAMA Resolution 357, by means of the two-tailed t-test. The values of the inorganic and organic parameters given by this Resolution for seawater and the parameters for mussel meat were subjected to principal component analysis

(PCA) to determine the structure of the data and to reduce the number of variables. To minimize the scale differences, the variables were standardized based on a correlation matrix¹¹.

The MPN values for total and fecal coliforms obtained in the bacteriological assays were analyzed using the generalized linear model (GLM) protocol, with a model of the form: $Y_{ijk} = \mu + \alpha_j + \beta_k + \gamma_l + \text{interactions} + \epsilon_{ijk}$, where Y_{ijk} = dependent variable (MPN) of the coliforms i , in the medium j , during the month k ; μ = constant (mean population); and the independent variables are α_j = type of coliforms, β_k = medium (water or meat), γ_l = month and ϵ_{ijk} = random error component¹².

RESULTS

The analytical methods were efficient (recovery between 81 and 126 % and CV < 25% of the matrix spike), considering the acceptance rate between 45 and 135%. The quantification of the heavy metals analyzed in the mussel meat was 0.05 mg.kg⁻¹ (Pb), 0.02 mg.kg⁻¹ (Cd) and 0.05 mg.kg⁻¹ (Hg).

Among the various parameters established in Article 18 of CONAMA Resolution No. 357/2005 for water quality during the study period, chlorine, phosphorus, total fluoride, ammoniacal nitrogen, aluminum, lead and iron presented samples that were slightly outside of the established limits. However, nitrate and sulfide presented greater variations in relation to the MAV, with peaks in December 2006 for sulfide and in February 2007 for nitrate (Table 1).

Table 1. Concentrations (mg.L⁻¹) of the parameters detected above the MAV in seawater gathered in Santos bay, from December 2006 to April 2008

Parameters	MAV*	Month-Year					
		Dec 06	Feb 07	Apr 07	Jun 07	Aug 07	Nov 07
Dissolved aluminum	1.500	0.047	0.174	0.000	0.000	0.000	2.188
Total lead	0.010	0.000	0.000	0.015	0.000	0.000	0.000
Free chlorine	0.010	0.050	0.000	0.000	0.090	0.000	0.000
Dissolved iron	0.300	0.111	0.168	0.137	0.000	0.140	0.900
Total fluoride	1.400	1.350	0.000	2.760	0.000	0.000	0.683
Total phosphorus	0.062	0.225	0.335	0.000	0.000	0.000	0.000
Nitrate	0.400	1.460	21.180	0.000	10.930	13.030	4.660
Total ammoniacal nitrogen	0.400	0.170	0.025	1.090	1.070	0.000	0.290
Sulfide	0.002	16.000	0.003	0.000	0.000	0.007	0.000

*MAV – Maximum Allowed Values (mg.L⁻¹) according to Article 18 of CONAMA Resolution 357/2005

Most of the contaminants detected in non-permitted concentrations cause eutrophication in water. Lead is the only contaminant that can trigger problems due to bioaccumulation. However, the values for this metal in water were only slightly beyond the limit (0.01 mg.L⁻¹), and the bivalves did not present contamination. Zinc was the only metal found in high concentrations in these organisms, even if only in April 2007, with no statistical difference ($t: P = 0.629$) when testing the mean of all the concentrations against the MAV (Figure 2). As well as lead and zinc, mercury and cadmium were also investigated in the bivalve meat, and were within the limits established by the legislation.

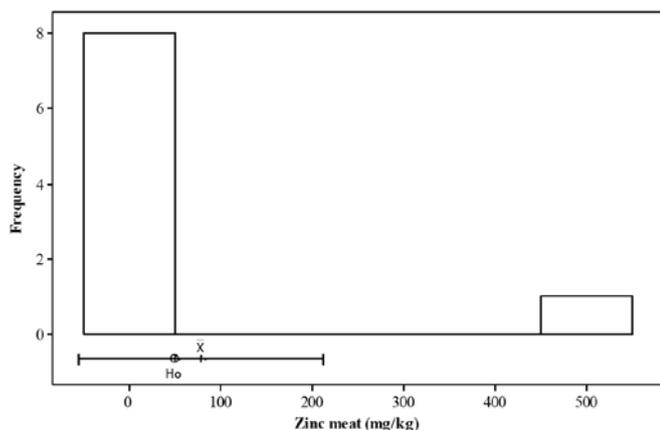


Figure 2. Distribution of zinc concentration frequencies in *Perna perna* meat, gathered in Santos bay, from December 2006 to April 2008. $H_0 = \text{MAV} = 50.0 \text{ mg.kg}^{-1}$ and sample mean = 79.0 mg.kg^{-1}

The variation (eigenvalue) of the first principal component was 6.24 and explained 31.2% of the total variation. The coefficients were estimated based on the following values: 0.37 nitrites; 0.33 fluorides; 0.33 zinc in the meat; 0.32 lead in the water and also in the meat, influenced by the levels of nitrite, fluoride and zinc effects, since all the coefficients of these terms presented the same sign and are not close to zero.

The variation of the second principal component was 5.12 and explained 25.6% of the data variability. This component can be interpreted as the level of cadmium contrast in the meat and of phosphorus contrast in the water. The most important eigenvectors forming the third principal component were chlorine, anionic surfactants, copper and barium in water.

Together, the first two and the first three principal components represented 56.8% and 76.0% of the total variability, respectively. Thus, most of the data structure

was captured within these three underlying dimensions. The remaining principal components explained a very small proportion of the variability and were considered as being of no statistical significance (Figure 3).

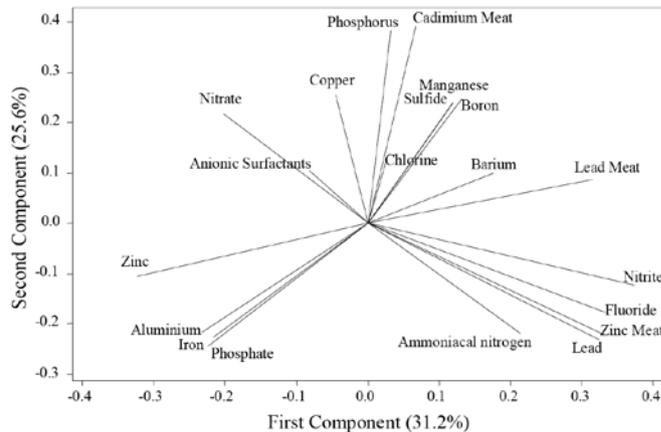


Figure 3. Principal component analysis (PC-1 and PC-2) at the factor level of organic and inorganic parameters in seawater and meat from *Perna perna* extracted from natural mussel beds in Santos bay

In the microbiological analysis for *Vibrio parahaemolyticus*, the values remained below of $\text{MPN}_{\text{max}} = 10^3 \text{ mL}^{-1}$, except in August 2007 with $\text{MPN} = 1.3 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$. Contamination above the MPN for coliforms in mussel meat was only found in the sample from October/November 2007. The GLM model detected a significant variation of the MPN values, with $n = 24$ and $r^2 = 0.64$, only for the factor “medium” ($P = 0.003$). The factors “type of coliform” ($P = 0.148$) and “month” ($P = 0.064$) were not statistically important in the total variation (Figure 4).

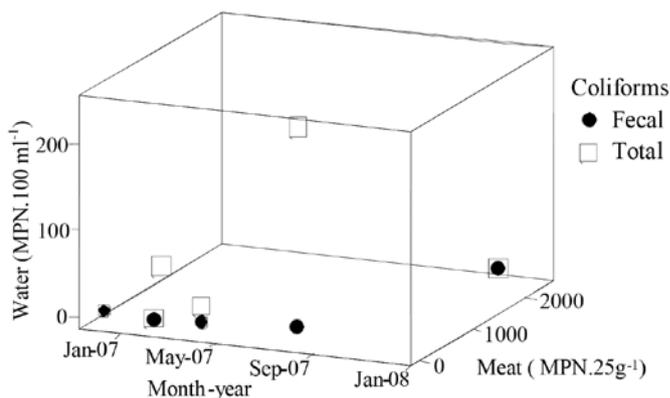


Figure 4. MPN values of coliforms in seawater and meat from *Perna perna* mussels extracted from natural mussel beds in Santos bay

DISCUSSION

In the seawater, nitrate and sulfide presented, respectively, concentrations that were 53 and 8000 times above the MAV. In the case of nitrate, this occurrence could be related to the load of organic matter coming from the estuary. This condition was observed by Araujo et al¹³, when studying the dynamics of zooplankton in urbanized estuaries.

Compounds at concentrations above the MAV can cause eutrophication of the environment, thereby making it easier for mussels to incorporate heavy metals. According to Rainbow¹⁴, marine bivalves are more exposed to contamination by particles in suspension in the water than by the dissolved fraction that needs to be incorporated into the plankton in order to transfer the contamination load to the bivalve.

The peak of zinc found in the mussel meat in April 2007 may indicate the occurrence of positive tropism. Bat et al¹⁵ reported that this metal participates in the metabolism of different species of mollusks capable of concentrating it, even if the presence of this element in water is not permanently above the MAV established by legislation. Sokolowski et al¹⁶ concluded that zinc is regulated by physiological mechanisms that are capable of increasing bioaccumulation, especially in the sexual products of females during spawning periods, regardless of the concentration levels found in seawater. The zinc concentration values observed in the meat from mussels of Santos bay may be related to reproduction. However, Galvao et al¹⁷ registered reproductive peaks for *P. perna* in January and September.

For Nolan e Dahlgaard¹⁸, zinc is an essential element for mussels and is necessary for forming various biological molecules, among them structural proteins and enzymes. Jorge et al¹⁹ showed in laboratory assays that *P. perna* larvae react negatively to the presence of zinc sulfate, by reducing their aerobic metabolism.

Zinc is related not only to the life cycle of mussels, but also to that of other bivalves. Studying bioaccumulation of pollutants²⁰ among different groups of mollusks in the Todos os Santos bay (Bahia, Brazil), observed concentrations of zinc above the MAV for the oyster *Crassostrea rhyzophorae*.

Avelar et al²¹ detected relatively high values of lead and chromium among *P. perna* bivalves in January and July at the Itaguá beach, Ubatuba bay, SP. Baraj et al²² evaluated the contamination by lead, cadmium, copper,

zinc, chromium, manganese and iron for the same bivalve along 800 km of the southern coast of Brazil and found that the concentrations were below the MAV.

Sidoumou²³ analyzed bioaccumulations of cadmium, copper and zinc in *P. perna* from the coast of Senegal and observed cadmium in mean concentrations of 2.37 mg.kg⁻¹. In this study, the highest concentration of this heavy metal found in mussel meat was 0.25 mg.kg⁻¹, i.e. one fourth of the MAV.

In another study²⁴, levels of Pb, Cd, Hg, Cu and Zn were analyzed in samples of natural beds of mussels from the coast of Sao Paulo State, Brazil. In all samples of *P. perna* and *M. falcata* analyzed metals were below the limit. While in oysters *C. brasiliiana*, Zn concentration was above the legal limit.

The bacteriological contamination in the water and meat of *P. perna* did not present any kind of pattern, only occasional peaks. Previous studies carried out at the same place showed oscillations in the levels of these contaminations, with a possible association with periods of intense rain and greater population density^{25,26}. According to current legislation in Brazil, the occurrence of only a single case of meat contamination condemns the product with regard to human consumption²⁷. This contamination is detected in analyses of the water from where the animals are extracted, unlike the norms used by the European Union, which are based on analyses of the meat²⁷.

It was observed that in the analyses subsequent to those with bacteriological contamination, the mussels presented approved quality, thus demonstrating that there was natural cleansing. For this reason, establishing rejection criteria based on maximum occurrence frequency of contaminated samples, as is done in the European Union, could also be adopted in Brazil.

CONCLUSIONS

The evaluation on the chemical and bacteriological quality of *P. perna* meat showed that extraction of these mussels from Santos bay for consumption needs constant sanitary quality monitoring, due to the lack of predictability of the contaminating agents. These data, when gathered periodically and systematically, especially from batches prior to extraction, may serve to monitor the environment, so as to offer a product with certified quality to consumers.

Considering the low incidence of contaminated meat and seawater samples, it is proposed that an additional criterion based on the maximum percentage occurrence of contaminated samples from the exploitation or cultivation site should be applied before condemning the suspected batch.

ACKNOWLEDGEMENTS

To FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) for the financial support (Process number 2006/52346-4).

REFERENCES

1. Fagundes L, Henriques MB, Ostini S, Gelli VC. Custos e Benefícios da mitilicultura em espinhel no sistema empresarial e familiar. *Informações Econômicas*. 1997; 27(2): 33-54.
2. Silva NJR, Reno SF, Henriques MB. Atividade extrativa do mexilhão *Perna perna* em bancos naturais da baía de Santos, estado de São Paulo: uma abordagem sócio-econômica. *Informações Econômicas*. 2009; 39(9): 62-73.
3. Potasman I, Paz A, Odeh M. Infectious outbreaks associated with bivalve shellfish consumption: a worldwide perspective. *Clin Infect Dis*. 2002; 35: 921-8.
4. Kraak MHS, Ainscough C, Fernández A, Vlaardingen P, Voogt P, Admiraal WA. Short-term and chronic exposure of the zebra mussel (*Dreissenia polymorpha*) to acridine: effects and metabolism. *Aquat Toxicol*. 1997; 37: 9-20.
5. Pessatti ML, Resgalla JRC, Reis Filho RW, Kuehn J, Salomão LC, Fontana JD. Variability of filtration and food assimilation rates, respiratory activity and multixenobiotic resistance (MXR) mechanism in the mussel *Perna perna* under lead influence. *Braz J Biol*. 2002; 62(4): 651-6.
6. Brasil. Resolução CONAMA (Conselho Nacional de Meio Ambiente) n° 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. 2005. Seção 1, n° 53. p. 58-63.
7. Ramsey MH, Ellison SLR, editors. *Eurachem/EUROLAB/CITAC/Nordtest/AMC Guide. Measurement uncertainty arising from sampling: a guide to methods and approaches*. Eurachem; 2007.
8. Vanderzant C, Splittstocsser DF. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 3^a ed. Washington (U.S.A.): American Public Health Association; 1992.
9. United States Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. 7^a ed. Arlington (U.S.A.): A.O.A.C. International; 1992.
10. AOAC. Association of Official Analytical Chemists. *Official methods of analysis*. 15^a ed. Washington (D.C.); 1995.
11. Santiago-Rivas S, Moreda-Piñeiro A, Barciela-Alonso MC, Bermejo-Barrera P. Characterization of raft mussels according to total trace elements and trace elements bound to metallothionein-like proteins. *J Environ Monit*. 2009; 11: 1389-96.
12. Sonier R, Mayrand E, Ouellette M, Boghen AD, Mallet V. Spatial and temporal faecal coliform variations in surface water, sediments and cultivated oyster's meat, *Crassostrea virginica*, from Richibucto estuary, New Brunswick. *Can Tech Fish Aquat Sci*. 2006; 2658: 28.
13. Araujo HMP, Nascimento-Vieira DAB, Neumann-Leitão SB, Schwamborn RC, Lucas APOA, Alves JPHD. Zooplankton community dynamics in relation to the seasonal cycle and nutrient inputs in an urban tropical estuary in Brazil. *Braz J Biol*. 2008; 68(4): 751-62.
14. Rainbow PS. Biomonitoring of Heavy Metal Availability in the Marine Environment. *Mar Poll Bull*. 1995; 31(4-12): 183-92.
15. Bat L, Gündogdu A, Öztürk M. Copper, Zinc, Lead and Cadmium Concentrations in the Mediterranean Mussel *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 from the Sinop Coast of the Black Sea. *Tr J of Zoology*. 1999; 23: 321-6.
16. Sokolowski A, Bawazir AS, Wolowicz M. Trace metals in the brown mussel *Perna perna* from the coastal waters off Yemen (Gulf of Aden): How concentrations are affected by weight, sex, and seasonal cycle. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2004; 46(1): 67-80.
17. Galvão MSN, Henriques MB, Pereira OM, Marques HLA. Ciclo reprodutivo e infestação parasitária de mexilhões *Perna perna* (Linnaeus, 1758). *B Inst Pesca*. 2006; 32(1): 59-71.
18. Nolan C, Dahlggaard H. Accumulation of metal radiotracers by *Mytilus edulis*. *Mar Ecol Prog Ser*. 1991; 70: 165-74.
19. Jorge R, Lemos D, Moreira GS. Effect of zinc and benzene on respiration and excretion of mussel larvae (*Perna perna*) (Linnaeus, 1758) (Mollusca; Bivalvia). *Braz J Biol*. 2007; 67(1): 111-5.
20. Amado-Filho GM, Salgado LT, Rebelo MF, Rezende CE, Karez CS, Pfeiffer WC. Metais pesados em organismos bentônicos da Baía de Todos os Santos, Brasil. *Braz J Biol*. 2008; 68(1): 95-100.
21. Avelar WE, Mantelatto FL, Tomazelli AC, Silva DM, Shuhama T, Lopes JL. The marine mussel *Perna perna* (mollusca, bivalvia, mytilidae) as an indicator of contamination by heavy metals in the Ubatuba Bay, São Paulo, Brazil. *Water, Air, & Soil Pollution*. 2000; 118(1-2): 65-72.
22. Baraj B, Niencheski LF, Corradi C. Trace metal content trend of mussel *Perna perna* (Linnaeus, 1758) from the Atlantic Coast of Southern Brazil. *Water, Air, & Soil Pollution*. 2003; 145(1-4): 205-14.
23. Sidoumou Z, Gnassia-Barelli M, Siau Y, Morton V, Romeo M. Heavy metal concentrations in molluscs from the Senegal coast. *Environ. International*. 2006; 32: 384-7.
24. Pereira OM, Henriques MB, Zenebon O, Sakuma A, Kira CS. Determinação dos teores de Hg, Pb, Cd, Cu e Zn em moluscos (*Crassostrea brasiliiana*, *Perna perna* e *Mytella falcata*). *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2002; 61(1): 19-25.

25. Henriques MB, Marques HLA, Lombardi JV, Pereira OM, Brossi-Garcia A. Influência da contaminação bacteriológica sobre a resistência do mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758) à exposição ao ar. *Arq Cienc Mar*. 2003; 36: 95-9.
26. Henriques MB, Zamarioli LA, Pereira OM, Faustino JS. Contaminação bacteriológica no tecido mole do mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758) nos bancos naturais do litoral da Baixada Santista, Estado de São Paulo. *Arq Cienc Mar*. 2003; 33: 69-76.
27. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC n° 33, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial [da] União. Brasília, DF, 10 jan. 2001. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm].
28. Alzieu C. Water. The medium of culture. *In*: Munday B, Eleftheriou A, Kentouri M, Divanach P. The Interactions of Aquaculture and the Environment: a Bibliographical Review. Belgium: Commission of the European Communities, DG Fisheries; 1989.

Qualidade microbiológica e físico-química da polpa e *mix* de açaí armazenada sob congelamento

Microbiological quality and physical-chemical characteristics of the frozen pulp and blended açaí

RIALA6/1293

Denise Kaori ETO¹, Aline Midori KANO¹, Maria Teresa Mendes Ribeiro BORGES², Caetano BRUGNARO², Sandra Regina CECCATO-ANTONINI², Marta Regina VERRUMA-BERNARDI^{2*}

*Endereço para correspondência: Departamento de Tecnologia Agroindustrial e Socioeconomia Rural, CCA, UFSCar. Via Anhanguera, Km 174. CP. 153, CEP:13600-970, Araras, SP, Brasil, e-mail: verruma@cca.ufscar.br

¹Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Araras, SP, Brasil

²Departamento de Tecnologia Agroindustrial e Socioeconomia Rural, CCA, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Araras, SP, Brasil

Recebido: 15. 07.2010 – Aceito para publicação: 16.08.2010

RESUMO

Polpas e *mix* de açaí (*Euterpe oleracea* Mart) congeladas e comercializadas na região de São Carlos, SP foram analisadas quanto às características microbiológicas e físico-químicas. Nas amostras sob congelamento durante 0, 3, 6 e 9 meses foram investigadas a contaminação *Salmonella*, coliformes totais e fecais. Os parâmetros físico-químicos avaliados foram lipídeos totais, pH, umidade, cinzas, proteínas, sólidos totais, açúcares redutores e não redutores. Todas as amostras de diferentes marcas e tempo de armazenamento investigadas demonstraram ausência de bactéria. Nos parâmetros físico-químicos, constatou-se diferença significativa entre as marcas de produtos, bem como entre amostras em diferentes tempos de armazenamento; contudo, para pH não houve variação significativa entre as amostras estocadas em diferentes períodos de tempo. As amostras analisadas apresentaram conformidade com a legislação no aspecto higiênico sanitário e as variações encontradas nas análises físico-químicas evidenciam que, mesmo sob congelamento, as reações químicas continuam a ocorrer no alimento.

Palavras-chave. polpa de fruta congelada, controle de qualidade, conservação de alimentos.

ABSTRACT

This study aimed at assessing the microbiological and physical-chemical parameters of frozen pulp and blended açaí (*Euterpe oleracea* Mart) from brands marketed in São Carlos, São Paulo State. The samples kept frozen for 0, 3, 6 and 9 months were analyzed on *Salmonella*, total/fecal coliforms contamination, and on parameters as total lipids, pH, humidity, ash, proteins, total solids, reducing and non-reducing sugars. No *Salmonella* and total/fecal coliforms were found in samples from all products brands and stored at different period of months, being in compliance with Brazilian legislation. On physical-chemical analyses, a significant difference among the product brands and storage times was found; but for pH, no significant difference was found in the product storing time. All of the samples were in accordance with the hygienic standards parameters, and the alterations verified on the physical-chemical analysis evidenced that even under freezing storage, the chemical reactions still continue to occur in the food.

Key words. frozen fruit pulp, quality control, preservation food.

INTRODUÇÃO

O açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) é uma frutadeira típica do Norte do Brasil que produz frutos pequenos, arredondados e de coloração roxo-escuro em decorrência da presença de pigmentos naturais denominados antocianinas¹.

O interesse por esse fruto no mercado nacional vem crescendo cada vez mais devido ao seu alto valor energético e por apresentar valores consideráveis de fibra alimentar². Além disso, é um alimento rico em lipídios, proteínas, vitamina E e minerais, como manganês, boro, cromo e cobre^{2,3}. Contudo, o fruto é extremamente manipulado durante toda a cadeia produtiva do suco, o que propicia a presença de uma alta carga microbiana, sendo este um dos fatores responsáveis pela sua deterioração⁴.

A polpa desse fruto tem sido objeto de alguns estudos em decorrência do seu valor nutritivo e sensorial^{2,5,6}, sendo inclusive considerada como um alimento funcional devido ao seu grande conteúdo de antocianinas, pigmentos responsáveis pela coloração característica do fruto^{6,7,8,9}.

O açaí é um alimento altamente calórico devido ao alto percentual em matéria graxa, seu principal nutriente. Segundo Rogez³, o ácido oleico é o mais abundante (54,9%), seguido do ácido palmítico (25,9%)¹⁰; valores semelhantes (53,9% e 26,7% respectivamente) foram obtidos por Schauss et al¹¹.

Essa bebida contém teores de proteínas e glicídios assimiláveis (glicose, frutose e sacarose) relativamente baixos, 1,26 e 0,37 g/100 mL de açaí médio, respectivamente, devendo ser ressaltado que esses teores são insuficientes para suprir as necessidades dos consumidores. Porém, embora a concentração de açúcares redutores seja reduzida, as quantidades presentes são suficientes para promover a reação de *Maillard* com componentes nitrogenados da polpa, resultando na formação de polímeros marrons, as melanoidinas, quando submetidas a métodos de conservação que envolvem calor¹². Ressaltando que o Açaí médio é a polpa extraída com adição de água, filtração, apresentando valores entre 11 e 14% de sólidos totais e aparência densa - Regulamento Técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpa de fruta do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA)¹³.

Nas regiões produtoras, a polpa de açaí é comercializada normalmente à temperatura ambiente, quando o seu consumo é imediato ou após certo período

de refrigeração e, é congelada, quando o seu consumo se destina aos comércios distantes². Porém, esse método de conservação provoca alguns danos irreversíveis ao alimento, como perdas vitamínicas, alterações reológicas e de cor, que modificam as propriedades originais do produto⁶. O açaí é altamente perecível e de fácil deterioração. À temperatura ambiente, sua durabilidade é de poucas horas e, sob refrigeração, o tempo máximo de conservação é de 12 horas^{2,5,14}. A ANVISA¹⁵, em 02 de janeiro de 2001, colocou em vigor a RDC nº 12, que regulamenta padrões microbiológicos em alimentos e, em particular para sucos e polpas, fixou o limite máximo de 10² NMP/g de coliformes fecais de polpa e ausência de salmonela em 25 g de produto.

Além das exigências legais, para melhor caracterização da carga microbiana de polpa de açaí, também devem ser realizadas determinações de bactérias mesófilas, pois são comumente empregadas para indicar a qualidade sanitária de alimentos. Apesar da legislação atual não utilizar esse procedimento para condenar um produto de frutas, um número elevado dessas bactérias indica que o alimento é insalubre e, que dentre esses organismos existem alguns que são patógenos¹⁶.

De acordo com Rogez et al¹⁷, a contaminação microbiológica do açaí ocorre pela conjunção dos seguintes fatores: o substrato é propício para o crescimento dos contaminantes (não ácido, não doce); a razão entre a superfície da fruta em contato com o ar e o peso da polpa é considerável (polpa de pequena espessura - 1 mm); a palmeira de açaí cresce em meios tropicais muito úmidos e quentes, o que é propício ao crescimento de microrganismos e de insetos; a falta de cuidado durante a colheita e o transporte da fruta é a origem de contaminação suplementar pelo contato com superfícies contaminadas (solo, plásticos, recipientes etc.).

Diante disso, a segurança alimentar é um desafio atual, devendo ser analisada ao longo de toda cadeia alimentar. Desse modo, a fiscalização da qualidade dos alimentos deve ser realizada não só no produto final, mas também em todas as etapas da produção, desde a colheita, transporte, armazenamento e processamento, até a distribuição final ao consumidor¹⁸.

A qualidade de um produto passou a ser considerada a chave para o sucesso em qualquer ramo de atividade como forma de manter-se em níveis de competitividade. O consumidor tem se mostrado mais atento e consciente ao adquirir um produto, exigindo qualidade tanto na embalagem como na composição e no valor nutricional¹⁹.

Considerando o crescente aumento na comercialização/consumo de polpa de fruta congelada, o presente estudo teve como objetivo avaliar as características microbiológicas e físico-químicas de polpas de açaí pasteurizadas e congeladas, durante 9 meses.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Seis diferentes marcas de polpa *mix* de açaí pasteurizadas e congeladas, adquiridas diretamente do distribuidor e provenientes da cidade de São Carlos, foram usadas neste estudo, sendo que três, dentre as seis marcas estudadas, continham xarope de guaraná na sua formulação (amostras A, B, C), que são denominadas *mix* por se tratarem de polpas de açaí adicionadas a xarope de guaraná. As demais polpas foram codificadas com as letras D, E e F (polpas integrais).

A escolha das marcas teve como critério as informações na rotulagem, tais como: designação do produto, razão social e endereço do fabricante, peso líquido, ingredientes, data de fabricação, período de validade. As amostras foram transportadas ao laboratório sob refrigeração em caixa de isopor, sendo, então, armazenadas sob congelamento (-18°C) para posteriores análises microbiológicas e físico-químicas. Estas foram analisadas imediatamente após a compra (Tempo 0), e após 3, 6 e 9 meses de estocagem (Tempos 1, 2, e 3, respectivamente).

Análises microbiológicas

As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular - UFSCar e, foram avaliadas nos quatro diferentes tempos quanto a coliformes totais e fecais (Petrifilm - AOAC 991.14 - 3M Microbiology) e *Salmonella* (kit 1-2 Test - AOAC 989.13 – BioControl).

Análises físico-químicas

Os seguintes parâmetros foram analisados: pH, umidade, cinzas e proteínas (AOAC)²⁰, acidez titulável, sólidos totais (Instituto Adolfo Lutz)²¹, lipídeos totais (Bligh-Dyer)²², açúcares redutores em glicose, açúcares não redutores em sacarose^{23,24}. As análises de pH, umidade, cinzas, proteínas, lipídeos totais, sólidos totais, açúcares redutores em glicose e açúcares não redutores em sacarose foram realizadas no Laboratório de Análises e Simulação Tecnológica (LAST) do Departamento de Tecnologia Agroindustrial e Socioeconomia Rural do Centro de Ciências Agrárias da UFSCar.

Análise estatística

Os dados obtidos para os parâmetros físico-químicos foram submetidos à análise de variância e à comparação múltipla entre médias (teste de Tukey), tendo-se adotado 5% como nível de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise microbiológica

Os resultados microbiológicos de *Salmonella*, coliformes totais e fecais das polpas de açaí, pasteurizadas e congeladas, demonstraram ausência desses elementos em todas as marcas e tempos de armazenamento, portanto as amostras encontram-se de acordo com as especificações exigida pela legislação vigente¹⁵ que especifica ausência de *Salmonella* em 25 g do produto e o limite máximo de 100 NMP de coliformes a 45°C/g de polpa de açaí. Entretanto, Veloso e Santos⁴, pesquisando coliformes a 35°C/g de polpa açaí, constataram níveis superiores a 2400 NMP/g de suco, enquanto que Rogez³, analisando 26 amostras de açaí, encontrou valores maiores que 1100 NMP de coliformes a 45°C/g de açaí, valores que estão acima dos limites estabelecidos pela legislação da ANVISA¹⁵. Resultados microbiológicos do suco de açaí *in natura* coletado nas três feiras de Manaus, obtidos por Souza et al²⁵, demonstraram elevada contaminação de coliformes totais e fecais, bolores e leveduras.

Análises físico-químicas

Os resultados analíticos físico-químicos das polpas de açaí estão dispostos nas Tabelas 1 a 5. De acordo com resultados para o parâmetro pH (Tabela 1), foi verificado que houve diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) entre as marcas e não houve diferença entre os tempos de armazenamento, com exceção do tempo 0. As polpas de açaí apresentaram pH variando de 3,35 a 4,79, o que indica que nem todos os valores estão dentro dos padrões estabelecidos pelo MAPA¹³, que dispõe uma margem de pH de 4,00 a 6,20. Observa-se que apenas as marcas E e F estavam de acordo com os padrões estabelecidos, durante todos os tempos de armazenamento.

Quanto ao parâmetro umidade (Tabela 1), foi constatada diferença estatística significativa entre as marcas e os tempos de armazenamento. Verifica-se que as amostras D, E e F, por não possuírem em sua composição o xarope de guaraná, apresentaram valores de umidade superiores às amostras A, B e C.

Tabela 1. Variação do pH e umidade das polpas de açaí durante o armazenamento

pH									
Tratamentos	Tempo 0		Tempo 1		Tempo 2		Tempo 3		
A	3,500	cB	4,350	bA	4,417	bA	4,407	bA	
B	3,350	cB	4,200	bA	4,180	cA	4,143	cA	
C	3,450	cB	3,953	cA	4,043	cA	3,910	dA	
D	3,350	cB	4,300	bA	4,393	bA	4,280	bcA	
E	4,000	bB	4,750	aA	4,787	aA	4,773	aA	
F	4,400	aB	4,650	aA	4,790	aA	4,660	aA	

Umidade									
Tratamentos	Tempo 0		Tempo 1		Tempo 2		Tempo 3		
A	69,857	dA	68,731	eB	69,596	dAB	68,853	eAB	
B	82,420	cA	81,901	cA	82,043	cA	82,763	cA	
C	70,167	dAB	70,866	dA	69,355	dB	71,109	dA	
D	93,722	bA	92,225	bB	90,661	bC	90,961	bC	
E	95,011	aA	94,043	aAB	93,012	aC	93,105	aBC	
F	93,035	bA	92,225	bAB	91,368	bB	93,151	aA	

Obs.: valores seguidos de letras iguais não diferem estatisticamente entre si; tratamentos na vertical (minúsculas) e subparcelas na horizontal (maiúsculas)

A Instrução Normativa nº 01, do MAPA¹³ de 07/01/2000, classifica o açaí de acordo com a adição ou não de água e seus quantitativos durante o processo de extração da polpa: Polpa de açaí – polpa extraída sem adição de água; Açaí grosso ou especial (Tipo A) – valores acima de 14% de sólidos totais; Açaí médio ou regular (Tipo B) – valores entre 11 e 14% de sólidos totais e Açaí fino ou popular (Tipo C) – valores entre 8 e 11% de sólidos totais. Portanto as amostras D, E e F não atendem à legislação e possuem teores de sólidos totais abaixo de 8, ou seja, foram diluídas, o que foi confirmado com a determinação de umidade.

Os resultados encontrados para o teor de sólidos totais (Tabela 2) apresentaram diferença significativa entre as marcas e tempos de armazenamento. As amostras que continham xarope de guaraná apresentaram valores

bem superiores em sua composição, quando comparadas às amostras sem xarope de guaraná, porém os valores obtidos não ultrapassaram 31,27 g/100 g de polpa. Esta diferença entre as amostras pode ser justificada justamente pela presença do xarope de guaraná, que as tornaram menos diluídas em relação às que não continham o xarope e, portanto, com mais sólidos solúveis em 100 g de polpa. Quanto às polpas sem xarope, as mesmas estão fora das normas, pois de acordo com a Instrução Normativa¹³, o açaí popular deverá ter no mínimo 8% de matéria seca, e as 3 amostras apresentam no máximo 7% (amostra F).

Com base nos resultados obtidos para cinzas (Tabela 3), foi verificada diferença estatística significativa para todas as marcas e tempos de armazenamento. Os valores encontrados variaram de 0,12 a 0,34%, porém o MAPA¹³ não estabelece limites para este parâmetro.

Tabela 2. Variação do teor sólidos totais das polpas de açaí durante o armazenamento

Tratamentos	Tempo 0		Tempo 1		Tempo 2		Tempo 3	
A	30,143	aB	31,269	aA	30,121	aB	31,200	aA
B	17,580	bA	18,100	cA	18,006	bA	17,168	cA
C	29,833	aAB	29,135	bB	30,558	aA	28,866	bB
D	6,278	cC	7,775	dB	9,301	cA	9,029	dA
E	4,727	dC	5,958	eB	7,044	dA	6,882	eAB
F	6,965	cBC	7,775	dAB	8,556	cA	6,670	eC

Obs.: valores seguidos de letras iguais não diferem estatisticamente entre si; tratamentos na vertical (minúsculas) e subparcelas na horizontal (maiúsculas)

Tabela 3. Variação do teor de cinzas das polpas de açaí durante o armazenamento

Tratamentos	Tempo 0		Tempo 1		Tempo 2		Tempo 3	
A	0,224	cA	0,223	cdA	0,217	cA	0,199	bA
B	0,199	cB	0,210	dB	0,252	bcA	0,199	bA
C	0,197	cA	0,213	dA	0,153	dB	0,122	cB
D	0,273	bA	0,271	bA	0,291	bA	0,262	aA
E	0,323	aA	0,318	aAB	0,345	aA	0,283	aB
F	0,273	bA	0,259	bcA	0,271	bA	0,266	aA

Obs.: valores seguidos de letras iguais não diferem estatisticamente entre si; tratamentos na vertical (minúsculas) e subparcelas na horizontal (maiúsculas)

Pelos resultados das análises de proteínas apresentados na Tabela 4, foi verificado que houve diferença estatística significativa tanto entre as marcas como entre os tempos de armazenamento; neste caso, exceto para a amostra D. Os resultados obtidos variaram de 0,21 a 0,77% dependendo da marca e do tempo de armazenamento, porém esses valores estão abaixo dos encontrados por Menezes⁶ de 1,78 g de proteína/100 g de polpa de açaí grosso; assim como, dos valores de Alexandre²⁶ de 1,4, 1,75 e 1,5 g de proteína/100 g de polpa de açaí, respectivamente. Os baixos valores de proteínas encontrados nas amostras que não contêm xarope de guaraná podem ser justificados pelo elevado teor de umidade das mesmas.

Para o parâmetro lipídeos, observa-se, pela Tabela 4, que houve diferença significativa ao nível de 5% entre todas as marcas. Quanto ao tempo de armazenamento, foi encontrada diferença estatística significativa apenas para as marcas A e D, e os valores obtidos variaram de 2,17 a 6,22%.

Os resultados para açúcares redutores e não redutores (Tabela 5) mostraram diferença significativa tanto entre as marcas como entre os tempos de armazenamento. Os valores variaram de 3,46 a 14,42 e 0,34 a 14,23% em matéria úmida, respectivamente, pelo fato de determinadas amostras apresentarem xarope de guaraná em sua composição. Estudos demonstram que o açaí possui teor de carboidratos relativamente baixo, não sendo considerado um alimento fonte do mesmo³.

Tabela 4. Variação de proteínas e lipídios das polpas de açaí durante o armazenamento

Proteínas									
Tratamentos	Tempo 0		Tempo 1		Tempo 2		Tempo 3		
A	0,215	cB	0,307	dAB	0,380	cA	0,220	cB	
B	0,359	bBC	0,464	bcA	0,442	bcAB	0,329	bcC	
C	0,399	bB	0,368	cdB	0,551	bA	0,406	bB	
D	0,692	aA	0,744	aA	0,754	aA	0,775	aA	
E	0,587	aB	0,534	bB	0,741	aA	0,394	bC	
F	0,696	aA	0,771	aA	0,725	aA	0,373	bB	

Lipídios									
Tratamentos	Tempo 0		Tempo 1		Tempo 2		Tempo 3		
A	2,911	dA	3,004	cA	2,168	dB	2,588	dAB	
B	3,765	bcA	3,492	bcA	3,776	bcA	3,278	cdA	
C	3,043	cdA	2,971	cA	3,549	bcA	3,022	cdA	
D	5,401	aB	5,138	aB	6,218	aA	5,029	aB	
E	3,614	bcdA	3,667	bcA	3,536	cA	3,545	bcA	
F	4,221	bA	4,084	bA	4,268	bA	4,190	bA	

Obs.: valores seguidos de letras iguais não diferem estatisticamente entre si; tratamentos na vertical (minúsculas) e subparcelas na horizontal (maiúsculas)

Tabela 5. Variação do teor de açúcares redutores e não redutores das polpas de açaí durante o armazenamento

Açúcar redutor									
Tratamentos	Tempo 0		Tempo 1		Tempo 2		Tempo 3		
A	14,333	aA	14,421	aA	11,678	aB	7,346	bC	
B	14,422	aA	12,018	bB	11,240	aC	10,529	aD	
C	4,659	cB	4,657	cB	5,082	cAB	5,292	cA	
D	5,764	bA	4,495	cC	5,765	bA	5,278	cB	
E	4,646	cB	4,647	cB	4,811	cB	5,570	cA	
F	3,463	dB	3,469	dB	4,814	cA	3,754	dB	

Açúcar não redutor									
Tratamentos	Tempo 0		Tempo 1		Tempo 2		Tempo 3		
A	14,234	aA	0,342	eD	1,745	dC	5,233	bB	
B	14,230	aA	2,194	dD	4,156	bB	3,273	cdC	
C	13,583	bA	9,033	aC	9,588	aB	9,036	aC	
D	9,354	cA	4,854	bB	3,771	bC	3,143	dD	
E	7,487	eA	2,889	cB	2,542	cB	1,927	eC	
F	8,250	dA	4,778	bB	2,631	cD	3,804	cC	

Obs.: valores seguidos de letras iguais não diferem estatisticamente entre si; tratamentos na vertical (minúsculas) e subparcelas na horizontal (maiúsculas)

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados microbiológicos, conclui-se que, nas seis amostras de polpa de açaí analisadas, os tratamentos térmicos empregados foram eficientes, visto que estas encontram-se de acordo com as especificações exigida pela legislação.

Quanto às análises físico-químicas, houve diferença significativa entre as marcas e os tempos de armazenamento para todos os parâmetros avaliados, demonstrando que reações químicas continuam ocorrendo no alimento, mesmo sob o armazenamento congelado.

AGRADECIMENTOS

FAPESP Auxílio Pesquisa Processo nº 2008/04169-1 e Bolsa Iniciação Científica Processo nº 2008/04204-1.

REFERÊNCIAS

1. Tatenno MCN. Exportação do açaí sob forma de bebida natural e energética: apontando o mercado Alemão. [monografia]. Belém (PA): Centro de Ensino Superior do Pará; 2001.
2. Yuyama LKO, Rosa RD, Aguiar, JPL, Nagahama D, Alencar FH, Yuyama K et al. Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) e Camu-Camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) Mc Vaugh) possuem ação anti anêmica? *Acta Amaz*. 2002; 32(4): 625-33.
3. Rogez H. Açaí: preparo, composição e melhoramento da conservação. 1ª ed. Belém: Edufpa; 2000. p. 313.
4. Veloso SSC, Santos MLS. Aspectos microbiológicos da bebida açaí (*Euterpe oleracea*, Mart.) consumida na cidade de Belém. [monografia]. Belém, PA: Universidade Federal do Pará; 1994.
5. Souto RNM. Uso da radiação g, combinada à refrigeração, na conservação de polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). [dissertação de mestrado]. Seropédica, RJ: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 2001.
6. Menezes EMS. Efeito da alta pressão hidrostática em polpa de açaí pré-congelada (*Euterpe oleracea*, Mart.). [dissertação de mestrado]. Seropédica, RJ: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 2005.
7. Iaderoza M, Baldini ISD, Bovi MLA. Anthocyanins from Fruits of Açaí (*Euterpe oleracea*, Mart.). *Trop Sci*. 1992; 32:41-6.
8. Ozela EF, Stringheta PC, Lima AAS, Farias, MIT, Santos, MV. 1997. Estudo comparativo do teor de antocianinas presentes no açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), nos períodos de safra e entressafra. II Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos; novembro de 1997, Campinas: Universidade Estadual de Campinas. [Resumos].
9. Bobbio FO, Druzian JI, Abrão PA, Bobbio PA, Fadelli S. Identificação e quantificação das antocianinas do fruto do açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart). *Ciênc Tecnol Aliment*. 2000; 20(3):388-90.
10. Yuyama LKO, Aguiar JPL, Melo T, Barros SE, Filho DFS, Yuyama K et al. Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.): Qual o seu potencial nutricional? XVII Congresso Brasileiro de Fruticultura; 2004; Florianópolis, SC: Sociedade Brasileira de Fruticultura. [Anais].
11. Schauss AG, Wu X, Prior RL, Ou B, Patel D, Huang D et al. Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried amazonian palm berry, euterpe oleraceae mart. (acai). *J Agric Food Chem*. 2006; 54(22):8598-603.
12. Bobbio FO, Bobbio PA. Química do Processamento de Alimentos. São Paulo: Livraria Varela, 2001.
13. Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 1 de 07 de janeiro de 2000. Aprova o Regulamento técnico geral para fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpa de fruta. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 10 de jan. 2000. Seção 1, nº 6, p. 54-8.
14. Alexandre D, Cunha RL, Hubinger MD. Conservação do açaí pela tecnologia de obstáculos. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2004; 24(1):114-9.
15. 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, 02 de jan. 2001. Seção 1, p. 45-53.
16. Franco BDGM, Landgraf M. Microbiologia dos Alimentos. São Paulo, SP: Ed. Atheneu; 1996.
17. Rogez H, Pascal S, Buxant R, Lopes SQ, Colson-Corbisier AM. Identificação dos principais fungos e leveduras presentes na polpa do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). Congresso Brasileiro de Microbiologia, 19, 1997, Rio de Janeiro. p. 269.
18. Clemente ES. Controle higiênico-sanitário em supermercados. V Congresso Nacional de Higienistas de Alimentos; 1999; Foz do Iguaçu.
19. Solis CS. Gestão e certificação da qualidade de sistemas alimentares integrados. *Rev Hig Alim*. 1999; 13(61): 91-8.
20. Association of Official Analytical Chemistry [AOAC]. Official Methods of Analysis, 16 ed, Washington, D.C. USA, 2002.
21. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo - Brasil). Métodos químicos e físicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 3ª ed. São Paulo: Governo do Estado de São Paulo; 1985.
22. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem*. 1959; 37(8):911-17.
23. Somogy M. Determination of blood sugar. *J Biol Chem*. 1945; 160: 69-73.
24. Nelson NA. Photometric adaptation of the Somogy method for the determination of glucose. *J Biol Chem*. 1994; 153:375-80.
25. Souza MAC, Yuyama LKO, Aguiar JPL, Pantoja L. Suco de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.): avaliação microbiológica, tratamento térmico e vida de prateleira. *Acta Amaz*. 2006, 36(4):497-502.
26. Alexandre D. Conservação da polpa de açaí através da tecnologia de obstáculos e caracterização reológica. [dissertação de mestrado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2002.

Desempenho de planos de amostragem de 2-classes e de 3-classes para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos

Performance of 2- and 3-classes sampling schemes for assessing the food microbiological quality

RIALA6/1294

José Benício Paes CHAVES¹, Consuelo Domenici ROBERTO^{2*}, Genilson de PAIVA³, Leandro Dias ARAÚJO¹

*Endereço para correspondência: ²Departamento de Engenharia Rural, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo – CCA, Alegre – ES, Alto Universitário s/n – Bairro Guararema. Caixa Postal 16. CEP: 29500-000. Alegre – ES, e-mail: consuelo@cca.ufes.br; consuelodr@yahoo.com

¹Departamento de Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Exatas, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG

³Instituto Federal do Espírito Santo – CEFETES, Colatina - ES.

Recebido: 23.06.2010 – Aceito para publicação: 17.08.2010

RESUMO

Os planos de amostragem em análise microbiológica auxiliam no monitoramento do processo e da qualidade da matéria-prima e do produto. Para estudar o desempenho dos planos na avaliação da qualidade microbiológica de alimentos, foram analisados os parâmetros de tamanho do lote (N), tamanho da amostra (n) e número de aceitação (c) para os planos de 2-classes, e o efeito da distribuição dos microrganismos no lote (σ e μ) e da diferença entre o logaritmo do limite microbiológico inaceitável (M) e marginal (m) para os planos de 3-classes. Verificou-se que o desempenho dos planos de 2-classes dependeu exclusivamente de n e c. Quanto maior o n, para um dado c e fração de unidades defeituosas (p), menor foi a probabilidade de aceitação (Pa) do lote, e maior o poder de discriminação dos planos. Para os planos de 3-classes, para um mesmo n e c, o risco do fornecedor ter seus lotes rejeitados a um determinado nível de qualidade foi maior, quanto menor a diferença (log M - log m). As análises da curva característica de operação (CCO) e o desempenho dos planos são fundamentais na definição do nível de confiança dos resultados da inspeção dos lotes de produtos.

Palavras-chave. análise estatística, inspeção de alimentos, controle de qualidade, microbiologia de alimentos.

ABSTRACT

Sampling schemes have been useful for monitoring the microbiological quality of food products and raw materials. For assessing the performance of 2-classes sampling schemes for food microbial quality control the lot size (N), sample size (n) and acceptance number (c) parameters were analyzed. The effects of microorganism distribution in the lot (σ and μ) and of the difference between log of unacceptable count limit and log of marginal count limit (log M - log m) were evaluated for 3-classes schemes. Performance of 2-classes scheme was dependent on sample size (n) and acceptance number (c). The more n increases for a given c and defective units proportion (p), the less was the lot approval probability (Pa) and the higher was the inspection discriminating power. For 3-classes scheme for a given n and c values, the higher was the risk of the samples lots with a certain quality level being rejected, and the less was the difference log M - log n value. The analyses on sampling scheme operating characteristic curve (OCC) and the scheme performance are crucial for defining the confidence level of the product lot inspection results.

Key words. statistical analysis, food inspection, quality control, food microbiology.

INTRODUÇÃO

Considera-se desempenho de um plano de amostragem o seu poder de discriminar entre lotes bons e ruins, estimado por meio dos princípios estatísticos da teoria da probabilidade, sendo importante para que se conheça o nível de confiança dos resultados da inspeção dos lotes de produtos. O desempenho desses planos pode ser determinado utilizando-se funções de distribuição de probabilidade como a hipergeométrica, binomial, de Poisson ou a trinomial, de acordo com o plano de amostragem e com os parâmetros avaliados. Por meio da curva característica de operação (CCO) do plano, na qual plota-se a probabilidade de aceitação (P_a) versus a fração defeituosa no lote (p), é possível estimar a porcentagem de vezes que um lote com uma determinada fração defeituosa será aceito em inspeções sucessivas pelo plano de amostragem considerado¹.

Planos de amostragem de 2-classes são recomendados pela “International Commission on Microbiological Specification for Foods” (ICMSF) para análises microbiológicas de produtos para o comércio internacional desde 1978². No Brasil, os planos de amostragem de 2-classes foram incorporados à RDC nº12, de 02/01/2001, pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, que regulamenta os padrões microbiológicos para inspeção de produtos prontos para consumo³. Para planos de 2-classes, a qualidade do produto no lote é definida como a porcentagem ou fração de unidades com contagem acima do limite de especificação inaceitável (M), distinguindo-se duas classes de produtos: produtos de boa qualidade, aqueles com contagens menores ou iguais a M e produtos não-conformes ou defeituosos, aqueles com contagens maiores do que M . Quando se utiliza um plano de 3-classes, uma amostra aleatória de n unidades é testada para dois diferentes limites microbiológicos. Um lote será rejeitado se pelo menos uma unidade amostral exceder o limite de especificação inaceitável (M) ou se o número de unidades amostrais com resultado entre os limites de especificação marginal (m) e M exceder o número (c_m) de aceitação⁴.

Quando o resultado de uma análise microbiológica é expresso em termos quantitativos, é possível escolher entre planos de amostragem como os de 2-classes ou de 3-classes, sendo necessária uma comparação entre o poder discriminatório de cada plano. A decisão sobre o plano mais adequado depende dos objetivos da inspeção e de uma avaliação *a priori* de informações sobre o processo de produção. A partir dos resultados da análise quantitativa de

amostras retiradas de um lote, poderão ser obtidos dados relacionados à distribuição de probabilidade. Conhecidas as condições de processamento e, considerando que a distribuição de microrganismos nos lote de alimentos segue uma distribuição normal, pelo menos em escala logarítmica, pode-se comparar entre tais planos, por meio das curvas características de operação, que serão plotadas para lotes de qualidade conhecida descrita em função da média da carga de microrganismos por unidade no lote e por seu desvio padrão⁵.

A escolha entre planos de 2-classes ou de 3-classes baseia-se em se poder permitir a presença de uma unidade defeituosa em qualquer das unidades de amostra analisadas. Se a resposta for negativa, emprega-se um plano de 2-classes, com número de aceitação (c) igual a zero. Se a resposta for positiva, ou seja, se c pode ser maior que zero, pode-se aplicar tanto um plano de 2-classes quanto um de 3-classes, embora, este último seja o recomendado².

Os riscos associados à escolha de um plano de amostragem, quanto à aceitação de um lote de má qualidade ou rejeição de um lote de boa qualidade, estão associados ao tamanho da amostra e ao número de aceitação adotado. Esta probabilidade é condicional e depende da qualidade do produto no lote. Contudo, há sempre o risco de uma tomada de decisão errada, em que se rejeita um lote de boa qualidade ou risco do fornecedor (α), ou aceita-se um lote defeituoso ou risco do consumidor (β)^{2,6}.

Neste trabalho, objetivou-se avaliar e discutir a importância da análise de desempenho dos planos de amostragem, por meio de uma função de distribuição de probabilidade adequada, e da análise da CCO, que relacionam parâmetros tais como tamanho da amostra, número de aceitação ou distribuição de microrganismos versus a fração de unidades defeituosas do lote, para determinar os valores de n e c que atendam à proteção que se pretende garantir durante uma inspeção, além de contribuir para um maior entendimento sobre a aplicação da inspeção por amostragem no controle de qualidade e garantia da segurança dos alimentos.

MATERIAL E MÉTODOS

Análise do desempenho de planos de amostragem de 2-classes

Foram utilizados planos de amostragem de 2-classes para avaliação microbiológica de alimentos com risco moderado, direto e disseminação limitada, recomendados pela ICMSF² e planos adotados pela RDC

nº12, de 02/01/2001³. Para análise dos efeitos do tamanho do lote (N), do tamanho da amostra (n), do número de aceitação (c), baseou-se na metodologia descrita por Grant (1946) citada por Bartlett Júnior e Wegener⁷.

Efeito do tamanho do lote (N)

Para a análise do efeito de N, construíram-se as CCO's para o plano n=10 e c=1. Utilizou-se a distribuição hipergeométrica para determinação dos valores de Pa, com valores de N iguais a 50, 100, 200, 500, 1000 e 2000. Os valores de Pa foram determinados utilizando a função DIST. HIPERG da planilha MICROSOFT EXCEL®.

Efeito do tamanho da amostra (n) e do número de aceitação (c)

Avaliou-se o efeito de n no desempenho de planos de amostragem de 2-classes, considerando-se duas situações:

- Determinaram-se valores para n como uma porcentagem fixa do tamanho do lote, adotando-se n como 10% de N para N = 100, 200, 500 e 1000 e c=1. Utilizou-se a distribuição hipergeométrica para a montagem das CCO's;
- Determinaram-se valores para n, independentemente do tamanho do lote.

Para esta análise, utilizaram-se valores fixos de c, variando-se os valores de n para os planos: n=5, 10 e 20, com c=0; n=5, 10 e 20, com c=1; n=5, 10 e 20, com c=2; n=5, 10 e 20, com c=3. Empregou-se a distribuição binomial para a montagem das CCO's como é recomendado pela ICMSF².

Para a análise do efeito do número de aceitação no desempenho dos planos de amostragem, combinaram-se valores fixos de n, independentemente do tamanho do lote, com diferentes valores de c para os planos: n=5 e c=0, 1, 2 e 3; n=10 e c=0, 1, 2 e 3; n=20 e c=0, 1, 2 e 3. Os valores de Pa foram determinados utilizando a função DIST.BINOM da planilha MICROSOFT EXCEL®.

Efeito da distribuição dos microrganismos no lote e do limite microbiológico

Admitiu-se que o logaritmo da contagem de microrganismos segue uma distribuição normal e determinou-se p, utilizando-se a função DIST.NORMP do programa MICROSOFT EXCEL®, que fornece diretamente $P(-\infty \leq Z \leq z)$, no caso, a fração não-defeituosa (q) em relação ao limite microbiológico (M), (Equação 1):

$$Z = \frac{\log M - \mu}{\sigma}$$

$$P(-\infty \leq Z \leq z) = q \quad (1)$$
$$p = 1 - q$$

Dado p, os valores de Pa foram estimados, utilizando-se a distribuição binomial. Adotou-se o modelo proposto por Hildebrant et al⁴, em que as CCOs foram determinadas, plotando-se Pa *versus* média da contagem de microrganismos (log UFC/g ou mL), de acordo com o desvio padrão.

Analisou-se o desempenho dos planos: n=5, c=0 e M=100; n=5, c=1 e M=100; n=5, c=2 e M=100; n=5, c=0 e M=30000. Utilizaram-se os valores de $\sigma = 0,1; 0,2; 0,4; 0,6$ e 1,0. A escolha dos valores de desvio padrão dos microrganismos no lote foi baseada em dados obtidos a partir de uma revisão detalhada de trabalhos sobre a distribuição de microrganismos em alimentos.

Análise do desempenho de planos de amostragem de 3-classes

Adotaram-se planos de amostragem simples, em que apenas uma amostra de n unidades é tomada aleatoriamente no lote, como é recomendado pela ICMSF² para as análises microbiológicas de alimentos. Para os planos avaliados, a probabilidade de aceitação (Pa) foi determinada, empregando-se a distribuição de probabilidade trinomial. Utilizaram-se a planilha do MICROSOFT EXCEL® para determinação das Pa's e o programa SIGMA PLOT® (spw4) para plotar as superfícies características de operação (SCO). A partir de cortes nas SCO's obtidas, determinaram-se as curvas características de operação (CCO) para os planos analisados e avaliou-se o efeito da distribuição dos microrganismos no lote (μ e σ) e do limite microbiológico marginal (m).

Analisou-se o desempenho de planos de amostragem de 3-classes para lotes com diferentes desvios-padrão (σ) e em função da média (μ) de contagem de microrganismos (log UFC/g ou mL). Para estas análises, foi utilizado o plano de amostragem n = 5 e c = 2 e os seguintes limites microbiológicos adotados pela RDC nº12, da ANVISA de 02/01/2001, para vários tipos de análises microbiológicas em uma variedade de produtos²: m = 10² e M = 5 x 10²; m = 10² e M = 10³; m = 10⁴ e M = 10⁵; m = 3 x 10⁴ e M = 10⁵. Simultaneamente, analisou-se o efeito de diferentes valores de limites microbiológicos (m e M)

para um mesmo plano de amostragem n e c , de acordo com Hildebrandt et al⁴.

Assumiu-se a distribuição normal para os microrganismos no lote em escala logarítmica e empregou-se a distribuição normal padronizada para determinar a fração do lote com qualidade satisfatória (p_0), a fração do lote com qualidade marginal (p_m) e a fração do lote com qualidade inaceitável (p_d), utilizando-se a função DIST.NORMP da planilha MICROSOFT EXCEL®, sendo (Equação 2):

$$z_1 = \frac{\log m - \mu}{\sigma} \Rightarrow p_0$$

$$z_2 = \frac{\log M - \mu}{\sigma} \Rightarrow p_0 + p_m \quad (2)$$

$$p_d = 1 - (p_0 + p_m)$$

$$p_m = 1 - p_0 - p_d$$

Determinou-se a P_a , para os seguintes tipos de CCO's: P_a vs μ (log UFC/g ou mL); P_a vs p_m ; e P_a vs p_d .

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito do tamanho do lote (N) sobre o desempenho do plano de amostragem de 2-classes

O desempenho do plano de amostragem de 2-classes $n=10$ e $c=1$, em função do tamanho do lote, é analisado por meio das CCO's, mostradas na Figura 1A. Na Figura 1B, é mostrado o desempenho de planos de amostragem, cujos valores de n foram fixados como 10% do tamanho do lote e $c=1$.

As CCOs para lotes com 200 a 5000 unidades não determinam diferenças na P_a , obtendo-se o mesmo nível de inspeção em relação à fração defeituosa (p), independentemente do tamanho do lote para uma amostra de 10 unidades e número de aceitação igual a 1. Como as curvas se encontram muito próximas umas das outras, do ponto de vista estatístico, o tamanho do lote N , não é necessário para se dimensionar o tamanho da amostra. Assim, pode-se dizer que uma amostra de 10 unidades de um lote contendo 5000 unidades oferece praticamente a mesma proteção de uma amostra de 10 unidades proveniente de um lote de 200 unidades quanto à aceitação de um lote com uma dada fração defeituosa e

quanto à qualidade do produto dos lotes aceitos nos dois casos. Pequenas diferenças são observadas nas regiões de inflexão das CCOs para lotes com 50 e 100 unidades (Figura 1A). De acordo com a RDC nº12, de 02/01/2001, para casos em que se tem lotes menores que 100 unidades, não se aplica uma amostragem estatística, sendo adequada apenas uma amostragem indicativa³.

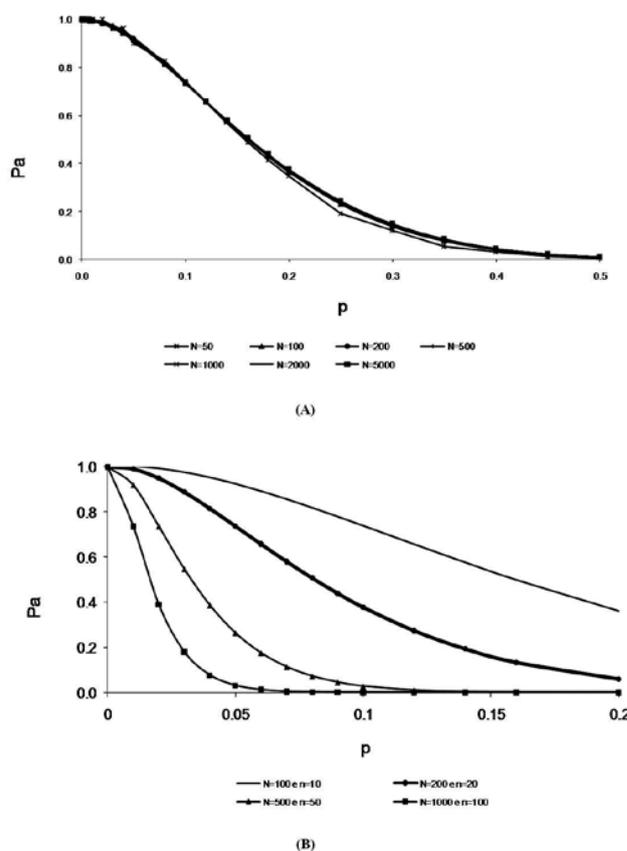


Figura 1. (A) CCOs para o plano de amostragem $n=10$ e $c=1$ e diferentes tamanhos de lote; (B) CCO's para o plano de amostragem de 2-classes com $n=10\%$ de N e $c=1$

Estes resultados demonstram que o desempenho de um plano de 2-classes, com determinado n e c , é praticamente independente do tamanho do lote inspecionado, exceto para lotes de tamanho muito reduzido, como observado para $N=100$ e $N=50$. Dessa forma, a determinação do tamanho da amostra baseado na porcentagem do tamanho do lote é um procedimento inadequado.

Alguns autores recomendam o uso de fórmulas para a determinação do tamanho da amostra ou a tomada de uma determinada porcentagem do tamanho do lote. Embora estes conceitos já sejam ultrapassados, ainda

é observado o uso de porcentagens fixas do lote, como tamanho da amostra para inspeção.

Pela análise da figura 1B, verifica-se que ao se utilizar uma porcentagem do tamanho do lote para definir o tamanho da amostra, os lotes com tamanhos diferentes e mesma fração defeituosa (p) apresentaram níveis ou rigor de inspeção também diferentes. Por exemplo, lotes com 5% de unidades defeituosas ($p=0,05$) seriam aceitos 92% das vezes se $N=100$, 74% das vezes, se $N=200$, 26% das vezes, se $N=500$ e 3% das vezes, se $N=1000$ (Figura 1B). Portanto, quanto maior o tamanho do lote, maior o tamanho da amostra e mais rigorosa seria a inspeção. Além de ser um plano de amostragem com um desempenho diferente para cada tamanho de lote, ele seria inexecutável para lotes de tamanhos maiores, pois exigiria a análise de amostras muito grandes. Isso confirma o que foi descrito anteriormente, quando se considerou incorreto utilizar uma fração ou porcentagem do lote para definir o tamanho da amostra.

Efeito do tamanho da amostra (n) e do número de aceitação (c) sobre o desempenho do plano de amostragem de 2-classes

Na Figura 2, para cada gráfico tem-se as CCO's, com a P_a em função da fração defeituosa (p), para um dado número de aceitação e tamanhos de amostras $n=5, 10$ e 20 .

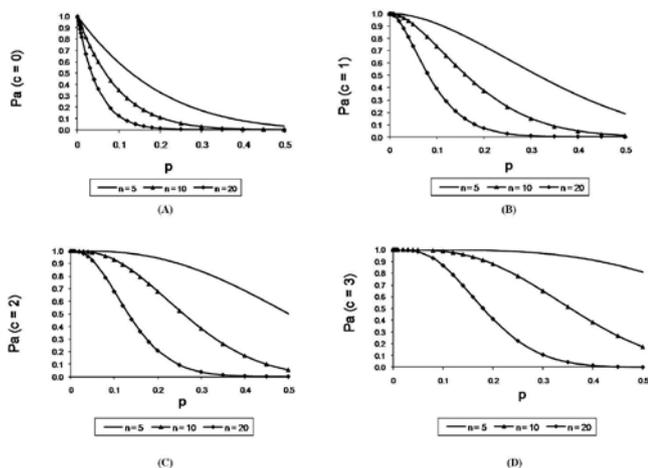


Figura 2. Efeito do tamanho da amostra (n) sobre a probabilidade de aceitação (P_a) em função da fração defeituosa (p) no lote para: (a) $c = 0$; (b) $c = 1$; (c) $c = 2$; (d) $c = 3$ para planos de amostragem de 2-classes

Os planos de amostragem com número de aceitação $c = 0$ garantem maior proteção para o consumidor, ou seja, lotes de má qualidade têm menor probabilidade de ser aceitos numa inspeção. Na Figura 2A, verifica-se que para

lotes com 20% de unidades defeituosas seriam aceitos 33, 11 e 1% das vezes se $n = 5, 10$ ou 20 . Por outro lado, trariam implicações de alto risco para o fornecedor. Verifica-se, ainda, que lotes com 1% de unidades defeituosas seriam aceitos 95, 90 e 82% das vezes se $n = 5, 10$ ou 20 , enquanto para lotes com 2% de unidades defeituosas, o nível de inspeção muda sensivelmente, resultando na sua aceitação 90, 82 e 67% das vezes se $n = 5, 10$ ou 20 . Já para os lotes com 5% de unidades defeituosa, $P_a = 77\%$ para $n = 5$; $P_a = 60\%$ para $n = 10$ e $P_a = 36\%$ para $n = 20$ (Figura 2A).

A utilização de um plano de amostragem com c diferente de zero garante ao fornecedor que lotes com baixa fração defeituosa sejam aceitos na maioria das vezes que forem inspecionados como pode ser observado nos gráficos da Figura 2, sendo que para valores de p próximos de zero, a P_a permanece praticamente constante.

Na Figura 3, em cada gráfico, as CCO's foram determinadas para $c = 0, 1, 2$ e 3 , mantendo-se constante o valor de n .

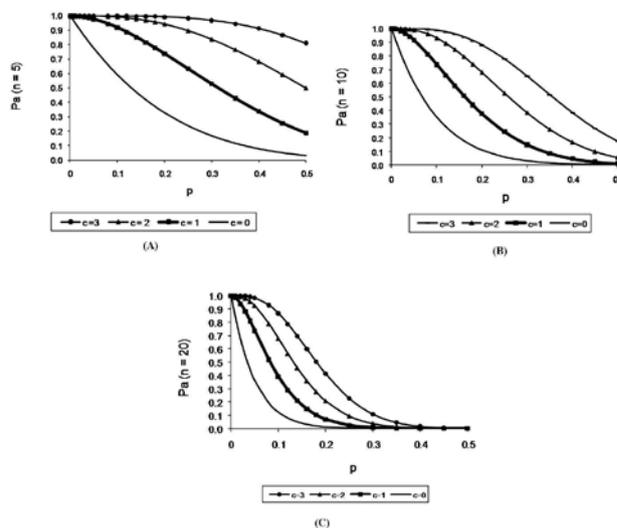


Figura 3. Efeito do número de aceitação (c) sobre a probabilidade de aceitação (P_a) em função da fração defeituosa (p) no lote para: (a) $n = 5$; (b) $n = 10$; (c) $n = 20$ para planos de amostragem de 2-classes

Quanto ao efeito destes fatores, observa-se que quanto maior o valor de n , mais rigoroso é o plano de amostragem, portanto, melhor é o seu desempenho para discriminar entre lotes bons e ruins, considerando-se o valor de c adotado. Consequentemente, menor é a P_a do lote a um dado p . Por outro lado, quanto maior o valor de c , para um dado n , mais flexível é o plano de amostragem e maior será a P_a do lote, a um dado valor de p . Para lotes com 1% de unidades defeituosas, ao considerar $n = 5$,

tem-se $P_a = 0,95$ para $c = 0$; $P_a = 1$ para $c = 1, 2$ e 3 (Figura 3A); $n = 10$, $P_a = 0,90$ para $c = 0$; $P_a = 0,99$ para $c = 1$ e $P_a = 1$ para $c = 2$ e 3 (Figura 3B); $n = 20$, $P_a = 0,82$ para $c = 0$; $P_a = 0,98$ para $c = 1$ e $P_a = 0,99$ para $c = 2$ e $P_a = 1$ para $c = 3$ (Figura 3C).

Para lotes com maior número de unidades defeituosas, à medida que se aumenta o valor de n menor é o valor da P_a e, portanto, mais rigoroso é o plano. Para lotes com 50% de unidades defeituosas, ao considerar $n = 5$, tem-se $P_a = 0,03$ para $c = 0$; $P_a = 0,19$ para $c = 1$, $P_a = 0,50$ para $c = 2$ e $P_a = 0,81$ para $c = 3$ (Figura 3A); $n = 10$, $P_a = 0,0009$ para $c = 0$; $P_a = 0,0107$ para $c = 1$ e $P_a = 0,055$ para $c = 2$ e $P_a = 0,17$ para $c = 3$ (Figura 3B); $n = 20$, $P_a = 0$ para $c = 0$ e 1 ; $P_a = 0,0002$ para $c = 2$ e $P_a = 0,0012$ para $c = 3$ (Figura 3C).

Ao se comparar o desempenho dos planos de amostragem em função do número de aceitação, de acordo com os dados da Figura 3, observa-se que para valores de $c = 0$, lotes com 20% de unidades defeituosas ($p = 0,20$) seriam aceitos 33% ($P_a = 0,33$) das vezes para $n = 5$ (Figura 3A). Para $c = 1$, o valor de $P_a = 0,74$ e para $c = 2$, $P_a = 0,94$ (Figura 3A). Pode-se afirmar que os planos de amostragem com número de aceitação $c=0$ garantem maior proteção para o consumidor e, portanto, lotes de má qualidade têm menor probabilidade de serem aceitos numa inspeção. Por outro lado, trariam implicações de alto risco para o fornecedor, já que, nesse caso, a probabilidade de se rejeitar lotes bons, dada por $1 - P_a$, é maior em relação aos demais valores de c analisados, mantendo-se constante o valor de n . Observa-se comportamento semelhante para $n = 10$, em que, se $p = 0,20$ para $c = 0$, $P_a = 0,11$; $c = 1$, $P_a = 0,38$; $c = 2$, $P_a = 0,68$ e $c = 3$, $P_a = 0,88$ (Figura 3B); e para $n = 20$ em que para $c = 0$, $P_a = 0,01$; $c = 1$, $P_a = 0,07$; $c = 2$, $P_a = 0,21$ e $c = 3$, $P_a = 0,41$, (Figura 3C).

Na NBR-5426, norma que descreve sobre plano de amostragem e procedimentos na inspeção por atributos, existem as chamadas normas de comutação, que determinam regras para mudanças nos níveis de inspeção para um fornecedor, de acordo com a melhoria ou a degradação da qualidade da sua produção. São determinados três níveis de inspeção: severa, normal e atenuada. Esses procedimentos buscam garantir a proteção do consumidor e reduzir os custos de inspeção, permitindo a utilização de um menor tamanho de amostra para processos que estão sob controle⁸.

O comportamento das CCO's em relação aos valores de n e c mostra a flexibilidade e a versatilidade na escolha do plano de amostragem para o nível de inspeção desejado, isso quando é possível admitir alguma unidade defeituosa na amostra.

Efeito da média (μ), desvio padrão (σ) e limites microbiológicos (m e M) para planos de amostragem de 3-classes

O desempenho de planos de 3-classes em função da média (μ) e do desvio-padrão (σ) em unidades logarítmicas (log UFC/g ou mL), para $n = 5$ e $c = 2$ com diferentes valores de m e M , é mostrado na Figura 4.

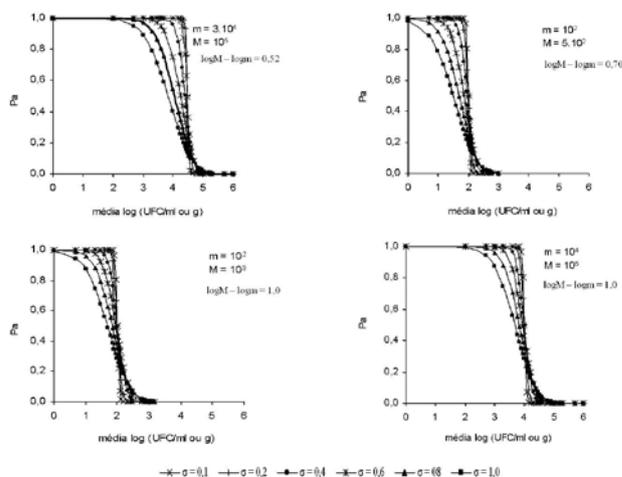


Figura 4. Cortes da SCO do plano de amostragem de 3-classes $n = 5$ e $c = 2$, com diferentes valores de m e M , para a qualidade do lote, expressa pelo nível médio de contaminação

Na Figura 4, observa-se que para um mesmo plano de amostragem (n e c), quanto menor a diferença entre $\log M$ e $\log m$, menor será a inclinação da CCO, ou seja, menor será o valor da P_a para uma dada μ e um dado σ . Isso significa que o risco do fornecedor de ter lotes rejeitados a um determinado nível de qualidade é maior quanto menor a diferença: $\log M - \log m$.

O desempenho dos planos de amostragem por atributos é praticamente independente da distribuição dos microrganismos no lote¹. Contudo, a análise mostrada na Figura 4 demonstra que o desvio padrão (σ), em escala logarítmica, dos microrganismos nos lotes exerce efeito sobre a P_a para o plano de 3-classes analisado ($n = 5$ e $c = 2$), quando a amostra é testada para diferentes valores de m e M .

Isso ocorre porque no caso de planos de 3-classes, para cada μ e σ do lote, para um dado m e M , tem-se uma diferente combinação dos valores de p_m e p_d , que, obviamente, determinam diferente valor de P_a . Ao contrário de planos de 2-classes, em que um mesmo p é determinado por diferentes valores dos parâmetros de μ e σ .

Nos planos de 3-classes com $n = 5$, $c = 2$, $m = 100$ e $M = 1000$ para $\mu = m$ ($\log 100 = 2$) a $P_a = 0,5$ se $\sigma = 0,1$ ou $0,2$; $P_a = 0,49$ se $\sigma = 0,4$; $P_a = 0,43$ se $\sigma = 0,6$; $P_a = 0,35$ se $\sigma = 0,8$ e a

$P_a = 0,28$ se $\sigma = 1,0$. Portanto, o σ do nível de microrganismos no lote afeta o desempenho de planos de 3-classes.

Como se observa em todos os gráficos da Figura 5, quanto menor a distância entre o logaritmo de M e o logaritmo de m ($\log M - \log m$) ou quanto menor a razão entre m e M (m/M), maior será o efeito de um dado σ no desempenho destes planos. O efeito do σ e da μ no desempenho do plano de 3-classes depende, sobretudo, dos limites marginais (m) e inaceitável (M).

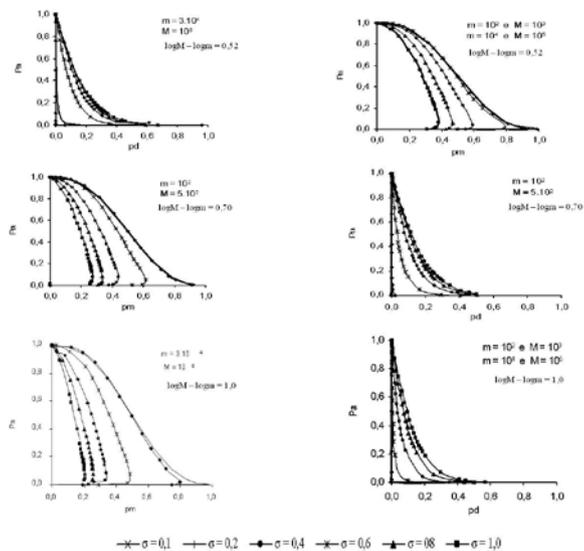


Figura 5. Cortes da SCO do plano de amostragem de 3-classes $n = 5$ e $c = 2$, com diferentes valores de m e M , para a qualidade do lote expressa em p_m e p_d

Os resultados mostram que os limites microbiológicos m e M devem ser estabelecidos, levando-se em conta os desvios-padrão considerados satisfatórios para os produtos. Este desvio-padrão depende estritamente do processo de elaboração do produto, portanto, das Boas Práticas de Fabricação e dos controles realizados. É possível obter valores do desvio padrão de microrganismos no lote que garantiram ao consumidor que nenhum lote com fração defeituosa (p_d) seja aceito para cada especificação de m e M em um plano de 3-classes.

CONCLUSÃO

A garantia de qualidade microbiológica não deve ser tratada como uma obrigação ou exigência de normas reguladoras e comerciais, mas como um compromisso da indústria com a saúde pública e uma estratégia gerencial para melhoria contínua da qualidade.

Apesar da simplicidade da utilização dos planos de amostragem para avaliação da qualidade microbiológica de

alimentos, a análise dos fatores que afetam o desempenho destes planos mostra que a determinação do plano de amostragem não é um procedimento tão simples. A falta de informação relativa à população microbiana normalmente presente em alimentos e dados epidemiológicos das enfermidades de origem alimentar constituem os obstáculos preliminares. Ainda, a eficiência da utilização de limites microbiológicos depende da exatidão dos métodos analíticos utilizados. Portanto, a determinação do plano de amostragem depende de conhecimentos de microbiologia de alimentos e da análise de desempenho do plano de amostragem.

Para se ter a garantia de qualidade dos lotes inspecionados, a amostragem de aceitação deve estar associada a um sistema de garantia de qualidade, que vise ao controle efetivo da matéria-prima e dos pontos críticos do processo por meio de procedimentos preventivos e corretivos como o sistema de Análises de Perigos e Pontos Críticos de Controle.

REFERÊNCIAS

1. Paiva G. Desempenho de Planos de Amostragem de 2-Classes e de 3-Classes em Avaliação da Qualidade Microbiológica de Alimentos [dissertação de mestrado]. Viçosa (MG): Universidade Federal de Viçosa; 2001.
2. International Commission on Microbiological Specification for Foods - ICMSE. Microorganisms in food 2 - sampling for microbiological analyses: principles and specific application (Microorganismos de los alimentos: principios y aplicaciones específicas). 2ª. ed. Zaragoza (Espanha): Acribia; 1982.
3. 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 de jan. 2001, Seção 1, nº7-E, p. 45-33.
4. Hildebrandt G, Böhmer L, Dahms S. Three-class attributes plans in microbiological quality control: a contribution to the discussion. *J Food Prot*. 1995; 58 (7): 784-90.
5. Dahms S. Microbiological sampling plans – Statistical aspects. *Mitt Lebensm Hyg*. 2004; 9(1): 32-44.
6. Leitão MFF, Shirose I. A amostragem na avaliação da qualidade microbiológica de alimentos. *Bol Inst Tecnol Alimentos*. 1978; 55:119-52.
7. Bartlett Junior RP, Wegener JB. Sampling plans developed by the united states department of agriculture for inspection of processed fruits and vegetables. *Food Technol*. 1957; 11(10):526-32.
8. Associação Brasileira de Normas Técnicas/Aplicações de métodos estatísticos – ABNT/CEE-83 (São Paulo – Brasil). Planos de amostragem e procedimentos na inspeção por atributos. 1989.

Avaliação do processo produtivo de polpas de frutas congeladas

Evaluation of the productive quality for processing the frozen fruit pulps

RIALA6/1295

Estela SEBASTIANY^{1*}, Elizanilda Ramalho do REGO², Marcos José Salgado VITAL¹

Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais, Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, RR, Brasil/+55 13 3227 6882, e-mail: esebastiany@yahoo.com.br

²Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba /Areia, PB, Brasil/+55 83 3362 2300/elizanilda@cca.ufpb.br

Recebido: 04.10.2009 – Aceito para publicação: 25.06.2010

RESUMO

No estado de Roraima, os fabricantes de polpas de frutas empregam processos artesanais de produção, os quais não asseguram a qualidade do produto; apesar disso, esse segmento da agroindústria tem se expandido principalmente entre as microempresas. O procedimento de produção de polpas de frutas congeladas empregado em Boa Vista/RR foi avaliado por meio de visitas técnicas e aplicação de *check list* em quatro fabricantes selecionados que produzem polpa de fruta *in natura*. Constatou-se que o processo produtivo das indústrias locais é insatisfatório, sendo necessária a sua adequação às exigências da legislação em vigor. **Palavras-chave.** polpa de fruta, processo produtivo, Roraima.

ABSTRACT

In Roraima State, the local frozen fruit pulps producers employ artisanal procedures which do not ensure the quality of the final products; even so, this agroindustry segment has been increasing and predominately among the small companies. The quality of frozen fruit pulps production in Boa Vista/RR was assessed by a technical visit and applying a check list at four selected companies processing *in natura* fruit pulps. Inadequate frozen fruit pulps productive processing at local industries was evidenced, thus being in noncompliance with the legislation in force.

Key words. fruit pulp, production process, Roraima.

INTRODUÇÃO

A Food and Agriculture Organization (FAO) demonstrou que a comercialização de produtos derivados de frutas aumentou mais de cinco vezes nos últimos 15 anos em nível mundial¹. O Brasil é o terceiro maior produtor de frutas tropicais e estas têm uma participação bastante expressiva neste volume^{2,3}.

A elevada perecibilidade dos frutos leva a perdas expressivas, o que tem estimulado os produtores a desenvolver processos tecnológicos visando aumentar sua vida útil. Dentre os resultados destes esforços, têm-se a produção de polpas de frutas congeladas⁴ utilizadas como matéria-prima para o processamento de outros produtos, além do fato de elas serem extremamente práticas para o consumidor, como forma de evitar as consequências da sazonalidade. O crescimento da indústria frutícola no país é resultado, em grande parte, da produção em fábricas de pequeno porte, muitas vezes implantadas para melhorar a renda de pequenos produtores rurais ou aproveitar os excedentes da produção^{1,5}. O mercado de polpas de frutas congeladas tem crescido e disseminado-se em todos os estados como um importante segmento da cadeia produtiva⁶.

Para se obter uma polpa de fruta de boa qualidade, os cuidados devem iniciar nos tratamentos culturais, durante a colheita e continuarem no transporte, armazenamento e processamento da fruta. O processamento de polpas de frutas congeladas *in natura* obedece às seguintes etapas: recepção, pré-seleção, pré-lavagem e lavagem, seleção, descascamento e preparo do fruto, despulpamento, acabamento ou refino, tanque pulmão, embalagem, congelamento, armazenamento e distribuição⁵.

Na pré-seleção são separados os frutos maduros e os impróprios. A pré-lavagem e a lavagem são fundamentais; se realizadas de modo inadequado, permitirão a incorporação de elementos da superfície da fruta (microrganismos, resíduos de defensivos agrícolas, poeira) à polpa durante o descascamento e esmagamento. A sanitização visa à redução da carga microbiana, enquanto que, na seleção, as frutas são avaliadas quanto à maturação, firmeza, machucaduras e defeitos, a fim de conferir maior uniformidade ao produto. O descascamento e preparo são etapas críticas, devendo-se dispensar cuidados com a higienização. O despulpamento deve ser realizado imediatamente após o descascamento, a fim de diminuir o tempo de exposição das partes desintegradas. O acabamento ou refino visa melhorar o aspecto e a estabilidade física do produto^{5,7}.

A embalagem deve oferecer proteção contra oxidação, luz e contaminações, exercendo influência sobre a vida de prateleira. Habitualmente, as polpas são comercializadas em embalagens flexíveis (filmes plásticos ou recipientes de polietileno ou polipropileno) ou tetrapak^{1,5,8}.

O congelamento tem como principal finalidade a conservação do produto, e a velocidade desta operação interfere na sua qualidade. É recomendável utilizar um sistema de congelamento rápido, pois o emprego de freezer doméstico requer mais tempo para o congelamento completo, desencadeando reações bioquímicas, físicas e microbiológicas que afetarão a sua qualidade. No período que antecede a distribuição, é recomendável que a temperatura das polpas seja reduzida, pois durante essa operação esta normalmente se eleva^{5,9,10}.

As pessoas envolvidas com a produção de polpas de frutas devem ser avaliadas periodicamente quanto a sua saúde, bem como ser conhecedoras das técnicas de manipulação e cuidados higiênicos. Os vasilhames, utensílios, equipamentos e instalações são fontes potenciais de contaminação e devem ser lavados e sanitizados com agentes de limpeza apropriados para indústrias de alimentos. Os equipamentos devem ser de fácil limpeza e a fábrica deve ter *layout* que evite contaminação cruzada⁵.

A segurança é o principal atributo de qualidade dos alimentos; deste modo, os padrões de qualidade e segurança visam assegurar que estes sejam isentos de contaminantes de natureza física, química ou biológica. Atualmente, os órgãos de fiscalização preconizam a utilização das Boas Práticas de Fabricação (BPF) e do sistema de Análises de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), com o objetivo de oferecer produtos seguros.

No estado de Roraima, a produção de polpas de frutas, empregadas principalmente na elaboração de sucos, tem se expandido, sobretudo entre as microempresas. A maioria das fábricas emprega processos artesanais e não adota a pasteurização, o que não assegura a qualidade do produto. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o processo produtivo de polpas de frutas congeladas em Boa Vista-RR, a fim de contribuir para uma política agroeconômica e de saúde pública que inclua esta importante atividade produtiva.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados quatro fabricantes de polpas de frutas congeladas, não submetidas a tratamento

térmico. Visando resguardar a identidade das empresas avaliadas, estas foram identificadas pelas letras A, B, C e D:

-fabricantes A e B: produtores de polpas de frutas com registro no Ministério da Agricultura, microempresas;

-fabricantes C e D: produtores de polpas de frutas sem registro no Ministério da Agricultura, instalados em feira livre, sem registro jurídico (economia informal).

As microempresas avaliadas (fabricantes A e B) correspondem a 100% dos produtores de polpas de frutas que possuem situação jurídica regularizada em Roraima. Por outro lado, o quantitativo de fabricantes que trabalham informalmente é desconhecido.

Os fabricantes foram avaliados quanto à adequação à legislação, através de visitas técnicas e aplicação de lista de verificação, elaborada de acordo com as diretrizes legais^{11,12,13,14} e complementada por orientações constantes em Mororó⁵. A lista de verificação foi respondida através de observação *in loco* e informações fornecidas pela empresa, a qual assinou um “Termo de Consentimento” autorizando a visita e acompanhamento do processo produtivo. Também foi assinado um “Termo de Compromisso”, a fim de garantir sigilo quanto à identificação da empresa.

Os principais aspectos abordados na lista de verificação foram:

- autorização para funcionamento (registro no órgão fiscalizador e responsabilidade técnica);

- instalações e edificação (capacidade de produção; localização; características do prédio, paredes, divisórias, cobertura e piso; focos de insalubridade; *layout*; proteção física contra pragas e insetos; estado de conservação; iluminação, instalações elétricas e ventilação; pias, sanitários e vestiários; rede de esgoto; destino dos resíduos; abastecimento de água, controle de pragas);

- equipamentos e utensílios (tipo de material; estado de funcionamento e conservação; quantidade; manutenção preventiva);

- higiene (procedimentos de higienização; treinamento dos funcionários; guarda e estado de limpeza de equipamentos e utensílios; produtos de limpeza);

- manipuladores (treinamento, guarda de artigos pessoais; exames médicos e laboratoriais; aparência; uso de EPIs; higienização das mãos);

- produção (procedência, avaliação, armazenamento e validade da matéria-prima; etapas do fluxo de produção);

- controles (análises laboratoriais e Manual de Boas Práticas de Fabricação).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quanto à documentação, 50% das empresas visitadas não possuíam registro na Delegacia Federal de Agricultura (DFA), 25% possuíam e 25% encontravam-se em fase de renovação do registro. O fato de existirem fábricas funcionando irregularmente é um obstáculo para a expansão do setor, uma vez que a qualidade das polpas de frutas passa a ser duvidosa pelo não atendimento a esta premissa básica. Somente as duas indústrias (50%) que estavam legalmente aptas para funcionar possuíam responsáveis técnicos, o que é exigido pela legislação, uma vez que este profissional possui conhecimentos e competência para garantir a qualidade do produto^{11,12,13,14}.

Das quatro indústrias visitadas, três localizavam-se no perímetro urbano e uma no perímetro rural. A capacidade de produção diária das indústrias era bastante variável: de 250 kg até 800 kg diários, sendo que uma das indústrias não soube informar esse dado.

Todas as empresas estavam instaladas em prédios adaptados, ou seja, que não foram construídos especialmente para este fim. Apenas em uma (25%) o prédio era ocupado exclusivamente com as instalações industriais; enquanto outra dividia suas instalações com a residência do proprietário e as demais (50%) se localizavam em feira. Estas condições são similares às constatadas por Bastos et al⁹ que, ao avaliar empresas produtoras de polpas de frutas na região Nordeste, verificaram que espaços de residências familiares eram aproveitados para unidades de produção.

Quanto ao acesso às instalações, este era direto e independente em 50% das empresas. Nenhuma das indústrias apresentava suas instalações livres de focos de insalubridade e apenas uma (25%) apresentava *layout* adequado (ordenado, linear e sem cruzamento) e proteção física contra pragas e insetos. Segundo a legislação, a indústria deve ter suas instalações livres de focos de insalubridade, o *layout* e o fluxo devem evitar contaminações cruzadas

e permitir limpeza fácil e adequada, com proteção física contra insetos, roedores e pragas^{12,13}. Em trabalho efetuado em Maringá-PR, os autores observaram que 47% dos estabelecimentos comerciais de manipulação de alimentos analisados apresentaram ausência ou má conservação das telas de proteção¹⁵.

As fábricas localizadas em feira (50%) estavam instaladas em boxes e não possuíam paredes e divisórias; o espaço de cada produtor era delimitado apenas por equipamentos e utensílios. Nestas indústrias, a cobertura era de telha de amianto e o piso de cimento grosso e sem inclinação. Para as demais indústrias vistoriadas, foi observado que uma (25%) possuía paredes e divisórias em PVC (policloreto de vinila) e outra apresentava essas estruturas em alvenaria, pintadas com tinta a óleo; entre estas, todas possuíam forros em PVC e piso de cerâmica, porém em apenas uma delas havia inclinação suficiente para o escoamento das águas. Desse modo, observa-se que as indústrias avaliadas não apresentavam instalações apropriadas^{12,13}. Em relação às fábricas instaladas em feira, a situação era ainda mais grave, pois sua estrutura física e a localização eram totalmente inadequadas, propiciando que o produto sofresse contaminações de diferentes naturezas.

O estado de conservação das instalações foi também objeto de avaliação e em apenas uma das fábricas (25%) foi considerado razoável. Este resultado é condizente com avaliações realizadas em estabelecimentos produtores e comercializadores de alimentos no país: segundo estudo efetuado por Bastos et al⁹ em indústrias produtoras de polpas de frutas na região Nordeste, as condições das instalações das empresas avaliadas não estavam dentro das normas para agroindústrias de alimentos. Em pesquisa realizada em estabelecimentos de manipulação de alimentos em Maringá-PR, Veiga et al¹⁵ verificaram que 97% destes apresentavam precárias condições de conservação.

Em relação à iluminação e instalações elétricas, 50% das fábricas foram consideradas satisfatórias. Quanto à ventilação, 50% delas apresentavam ventilação adequada. Porém, para as fábricas instaladas em boxes de feira, este item não foi avaliado, uma vez que estas indústrias eram cobertas, mas não possuíam paredes e divisórias.

Nenhuma das empresas avaliadas possuía pia exclusiva para higienização das mãos na área de produção; resultado análogo ao obtido por Veiga et al¹⁵ em estabelecimentos de manipulação de alimentos em Maringá-PR. O hábito da lavagem das mãos proporciona maior segurança, uma vez que o manipulador é o

principal agente disseminador de microrganismos. Este fato pode ser comprovado através de estudo de caldos de cana comercializados em São Carlos-SP, no qual foram detectados coliformes termotolerantes nas mãos de 37% dos manipuladores, com contagens de organismos heterotróficos atingindo valores de até $2,0 \times 10^3$ UFC/mão e presença de *Escherichia coli* em uma amostra¹⁶. Por sua vez, Bastos et al¹⁷ em avaliação das mãos de manipuladores de polpas de frutas congeladas, verificaram a ausência de coliformes fecais em 100% das amostras analisadas; contudo, observaram a presença de *Staphylococcus aureus* em 6% das amostras.

Todas as indústrias possuíam sanitários, mas em apenas uma estes eram de uso exclusivo dos funcionários. Nas demais, os sanitários eram compartilhados: em uma das fábricas, localizava-se na residência anexa às instalações industriais; e, nas fábricas instaladas em feira, eram de uso coletivo de todas as pessoas que circulavam na feira. Quanto aos vestiários, apenas uma das empresas possuía essa dependência. Segundo a legislação, os estabelecimentos devem dispor de vestiários e banheiros convenientemente situados^{12,13}.

A maioria (75%) das indústrias tinha o seu lixo recolhido através da coleta pública e uma delas, por situar-se fora do perímetro urbano, desprezava-o em um depósito próprio. Quanto ao destino dos resíduos da industrialização, uma indústria utilizava-os como fertilizante, duas (50%) os comercializavam com fabricantes de rações e uma (25%) descartava-os diretamente no lixo. Em relação à rede de esgoto, 50% das indústrias possuíam fossa séptica e igual percentual lançava seus dejetos na rede pública.

A maior parte das indústrias (75%) era abastecida por água tratada proveniente da rede pública, e uma obtinha a água de poço artesiano, tratando-a posteriormente, através de um clorador. Apenas uma indústria não possuía caixa d'água, sendo que as situadas na feira utilizavam a caixa d'água central daquele local. Nenhuma das empresas realizava o controle da potabilidade. Bastos et al⁹, ao avaliarem a agroindústria de polpa de fruta na região Nordeste, constataram que 60% das fábricas estudadas utilizavam a água da rede pública; as demais eram supridas por água mineral ou abastecimento próprio (poços artesianos, fontes), após tratamento. Em estudo do cenário tecnológico de processamento de polpas de frutas na Paraíba, foi verificado que a água utilizada nas fábricas avaliadas era proveniente de poços artesianos em 71% dos casos, sendo clorada posteriormente; contudo, de modo semelhante ao observado no presente trabalho,

a concentração de cloro utilizada neste processo não era conhecida, o que pode levar à presença de resíduos de cloro ou à não eliminação dos contaminantes¹⁸.

Nenhuma das indústrias avaliadas realizava controle de pragas, o que estava em desacordo com a legislação vigente.

Em 50% das indústrias avaliadas, os equipamentos e utensílios eram de aço inoxidável e as superfícies eram lisas, impermeáveis, resistentes, não absorventes e de fácil higienização. Em apenas uma (25%) delas, os equipamentos e utensílios encontravam-se em bom estado de funcionamento, higienização e distantes do piso, de paredes ou de outros equipamentos, a fim de facilitar a operação de limpeza. Em todas as empresas, os equipamentos e utensílios encontravam-se em número suficiente; entretanto, em nenhuma delas era realizada manutenção preventiva. Quanto aos utensílios de limpeza, em todas as fábricas eram de uso exclusivo para este fim.

Em nenhuma das fábricas os procedimentos de higienização estavam escritos e disponíveis; resultado similar ao obtido por Bastos et al⁹ em avaliação de produtores de polpas de frutas na região Nordeste; entretanto, em todas, a higienização era realizada imediatamente após o uso. Quanto aos passos da higienização, observou-se que: 100% das indústrias realizavam a pré-lavagem; 75% delas aplicavam detergentes; 100% realizavam a lavagem final; 75% efetuavam a etapa de desinfecção com compostos clorados (água sanitária); porém, a concentração de cloro e o tempo de contato não eram padronizados e sequer conhecidos em nenhuma das fábricas que utilizavam este agente. Apenas uma empresa (25%) afirmou que havia treinado os funcionários para os procedimentos de higienização.

Em uma única indústria (25%), os equipamentos e utensílios mostravam-se limpos ao contato visual e tátil e eram guardados de modo que ficassem protegidos de recontaminação (poeira, insetos etc). Os produtos de limpeza utilizados eram de uso doméstico em todas as indústrias visitadas. Uma vez que os produtos de higienização empregados não eram de uso industrial, não foi avaliado se a utilização destes era feita de maneira correta (diluição, tempo de contato e modo de uso/aplicação). Observou-se grande deficiência de informações tecnológicas quanto às técnicas de sanitização, ou seja, os procedimentos de higienização nestas unidades produtivas eram realizados empiricamente.

Os manipuladores de alimentos têm papel fundamental na prevenção de doenças de origem

alimentar; contudo, em nenhuma das empresas avaliadas eles haviam recebido treinamento sobre higiene pessoal, segurança de alimentos e boas práticas. Em estudo com indústrias de polpas de frutas na região Nordeste, somente os estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Alagoas, Sergipe e Bahia tiveram capacitação de mão de obra, a qual foi realizada por órgãos governamentais⁹. De acordo com os resultados de questionário aplicado a manipuladores em estudo do manuseio de caldo de cana comercializado em São Carlos-SP, 57% dos manipuladores não conheciam a importância da higienização na prevenção de doenças transmitidas por alimentos e 62% não adotavam quaisquer práticas higiênico-sanitárias na manipulação¹⁶.

Em 50% das indústrias, correspondentes às marcas A e B, eram realizados exames médicos e laboratoriais por ocasião da renovação da carteira de saúde. Nas demais, por não terem documentação de autorização para funcionamento, os funcionários não possuíam carteira de saúde e nem eram submetidos a qualquer exame. Os artigos pessoais dos funcionários eram mantidos afastados da área de produção em 50% das indústrias; o restante das empresas estava em desacordo com a legislação, pois esta recomenda que não devem ser guardados artigos pessoais na área de manipulação.

A aparência (pele sem ferimentos ou lesões, cabelos totalmente cobertos, unhas curtas, limpas e sem esmalte, homens sem barba, sem adornos) não era adequada em nenhuma das indústrias. Em apenas uma delas (25%), os manipuladores higienizavam as mãos nos momentos adequados.

Quanto à utilização de EPIs (equipamentos de proteção individual), em todas as indústrias foi observado o uso de algum equipamento, sendo mais comuns gorro, jaleco, luvas e botas. Entretanto, em nenhuma das fábricas os manipuladores utilizavam EPIs completos, limpos e bem conservados. Estes resultados são condizentes aos obtidos por Bastos et al⁹ em pesquisa com funcionários de agroindústrias de polpas da região Nordeste.

Algumas matérias-primas utilizadas pelas indústrias eram oriundas de outros estados da região Norte, principalmente do Amazonas, pois, em determinadas épocas do ano, o estado de Roraima não as tem disponíveis ou a quantidade ofertada pela produção local é insuficiente. Quanto ao controle da procedência (origem e transporte) das matérias-primas, apenas 50% das empresas realizavam este procedimento. Em estudo realizado por Maia¹⁹ em Boa Vista-RR, foi verificado que as frutas destinadas ao processamento de polpas eram distribuídas pelo produtor rural em condições de transporte inadequadas.

Em todas as indústrias a matéria-prima era avaliada visualmente antes do recebimento, com relação a características como grau de maturação, coloração e sabor. As frutas que não eram utilizadas imediatamente eram armazenadas em câmara fria, sendo que as fábricas instaladas em feira utilizavam caixas de isopor e freezer. Somente uma (25%) indústria monitorava a temperatura do armazenamento, através de termômetro; contudo, este controle não era registrado. A situação observada neste estudo é melhor do que a verificada em pesquisa efetuada em indústrias de polpas de frutas na região Nordeste, onde 67% dos produtores avaliados não possuíam câmaras para armazenamento da matéria-prima, a qual ficava exposta à temperatura ambiente por até 24 horas⁹.

Os prazos de validade da matéria-prima só eram controlados por uma (25%) das indústrias, o que indica que, nas demais fábricas, havia a possibilidade de utilização de matéria prima com prazo de validade expirado.

Quanto às etapas do fluxo de produção, 100% das empresas realizavam a pesagem na recepção da matéria-prima. Na pré-seleção, a separação dos frutos maduros e descarte dos frutos impróprios eram efetuadas em 100% das indústrias. Em estudo realizado nos estados da região Nordeste, esta etapa era realizada de forma manual, através da verificação de características gerais e, em alguns casos, análise de sólidos solúveis e pH⁹. Na Paraíba, a seleção dos frutos era realizada por todos os produtores entrevistados, sendo que nenhum deles efetuava análises laboratoriais para complementar esta etapa¹⁸. Segundo Maia¹⁹, em avaliação do processamento de polpas de frutas em Boa Vista (RR), as frutas que chegavam às fábricas instaladas em feira, especialmente o açaí e o buriti, não eram submetidas à seleção.

A pré-lavagem e a lavagem das frutas com água clorada eram realizadas por somente uma (25%) indústria, a qual efetuava esta operação através de imersão, empregando água sanitária de uso doméstico, na concentração de 25 ppm de cloro, que é adequada para este procedimento. As demais empresas (75%) efetuavam apenas a lavagem. Esta é uma etapa crítica, onde são removidas as sujidades e reduzida a carga microbiana⁵. Em empresas produtoras de polpas de frutas da região Nordeste avaliadas por Bastos et al⁹, todas utilizavam o hipoclorito de sódio como sanificante. Maia¹⁹, ao analisar o processamento de polpas de frutas em Boa Vista-RR, constatou que as fábricas instaladas em feira não realizavam a lavagem.

A seleção era realizada por 100% das indústrias e o mesmo acontecia quanto ao descascamento e preparo

das frutas, que eram realizados manualmente. Apenas uma (25%) indústria informou que, dependendo da fruta, o descascamento era mecanizado. Esta etapa era realizada em recipientes plásticos em 50% das fábricas; nas demais, sobre lonas colocadas no chão ou sobre mesas.

O transporte para a despoldadeira era realizado através de baldes em 100% dos casos, sendo que somente uma das empresas empregava baldes de aço inoxidável nesta operação; nas demais, os baldes eram de plástico. Todas as fábricas eram equipadas com despoldadeira descontínua, isto é, provida de peneira única e efetuando somente a separação de polpas e sementes. Este processo era realizado por prensagem em uma indústria e, nas demais (75%), por processo centrífugo.

Segundo pesquisa de Maia¹⁹, em indústrias de polpas de frutas de Boa Vista-RR, as etapas de preparo e despoldadeira do fruto eram realizadas sem observação das condições de manipulação recomendadas, resultados condizentes aos verificados neste estudo.

A etapa de acabamento ou refino era efetuada por 75% das fábricas, as quais realizavam-na no mesmo equipamento do despoldamento. Nenhuma das indústrias possuía o tanque pulmão ou de equilíbrio, e o transporte do produto até a máquina de embalar era realizado manualmente, através de recipientes plásticos.

A máquina utilizada para embalar o produto era simples com termo-soldagem em todas as fábricas, sendo o produto embalado em sacos plásticos com diferentes capacidades em 100% das indústrias, de modo semelhante ao descrito por Maia¹⁹ em avaliação da produção de polpas de frutas em Boa Vista-RR. Nas agroindústrias de polpas de frutas dos estados do Nordeste avaliadas por Bastos et al⁹, as embalagens utilizadas por cerca de 90% eram de polietileno; na Bahia, as polpas eram também embaladas em tonéis, baldes e sacos de maior capacidade, para fins de terceirização.

Nas indústrias localizadas em feira avaliadas no presente estudo, a despoldadeira e o envase eram realizados no mesmo ambiente, ou seja, em condições que permitiam a contaminação do produto final; resultado similar ao verificado por Maia¹⁹.

O congelamento era realizado em freezer doméstico em 75% das indústrias e apenas uma empregava túnel de congelamento rápido. O emprego de freezer doméstico apresenta limitações devido ao longo tempo requerido, desencadeando reações bioquímicas, físicas e microbiológicas que influenciam a qualidade do produto^{5,9,20}. Quanto ao armazenamento, este também era efetuado em freezer

doméstico em 75% das fábricas. Somente uma indústria dispunha de câmara frigorífica para esta finalidade, sendo esta a única que armazenava o produto em equipamento exclusivo para este fim. Nas demais (75%), o armazenamento era realizado no mesmo equipamento que o congelamento, o que afeta a qualidade do produto, pois aumenta o tempo necessário para o congelamento completo do mesmo.

Segundo Bastos et al⁹, a conservação de polpa em empresas da região Nordeste era realizada através de congelamento lento (freezers) em 58% delas, enquanto que as demais empregavam uma combinação de métodos (máquinas hidroalcoólicas ou picoleteiras); para o armazenamento, cerca de 60% dos fabricantes estudados utilizavam freezers domésticos. Em indústrias de polpas de frutas de Boa Vista-RR, Maia¹⁹ observou que não havia controle da temperatura durante o congelamento.

Observa-se que o sistema de congelamento da maior parte das indústrias avaliadas não foi projetado e esta operação provavelmente não era eficiente. Além disso, o fato de a maioria das fábricas efetuarem o congelamento e o armazenamento no mesmo equipamento não garante que o produto fique armazenado na temperatura recomendada.

A distribuição para o comércio era realizada em veículo dotado de câmara fria por uma (25%) das indústrias (marca A). A empresa produtora das polpas da marca B efetuava este procedimento em veículo sem câmara fria, com o produto acondicionado em caixas de isopor, enquanto que a indústria correspondente às polpas da marca D informou que a distribuição só era realizada eventualmente e, quando realizada, o meio de transporte usado era motocicleta. A fábrica produtora das polpas da marca C, por sua vez, não realizava esta operação, uma vez que suas vendas se concentravam diretamente no consumidor que se desloca até a feira, de modo análogo ao fabricante da marca D. Em 100% das indústrias a temperatura não era abaixada a -25°C no período que antecede a distribuição. As condições nas quais se realizava a distribuição comprometem a qualidade do produto, pois não há garantia da manutenção da temperatura a -18°C, devido ao tipo de veículo utilizado por 50% dos fabricantes e à não redução da temperatura no período anterior à distribuição.

Quanto às condições para ocorrer contaminação cruzada no fluxo produtivo, em 75% das empresas estas condições estavam presentes, principalmente devido ao *layout* e armazenamento conjunto de matéria-prima e produto final.

As análises laboratoriais para verificação da qualidade do produto eram realizadas por apenas um

(25%) fabricante. Ainda assim, estas análises eram efetuadas por lote da matéria-prima e não por lote do produto, sendo as amostras coletadas pelos fiscais da Delegacia Federal de Agricultura. A deficiência observada em relação aos procedimentos de controle de qualidade nas indústrias avaliadas no presente estudo é semelhante à situação descrita por pesquisadores em outros estados. A maior parte das empresas produtoras de polpas de frutas avaliadas em pesquisa efetuada no estado da Paraíba tinha o seu controle de qualidade restrito à matéria-prima e ao produto final, sendo que apenas 43% das indústrias coletavam amostras durante o processamento¹⁸. Em pesquisa efetuada por Bastos et al⁹, 40% das empresas avaliadas na região Nordeste conferiam apenas qualidades sensoriais do produto no momento da despolpa e na maioria das unidades não existia laboratório. A implantação de práticas e sistemas de qualidade é imprescindível para o desenvolvimento deste ramo agroindustrial, visando agregar valor ao produto e promover sua inserção em outros mercados.

Nenhuma das indústrias avaliadas possuía Manual de Boas Práticas, documento cuja existência em estabelecimentos produtores de alimentos é exigida pela legislação¹⁴. Quanto ao sistema APPCC, foi observado em visitas preliminares que nenhuma das empresas o aplicava. O desconhecimento da importância e da necessidade de implantação das BPF e de sistemas de qualidade, de modo geral constatados neste estudo, também foi observado por pesquisadores em outros estados brasileiros. Em avaliação de indústrias de polpas de frutas do Ceará, Bastos et al²¹ verificaram que 90% destas desconheciam as Boas Práticas de Fabricação e não realizavam controle do processo produtivo. Por sua vez, em estudo que englobava as empresas produtoras de polpas de frutas na região Nordeste, Bastos et al⁹ constataram que 40% delas não empregavam as Boas Práticas de Fabricação e, entre os fabricantes de Pernambuco, apenas 24% tinham conhecimento de que a implantação deste sistema é uma exigência prevista em legislação. Em pesquisa que explorava a produção de polpas de frutas na Paraíba, foi observado que nenhuma das empresas tinha conhecimento da exigência de implantação de sistemas de qualidade em indústrias processadoras de alimentos¹⁸.

Pelo exposto, verifica-se que as condições de funcionamento da maior parte das indústrias avaliadas eram bastante precárias, exigindo investimentos financeiros e treinamento de pessoal. Os resultados obtidos estão de acordo com pesquisa realizada por Maia¹⁹ em Boa Vista-RR, que constatou que as etapas do processo

produtivo de polpas de frutas das indústrias locais não estavam de acordo com a legislação.

CONCLUSÃO

As condições de funcionamento das indústrias avaliadas caracterizaram-se como precárias, nenhuma delas aplicava as Boas Práticas de Fabricação nem haviam sistemas de qualidade implantados, a mão de obra empregada não era qualificada e foram observadas diversas deficiências no processo produtivo, o qual não atendia aos requisitos da legislação.

Os principais aspectos que devem ser melhorados a fim de acatar às exigências mínimas da legislação são:

- registro dos fabricantes que trabalham à margem do sistema legal;
- contratação de responsável técnico nas empresas que não dispõem deste profissional, o qual possui competência para implementar as Boas Práticas de Fabricação, supervisionar o processo produtivo e adotar métodos de controle e garantia da qualidade;
- adequar as instalações físicas, bem como realizar o controle da potabilidade da água e o controle integrado de pragas;
- manter os equipamentos em bom estado de funcionamento e higienização;
- dispor dos procedimentos de higienização por escrito, obedecendo a todas as etapas e utilizar corretamente produtos de limpeza específicos para indústrias de alimentos;
- treinar os manipuladores sobre higiene, segurança de alimentos e boas práticas, bem como submetê-los a exames médicos periódicos;
- manter registros dos prazos de validade da matéria-prima e das operações produtivas;
- efetuar corretamente a sanitização das frutas;
- projetar sistemas de congelamento, armazenamento e transporte que garantam que o produto se mantenha nas condições recomendadas;
- implementar controles laboratoriais.

A adoção destas ferramentas possibilitará a obtenção de alimentos seguros, inócuos e ricos nutricionalmente, além de agregar valor econômico ao produto e possibilitar a conquista de novos mercados.

AGRADECIMENTOS

A CAPES, ao CNPq e ao Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais (PRONAT) da UFRR.

REFERÊNCIAS

1. Brunini MA, Durigan JF, Oliveira AL. Avaliação das alterações em polpa de manga 'Tommy-Atkins' congeladas. *Rev Bras Frutic*. 2002;24 (3):651-3.
2. Cáceres MC. Estudo do processamento e avaliação da estabilidade do "blend" misto a base de polpa de tamarindo (*Tamarindus indica* L.) e suco de beterraba (*Beta vulgaris*). [dissertação de mestrado]. Campinas, São Paulo: Universidade Estadual de Campinas, 2003.
3. Kuskoski EM, Asuero AG, Troncoso AM, Mancini-Filho J, Fett R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2005;25(4):726-32.
4. Salgado SM, Guerra NB, Melo AB. Polpa de fruta congelada: efeito do processamento sobre o conteúdo de fibra alimentar. *Rev Nutr*. 1999;12(3):303-8.
5. Mororó RC. Como montar uma pequena fábrica de polpas de frutas. 2ª ed. Viçosa: Centro de Produções Técnicas; 2000.
6. Bueno SM, Lopes MRV, Graciano RAS, Fernandes ECB, Garcia-Cruz CH. Avaliação da qualidade de polpas de frutas congeladas. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2002;62(2):121-6.
7. Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial (Rio de Janeiro – Brasil). Elementos de apoio. Boas práticas e sistema APPCC. Rio de Janeiro (RJ): Senai; 2001. 278p.
8. Bobbio FO, Bobbio PA. Introdução à química de alimentos. São Paulo: Varela; 1992.
9. Bastos MSR, Feitosa T, Oliveira MEB. Análise qualitativa e tecnológica da agroindústria de polpa de fruta na região Nordeste. *Rev Bras Frutic*. 1999;21(3):359-64.
10. Mata MERC, Duarte MEM, Zanini HLHT. Calor específico e densidade da polpa de cajá (*Spondias lutea* L.) com diferentes concentrações de sólidos solúveis sob baixas temperaturas. *Eng Agríc*. 2005;25(2):488-98.
11. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 1.428, de 26 de novembro de 1993. Aprova o Regulamento técnico sobre inspeção sanitária, boas práticas de produção/prestação de serviços e padrão de identidade e qualidade na área de alimentos. [acesso 2009 Ago 13]. Disponível em: [<http://www.anvisa.gov.br/e-legis>].

12. Brasil. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria nº 368, de 04 de setembro de 1997. Aprova o Regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de elaboração para estabelecimentos elaboradores/industrializadores de alimentos. [acesso 2009 Ago 13]. Disponível em: [<http://www.anvisa.gov.br/e-legis>].
13. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 326, de 30 de julho de 1997. Aprova o Regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos. [acesso 2009 Ago 13]. Disponível em: [<http://www.anvisa.gov.br/e-legis>].
14. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 275, de 21 de outubro de 2002. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos e a lista de verificação das Boas Práticas de Fabricação em estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos. [acesso 2009 Ago 13]. Disponível em: [<http://www.anvisa.gov.br/e-legis>].
15. Veiga CF, Doro DL, Oliveira KM, Bombo DL. Estudo das condições sanitárias dos estabelecimentos comerciais de manipulação de alimentos do município de Maringá, PR. *Higiene Alimentar*. 2006;20(138):28-36.
16. Oliveira ACG, Seixas ASS, Souza CP, Souza CWO. Microbiological evaluation of sugarcane juice sold at street stands and juice handling conditions in São Carlos, São Paulo, Brazil. *Cad Saúde Pública*. 2006;22(5).
17. Bastos MSR, Feitosa T, Borges MF, Oliveira MEB, Azevedo EH, Cunha VA et al. Avaliação microbiológica das mãos de manipuladores de polpa de frutas congeladas. *Higiene Alimentar*. 2002;16(94):55-7.
18. Bastos MSR, Pimentel CRM, Feitosa T, Oliveira MEB, Cunha VA. Cenário tecnológico da produção de polpa de fruta congelada no estado da Paraíba. *Higiene Alimentar*. 1999;13(59):18-21.
19. Maia RSM. Avaliação da qualidade microbiológica e condições de processamento de polpas de frutas comercializadas em Boa Vista/RR. [monografia]. Boa Vista-RR: Universidade Federal de Roraima, 2004.
20. Fázio MLS, Gonçalves TMV, Repisso CS, Martins M, Hoffman FL. Qualidade microbiológica de polpas congeladas de frutas, comercializadas na região de São José do Rio Preto, SP. *Higiene Alimentar*. 2006;20(138):92-7.
21. Bastos MSR, Souza Filho MSM, Oliveira MEB, Feitosa T. Boas práticas de fabricação: uma alternativa para melhoria da qualidade de polpas congeladas de frutas. *Higiene Alimentar*. 1998;12(55):15

Influência da suplementação proteica sobre a concentração de proteína e imunoglobulina A do leite materno

Protein supplementation effects on human milk protein and A immunoglobulin concentrations

RIALA6/1296

Eliana Fagundes Queiroz BORTOLOZO^{1*}, Lys Mary Bileski CANDIDO², Aline Oliveira COLOMBO³, Guataçara dos SANTOS JUNIOR⁴

¹Departamento de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Campus Ponta Grossa - Avenida Monteiro Lobato, s/n - km 4 - CEP 84016-210 - Ponta Grossa, PR - 42-32204823 - bortolozo@utfpr.edu.br

*Rua Euzébio da Mota, 361, CEP 84051-530 - Ponta Grossa, PR, Brasil

²Coordenação de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Campus Francisco Beltrão, Francisco Beltrão, PR, Brasil

³Departamento de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Ponta Grossa, PR, Brasil

⁴Diretoria de Pós-graduação, Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Campus Ponta Grossa PR, Brasil

Recebido: 15.01.2010 - Aceito para publicação: 19.09.2010

RESUMO

As amostras de leite de mulheres lactantes suplementadas com proteína de soro de leite bovino e com dieta alimentar adequada foram analisadas e comparadas com as de lactantes não suplementadas. A influência da suplementação proteica nas concentrações de proteína e de IgA foi avaliada em amostras de leite de 90 nutrízes, suplementadas com 14g de proteína durante o último trimestre de gestação e 20g nos primeiros três meses de lactação. A concentração de proteína do leite foi determinada após 30 (T30), 60 (T60) e 90 (T90) dias de lactação. A de IgA, em 30 (T30) e 60 (T60) dias de lactação. A composição média de proteína no leite de mães suplementadas foi de 1,22 g/dL para T30; 1,16 g/dL para T60 e 1,07 g/dL para T90, e de 0,94 g/dL para T30; 0,79 g/dL para T60 e 0,79 g/dL para T90 no grupo controle. A concentração de IgA foi de 109,1 mg/dL para T30; 94,4 mg/dL para T60 no grupo suplementado e no grupo controle de 72,8 mg/dL para T30 e 65,0 mg/dL para T60. Houve diferenças significativas nos valores de proteína e de IgA, em maiores concentrações, no leite das mães suplementadas, quando comparadas ao grupo controle.

Palavras-chave. nutrição da lactante, leite humano, proteína, IgA.

ABSTRACT

Milk samples from healthy lactating women, who had been supplemented with bovine milk serum protein and receiving an adequate food regimens, were evaluated on protein composition and IgA concentration, and compared with those data from control group. The effect of protein supplementation on protein and IgA concentrations was investigated in milk samples from 90 nursing mother, who were supplemented with 14g of protein during the last trimester of pregnancy and with 20g at the first three months of lactation. The protein contents in mother milk were determined at 30 (T30), 60 (T60) and 90 (T90) days of post-lactation. IgA concentration was analyzed at 30 (T30) and 60 (T60) days of lactation. The average protein contents in milk samples from supplemented were 1,22 g/dL at T30; 1,16 g/dL at T60 and 1,07 g/dL at T90, and being 0,94 g/dL at T30; 0,79 g/dL at T60 and 0,79 g/dL at T90 in milk samples from control group. IgA concentrations in milk from supplemented mothers were 109,1 mg/dL at T30; 94,4 mg/dL at T60, and in control group were 72,8 mg/dL at T30 and 65,0 mg/dL at T60. The overall results demonstrated a positive effect of proteins supplementation on human milk composition, when compared with the control group.

Key words. maternal nutrition, human milk, protein, IgA.

INTRODUÇÃO

Relevante papel exerce a alimentação sobre a saúde humana. No período de gestação, ocorre aumento das necessidades nutricionais, graças ao crescimento do feto, placenta, tecidos maternos, além do próprio consumo da gestante^{1,2,3}. Provavelmente, em nenhuma outra fase do ciclo vital ocorre, em tão breve tempo, maior alteração no funcionamento e na forma do corpo humano. No caso do consumo de proteínas, recomenda-se acréscimo de 14 – 20g dia^{4,5}.

No período de lactação, a demanda de nutrientes é ainda maior do que na gestação. Quanto às necessidades médias de proteína da nutriz, recomenda-se acréscimo de 20-25g por dia^{4,5,6}.

Sobre a composição de nutrientes do leite humano, estudos documentaram flutuação na concentração, tanto em face do tempo de lactação, quanto no caso de uma nutriz para outra, comprovando-se diferença significativa de lipídios, nitrogênio e energia^{7,8,9}. Há controvérsias quanto à influência da dieta na composição do leite humano. Segundo Paul et al⁷, a dieta materna pode alterar a concentração de ácidos graxos e, em menor grau, a de proteína. Outro estudo conclui que, em populações bem nutridas, a dieta materna pouco afeta a composição do leite humano¹⁰.

Especificidades, tais como nível socioeconômico, idade gestacional e idade materna, poderiam interferir na composição do leite humano, sobretudo nos níveis de proteínas e minerais^{11,12}. Estudo realizado por Bortolozzo et al¹³ demonstrou variação na concentração de proteínas, segundo a idade de lactação, bem como no leite de mães de recém-nascidos a termo e pré-termo.

Fator importante na composição do leite humano é a concentração de imunoglobulinas. A principal delas, que é a IgA, fornece defesa contra infecções da mucosa por vírus ou bactérias¹⁴. Comparando-se concentrações de imunoglobulinas no leite de nutrizes de diferentes estados nutricionais e de níveis socioeconômicos diversos, não houve diferenças significativas¹⁵.

Ante a controvérsia sobre o valor da dieta no perfil nutricional do leite, este estudo teve como objetivo avaliar a influência da suplementação proteica, com proteína do soro do leite, sobre a composição de proteína e IgA do leite de lactantes saudáveis, todas ingerindo dieta adequada, levando-se em conta a importância desses elementos para a saúde do lactente, além de se considerar a pesquisa um subsídio para implantação de programas de nutrição materna.

MATERIAL E MÉTODOS

O delineamento experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, tendo recebido do Conselho Nacional (CONEP) o número 095.SM058/04-07. A casuística envolveu 90 gestantes (75% daquelas que aderiram ao estudo), com idade entre 18 e 38 anos, saudáveis, não fumantes, todas no último trimestre de gravidez, incluídas em demanda espontânea. Esta amostragem representou 47% das mulheres atendidas num posto municipal de saúde da mulher, que se enquadravam no perfil do estudo, durante o segundo semestre de 2007 e o ano de 2008. Após receberem explanação sobre os objetivos do estudo, as que demonstraram interesse assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Elas responderam a perguntas estruturadas, relacionadas à situação socioeconômica (renda familiar, escolaridade, condições de moradia). Durante o último trimestre de gravidez, até três meses pós-parto, foram acompanhadas mensalmente, sendo avaliado seu peso e seu padrão alimentar.

Este estudo se constituiu de um ensaio randomizado, placebo-controlado, sendo que, mediante sorteio, as participantes formaram dois grupos: 48 no grupo estudo, recebendo suplementação proteica (GP), e 42 no grupo controle (GC). De acordo com as recomendações, a intervenção consistiu na suplementação diária de 14g de proteínas (isoladas de proteína de soro de leite) para gestante (último trimestre), e 20g para nutriz (3 primeiros meses pós-parto)⁴. A escolha do suplemento recaiu nas comprovadas propriedades biológicas e funcionais da proteína do soro de leite¹⁶. Foi usado suplemento proteico em pó, composto unicamente de concentrado de proteína do soro do leite, acondicionado em embalagens de 200g, acompanhado de uma colher-medida. Sendo as participantes orientadas quanto à quantidade e forma de consumo do produto, a suplementação teve início no período de gestação (terceiro trimestre), fase esta de maior crescimento do feto. O grupo controle recebeu cápsulas de amido.

Para que as participantes mantivessem alimentação adequada a gestantes e nutrizes, foi feito inicialmente o diagnóstico qualitativo do padrão nutricional, valendo-se de inquérito alimentar recordatório, de 24 horas, em três dias consecutivos, incluindo-se um dia de final de semana¹⁷. O consumo de alimentos foi relatado pelas gestantes em medidas caseiras, utilizando-se padronizações. A análise tomou por base a média dos três recordatórios.

A análise qualitativa observou as normas do Guia da Pirâmide Alimentar, que prescreve porções distribuídas,

proporcionalmente, em grupos alimentares: cereais (pães, cereais, raízes, tubérculos), hortaliças, frutas, carnes, leite¹⁸.

A partir do diagnóstico, todas receberam orientação nutricional individual. Nas visitas posteriores, em período pré-natal, foi aplicado questionário de frequência alimentar, para constatar a observância do padrão alimentar proposto¹⁷. Durante a lactação, as mães receberam orientação dietética, quando da visita domiciliar para coleta das amostras de leite.

Foram realizadas análises da composição do leite das mães do grupo estudo e do grupo controle, sendo coletadas amostras em tempo 30 (30 dias após o parto); 60 (60 dias após o parto) e 90 (90 dias após o parto). O período de coleta do leite estendeu-se durante 2007 e 2008, sendo observadas as condutas de coleta indicada para os profissionais da saúde recomendadas pela Sociedade Brasileira de Pediatria¹⁹. As mamas foram previamente higienizadas com água deionizada, no momento da coleta feita nas residências, padronizada pela retirada do leite com expressão manual, início da secreção, em uma única mama²⁰. As amostras foram armazenadas em recipiente estéril, transportadas em caixa isotérmica, congeladas sob temperatura de -20°C, durante 30 dias no máximo, descongeladas em banho-maria (38°C) e submetidas às seguintes análises, em triplicata:

- Proteína, pelo método de Kjeldahl²¹.

- IgA, em placas de imunodifusão radial, observando-se a formação de um imunocomplexo, com anticorpo específico, no gel de agarose das placas de NOR-Partigen* (Boehringer Ingelheim do Brasil). O diâmetro destes anéis de precipitação é diretamente proporcional à concentração da proteína correspondente. Para cálculo da concentração de imunoglobulina, utilizou-se uma tabela de referência, fornecida pelo fabricante.

Os dados obtidos foram expressos em média e desvio-padrão. Na sequência, verificou-se a existência de *outliers* (valores extremos), pela análise do *boxplot* (diagramas em caixas). Os *outliers* localizados foram excluídos. Finalmente, foi aplicado o teste análise de variância, com vistas a detectar possíveis diferenças entre as médias; a seguir, o teste de Tukey, para identificar possíveis diferenças significativas. Foram verificados os requisitos ou pressupostos para aplicação do teste análise de variância. Em todos os cálculos, foi fixado um nível de significância máximo de 5% ($p < 0,05$). O software utilizado em todos os testes estatísticos foi *Minitab* – versão 15.

RESULTADOS

As gestantes tinham idade média de 25 anos, nível escolar oscilando principalmente entre fundamental completo (34%) e médio completo (37%), renda familiar média de 2 a 4 salários mínimos (57%), sendo que 65% trabalhavam fora e 73% tinham casa própria. Quanto ao número de gestações, 40% estavam na primeira, 30% na segunda, 30% na terceira ou mais.

O padrão alimentar está apresentado na Tabela 1. A ingestão do grupo do leite foi em média duas porções/dia antes da orientação nutricional, passando para três porções após a orientação nutricional. Para o grupo das carnes, o número de porções relatadas foi de duas porções/dia antes e após a orientação nutricional. O grupo de cereais passou de um consumo médio de oito porções/dia para nove porções após a orientação nutricional. No grupo das hortaliças, as mães consumiam em média duas porções/dia antes da orientação, passando para um consumo de quatro porções/dia, após a orientação. Para o grupo das frutas, passou-se de um consumo médio de uma porção/dia, para três porções, após a orientação.

A Tabela 2 apresenta os valores encontrados nas análises físico-químicas para proteínas, nos diferentes tempos, nas amostras do grupo estudo (GP) e grupo controle (GC). Os valores de proteína foram, em média, para T30 de 1,22 g/dL; T60 de 1,16 g/dL; T90 de 1,07 g/dL. Para o grupo controle, os valores de proteína foram, em média, para T30 de 0,94 g/dL; T60 de 0,79 g/dL; T90 de 0,79 g/dL.

A Tabela 3 apresenta os resultados da estatística básica calculada para IgA, ou seja, média amostral e desvio-padrão amostral do GP e GC. Os valores de IgA para o GP foram: 109,1 mg/dL para o tempo 30, e 94,4 mg/dL para o tempo 60. Já para o GC, os valores foram de 72,8 mg/dL para o tempo 30, e 65,0 mg/dL para o tempo 60.

Tabela 1. Padrão alimentar (médio) das gestantes antes e depois da orientação nutricional (n=90)

GRUPO	Leite	Carne	Cereais	Hortaliças	Frutas
Recomendação*	3	2	9	4	3
Padrão alimentar A ^a	2	2	8	2	1
Padrão alimentar B ^b	3	2	9	4	3

*Porções diárias recomendadas¹⁸

^aPadrão alimentar A: porções diárias antes da orientação nutricional

^bPadrão Alimentar B: após orientação nutricional

Tabela 2. Valores de proteína (g/dL) do leite de mães recebendo suplementação proteica (GP) (n=48) e de mães do grupo controle (GC) (n=42)

Variáveis	Média	Desvio-padrão
GP T30 ^a	1,22	0,15
GP T60	1,16	0,13
GP T90	1,07	0,14
GC T30 ^b	0,94	0,15
GC T60	0,79	0,12
GC T90	0,79	0,16

^aSignificativamente diferente do tempo GP T90

^bSignificativamente diferente do tempo GC T60 e 90

Tabela 3. Valores de IgA (mg/dL) do leite das mães do grupo de estudo (GP) e controle (GC)

Variáveis*	Média	Desvio padrão
GP T30 ^a	109,1	17,8
GP T60 ^b	94,4	13,8
GC T30	72,8	16,9
GC T60	65,0	13,0

*GP= grupo estudo e GC= grupo controle

^aSignificativamente diferente do GC30, GC60

^bSignificativamente diferente do GC30 e GC60

DISCUSSÃO

O padrão alimentar apresentou-se monótono, com baixo consumo de frutas e hortaliças, sugerindo ingestão deficiente de micronutrientes, conforme relatado em outros estudos²². Em alguns casos, o consumo de alimentos proteicos (4 porções) e energéticos (12-14 porções) excedeu o recomendado. Estes resultados vão contra outros trabalhos, que revelaram dieta inadequada de gestantes^{23,24}. Na média, o consumo de alimentos proteicos (leite, carnes e leguminosas) se encontrava conforme o padrão preconizado¹⁸.

Após orientação, os resultados do inquérito (Tabela 1) revelaram melhora no padrão alimentar, sobretudo quanto a hortaliças e frutas, fato que comprova a importância de ações educativas sobre hábitos alimentares, auxiliando na seleção de alimentos compatíveis com o estado socioeconômico e fisiológico da gestante. No tocante ao peso adquirido durante a gestação, 82% das mulheres ganharam aumento de 9,9kg ($\pm 3,5$), considerado adequado²⁵, o que provavelmente foi influenciado pelo acompanhamento dietético durante o último trimestre de gravidez.

No tocante aos valores médios de proteína do GP (Tabela 2), pode-se comprovar diferença significativa entre as médias de T30 e T90 ($p < 0,05$), demonstrando que a composição do leite, no tocante a proteínas, varia com a sua maturação²⁶. Os valores médios de proteína apresentaram-se, em todos os tempos, acima daqueles encontrados na literatura brasileira, que é, em média, de 0,9 g/dL^{14,27}, o que se deve provavelmente à suplementação.

Para as médias do GC (Tabela 2), a correlação foi estatisticamente significativa entre as médias de T30 e T60, assim como entre as médias T30 e T90 ($p < 0,05$), indicando que a média T30 é que se apresenta diferente, significativamente, em relação às outras duas. Este resultado vem ao encontro de vários estudos que demonstraram a diminuição da concentração de proteína, ao longo do tempo de lactação^{8,13}.

O valor médio determinado nas amostras de leite de T30 foi semelhante aos encontrados na literatura¹². Vale ressaltar que as mães de ambos os grupos seguiam alimentação adequada, do ponto de vista de alimentos proteicos. Segundo a literatura, quando gestantes recebem, durante o pré-natal, informações sobre alimentação, há melhores resultados quanto ao consumo de energia e nutrientes²⁸.

Estudando-se os valores de proteína dos dois grupos (GP e GC), foram verificadas diferenças significativas, seja entre as médias de GP T30 e GC T30; GP T60 e GC T60, seja entre as de GP T90 e GC T90 ($p < 0,05$). Logo, houve diferenças significativas em todos os tempos, para a concentração de proteína, com maiores concentrações no leite das mães que receberam suplementação de proteínas. Estes dados sugerem que a intervenção adotada promoveu resultados expressivos, ou seja, a suplementação de proteína influenciou positivamente a composição do leite, quanto ao aspecto proteico. Considere-se que o grupo estudado apresentava condição socioeconômica similar, seguia acompanhamento pré-natal e era composto de mães saudáveis, que mantinham alimentação adequada, do ponto de vista proteico. Na literatura há muita controvérsia

sobre esta influência da dieta na composição do leite. Tem-se discutido, entretanto, se a concentração de proteínas do leite de mães desnutridas é mantida às expensas dos depósitos maternos²⁹.

Os valores de IgA para o GC (T30 e T60) foram semelhantes aos apresentados na literatura³⁰. O resultado do teste de análise de variância para os valores de IgA mostrou que as quatro médias apresentadas na Tabela 3 são diferentes, com grau de confiança superior a 99,9%. Ao se estudar as concentrações de IgA do grupo controle e grupo recebendo proteína, encontrou-se diferença significativa entre as médias GP T30 e GC T30; GP T30 e GC T60; GP T60 e GC T30, bem como entre as médias GP T60 e GC T60. Em suma: houve diferenças significativas em todos os tempos, quanto à concentração de IgA presente no leite das mães recebendo suplementação de proteína e das mães recebendo placebo. O grupo que recebeu suplementação apresentou concentrações mais elevadas de imunoglobulinas, com diferenças estatisticamente significativas em relação ao tempo de lactação e entre os grupos. Vale ressaltar que a proteína utilizada neste estudo, proteína do soro do leite, tem demonstrado em vários trabalhos possuir propriedade imunomoduladora, o que pode ter influenciado positivamente o resultado deste estudo^{31,32}.

Na literatura há, também, controvérsia sobre esta influência da dieta na composição de imunoglobulinas do leite. Situações como a experiência imunológica da mãe, infecções maternas recentes, grau de desnutrição, controle hormonal dependente da progesterona e da prolactina, níveis de estresse ou de depressão maternos, todos estes poderiam influenciar nas concentrações de IgA¹¹.

Os resultados deste estudo indicam que a intervenção adotada promoveu resultados significativos, estimulando a realização de outros estudos a fim de se avaliar o potencial modulador de diferentes fontes alimentares sobre a composição de proteínas no leite humano.

CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que a suplementação com proteína do soro do leite pode influenciar benéficamente a composição do leite de mães ingerindo uma dieta adequada. Levando-se em conta a importância das proteínas e da IgA do leite humano para o desenvolvimento e saúde do lactente, os resultados deste estudo apontam a importância do consumo de proteínas na dieta da lactante.

Agência Financiadora: SETI - Secretaria de Estado da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior do Estado do Paraná.

REFERÊNCIAS

1. Cox JT, Phelan ST. Nutrition during pregnancy. *Obstet Gynecol Clin N Am*. 2008;35:369-83.
2. Baiao MR, Deslandes SF. Alimentação na gestação e no puerpério. *Rev Nutr*. 2006;19:245-53.
3. Picciano MF. Pregnancy and lactation. In: Ziegler EE, Filer LJ. 7th ed. Washington DC: Present Knowledge in Nutrition; 1996.
4. Institute of medicine. Diet reference intakes for energy, carbohydrates, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids. Washington, DC: National Academy Press; 2005.
5. Trumbo P, Schlicker S, Yates AA, Poos M. Dietary Reference Intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids. *J Am Diet Assoc*. 2002;102:1621-30.
6. Carmo MGT, Colares LGT, Saunders C. Nutrição na lactação. In: Accioly E, Saunders C, Lacerda EMA. Nutrição em obstetria e pediatria. Cultura Médica, Rio de Janeiro; 2004.
7. Paul VK, Singh M, Srivastava LM, Arora NK, Diorari AK. Macronutrient and Energy content of Breast Milk of Mothers Delivering Prematurely. *Indian J Pediatr*. 1997;64:379-82.
8. Charpak N, Ruiz JG. Breast milk composition in a cohort of pre-term infants' mothers followed in an ambulatory programme in Colombia. *Acta Paediatr*. 2007;96:1755-9.
9. Ramírez Corría VDA. Lactancia materna: evaluación nutricional en el recién nacido. *Rev Cubana Pediatr*. [on line] 2005;77:2.
10. Picciano MF. Nutrient composition of human milk. *Pediatr Clin North Am*. 2001;48:53-67.
11. Coelho MRV. Estudo da composição química (gorduras totais, valor calórico total, proteínas totais, imunoglobulinas e ácidos graxos) do colostro de nutrizas adolescentes [tese de doutorado]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina de São Paulo; 1988.
12. Lamounier JA, Vieira GO, Gouvêa LC. Composição do leite humano, fatores nutricionais. In: Rego JD. Aleitamento Materno. São Paulo: Atheneu; 2006.
13. Bortolozzo EAFQ, Tiboni EB, Candido LMB. Leite humano processado em bancos de leite para o recém-nascido de baixo peso: análise nutricional e proposta de um novo suplemento. *Rev Panam Salud Publ*. 2004;16:199-205.
14. Braga LPM, Palhares DB. Efeito da evaporação e pasteurização na composição bioquímica e imunológica do leite humano. *J Pediatr*. 2007;83:59-63.
15. Cruz JR, Garcia BC, Urrutia JJÇ, Carlsson B, Hanson LA. Food antibodies in milk from Guatemalan women. *J Pediatr*. 1981;99:600-2.
16. Marshall K. Therapeutics Applications of Whey protein. *Alt Med Rev*. 2004;9(2):136-56.

17. Moreira EAM, Corso ACT, Correia EM, Dorichil SS. Comparação entre duas metodologias de avaliação de consumo alimentar: Recordatório de 24h e questionário de frequência alimentar. *Rev Hig Alim*. 2003;17:24-9.
18. Philippi ST, Latterza AR, Cruz AR, Ribeiro LC. Pirâmide Alimentar Adaptada: Guia para escolha de alimentos. *Rev Nutr*. 1999;12:65-80.
19. Sociedade Brasileira de Pediatria - SBP. Recomendações úteis para a manutenção do aleitamento materno em mães que trabalham fora do lar ou estudam. *Conduta do Profissional de Saúde*. [acesso 2007 Ago 27]. Disponível: [http://www.cbpediatria2006.sbp.com.br].
20. Melo ILP, Ribeiro KD Silva, Dimenstein R. Estudo das variações dos níveis de retinol no colostro humano de parturientes a termo e pré-termo. 2004. *Rev Bras Saúde Mater Infant*. 2004;4:249-52.
21. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo, Brasil). Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análises de alimentos. 3ª ed. São Paulo: Governo do Estado de São Paulo; 1985.
22. Pick ME, Edwards M, Moreau D, Ryan E. Assessment of diet quality in pregnant women using the healthy eating index. *J Am Diet Assoc*. 2005;105:240-6.
23. Bertin RL, Parisenti J, Di Pietro PF, Vasconcelos FAG. Métodos de avaliação do consumo alimentar de gestantes: uma revisão. *Rev Bras Saúde Mater Infant*. 2006;6:383-90.
24. Giddens JB, Krug SK, Guo S, Miodovnik M, Pradda JA. Pregnant adolescent and adult women have similarly low intakes of selected nutrients. *J Am Diet Assoc*. 2000;100:1334-40.
25. Siqueira AAF, Ciari Junior C, Mattos ILB, Buralli KO, Baptista Filho M, Schor N et al. Aplicação de uma curva de ganho de peso para gestantes. *Rev Saúde Públ*. 1977;11: 88-93.
26. Schanler RJ. The use of human milk for premature infants. *Pediatr Clin North Am Houston*. 2001;48:207-19.
27. Silva RC, Escorbedo JP, Gioielli LA, Quintal VS, Ibidi SM, Albuquerque EM. Composição centesimal do leite humano e caracterização das propriedades físico-químicas de sua gordura. *Quím Nova*. 2007;30:1535-8.
28. Santos LA, Mamede FV, Clapis MJ, Bernardi, JVB. Orientação nutricional no pré-natal em serviços públicos de saúde no município de Ribeirão Preto: o discurso e a prática assistencial. *Rev Latinoam Enferm*. 2006;14:688-94.
29. Becker G, Scott M. Nutrition for lactating women. *In: Mannel R, Martens PJ, Walker M. Core Curriculum for lactation Consultant Practice*. 2th ed London: International Lactation Consultant Association; 2007.
30. Teresa Neto M. Aleitamento materno e infecção ou da importância do mesmo na sua prevenção. *Acta Pediatr Port*. 2006;1:26-6.
31. Sgarbieri VC. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. *Rev Nutr*. 2004;17:397-409.
32. Saint-Sauveur D, Gauthier FS, Boutin Y, Montoni A. Immunomodulating properties of a whey protein isolate, its enzymatic digest and peptide fractions. *International Dairy Journal*. 2008;18:260-7.

Caracterização química parcial das Proteínas das Amêndoas da Munguba (*Pachira aquatica Aubl*)

Partial Chemical Characterization of the proteins of the nuts of Munguba (*Pachira aquatica Aubl*)

RIALA6/1297

Bernadete de Lourdes de Araújo SILVA^{1*}, Pushkar Singh BORA², Claudia Carneiro de AZEVEDO³

*Endereço para correspondência: Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba PB, Brasil. Endereço: Rua Paulino dos Santos Coelho, 930, Jardim Cidade Universitária, CEP: 58052-570, João Pessoa/PB, Brasil. Tel. (83) 3235-4769/ 9119-0547, e-mail: bernna_09@hotmail.com

¹Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba PB, Brasil. Endereço: Rua Paulino dos Santos Coelho, 930, Jardim Cidade Universitária, CEP: 58052-570, João Pessoa/PB, Brasil. Tel. (83) 3235-4769/ 9119-0547

^{2,3}Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Tecnologia Química e de Alimentos, Centro de Tecnologia. Endereço: Cidade Universitária, CEP: 58051-900, Tel: (83) 3216-7378, Campus Universitário I João Pessoa, PB/ Brasil

Recebido: 12.02.2010 – Aceito para publicação: 14.09.2010

RESUMO

A munguba (*Pachira aquatica Aubl*) é uma semente oleaginosa nativa do Sul do México e Norte do Brasil, cultivada como espécie ornamental. Com o propósito de investigar o seu uso na alimentação ou como ingrediente na indústria alimentícia, foram avaliados a composição centesimal, a fração proteica e alguns fatores antinutricionais. A taxa de lipídeos foi de 46,62% e a proteica foi de 13,75%, com características típicas de espécie oleaginosa. Na forma de torta, o índice proteico foi de 28,27%. Foram detectados os aminoácidos essenciais (g/100 g de proteína): valina (7,16), leucina (7,97) e lisina (5,27), porém, valor limitante de metionina + cisteína (2,42). Quanto aos aminoácidos não essenciais, os maiores índices foram de ácido aspártico (12,70) e ácido glutâmico (17,11). Na classificação proteica, a fração globulínica apresentou índice de 56,24%, albumina (22,86%), glutelinas (14,22%) e prolamina (1,43%). Pela análise eletroforética foram observadas quatro subunidades proteicas variando de 97,4 KDa a 29 KDa. O teor de tanino foi de 6,34 mg/g e a presença de atividade hemaglutinante foi detectada. A semente de munguba possui características proteicas adequadas, que possibilita o seu uso na indústria alimentícia e na aquicultura.

Palavras-chave. *Pachira aquatica Aubl*, semente, proteínas.

ABSTRACT

Munguba (*Pachira aquatica Aubl*) is an oleaginous seed native of southern Mexico and northern Brazil, and it is cultivated as gardening ornament. For investigating its use as food or as an ingredient in food manufacturing, the centesimal composition, protein fractions and some anti-nutritional factors were characterized. The lipid and protein contents were of 46.62% and 13.75%, respectively, which characterize it as being an oleaginous species. In a pie form, the protein contents was of 28.27. The following essential amino acids (g/100 g of protein) were found: valine (7.16), leucine (7.97) and lysine (5.27), but a limited amount of methionine + cysteine (2.42). Among the non-essential amino acids, aspartic acid (12.70) and glutamic acid (17.11g) showed the highest indices. For protein classification the globulin fraction was in highest index (56.24%), followed by albumin (22.86%), glutelins (14.22%) and prolamins (1.45%), being consistent with the characteristic profile of plant storage proteins. Four protein subunits ranging from 97.4 KDa to 29.0 KDa were found by electrophoretic analysis. The tanine contents was of 6.34 mg/g, and the haemagglutination activity was detected. The munguba seeds demonstrated the nutritional characteristics which are suitable for being used in food manufacturing and aquiculture.

Key words. *Pachira aquatica Aubl*, seed, proteins.

INTRODUÇÃO

A proteína de origem vegetal é uma alternativa da proteína animal para aplicações em alimentos, devido à substituição da matéria-prima e grande variedades de fontes, especialmente leguminosas, cereais e sementes oleaginosas¹. Fontes vegetais de proteínas podem diferir de fontes animais nos parâmetros digestibilidade, composição de aminoácidos e presença de fatores antinutricionais². As proteínas de origem vegetal podem melhorar o valor nutricional de produtos alimentícios, suprimindo a ausência de alimentos à base de carne e aumentando a disponibilidade de proteínas.

A industrialização de oleaginosas constitui-se num importante setor do sistema agroindustrial pela importância de seus produtos nas indústrias siderúrgicas, de cosméticos e como matéria-prima na indústria de alimentos para o consumo animal e humano³. Com a finalidade de aumentar o teor de proteína e melhorar o valor nutritivo dos produtos extrusados, várias fontes de proteínas vegetais estão sendo testadas para serem utilizadas nas formulações de produtos processados. O enriquecimento deste tipo de alimento é de grande interesse do público que busca produtos alimentícios mais nutritivos⁴.

As proteínas de fontes vegetais geralmente não são de tão boa qualidade quanto às de fontes animais, devido, ao pequeno suprimento de um ou mais dos seguintes aminoácidos: lisina, metionina, treonina e triptofano. São, então, incompletas ou parcialmente incompletas⁵. Apesar destas limitações, as proteínas vegetais através de tratamentos físico-químicos, completam a suplementação de aminoácidos com outras proteínas e fazem uma contribuição significativa para a dieta humana e ingestão de proteínas¹. A maior parte das proteínas vegetais, principalmente as proteínas de sementes de leguminosas possuem um grande número de fatores antinutricionais, tais como tanino, lectinas e inibidores de tripsina, que podem provocar efeitos fisiológicos adversos ou diminuir a disponibilidade de certos nutrientes durante o processo de digestão e absorção.

A munguba (*Pachira aquatica* Aubl.) é nativa do Sul do México e Norte do Brasil. Na região Amazônica, ocorre predominantemente em terrenos sujeitos a inundações periódicas, especialmente às margens dos rios e córregos. Espontaneamente, a árvore vegeta em locais úmidos, de onde provém a palavra “aquática” de seu nome científico. É encontrada na região Amazônica e no estado do Maranhão. No entanto, a munguba adapta-se

facilmente a condições bem diversas de solo e clima. É uma espécie muito cultivada como ornamental, especialmente para a arborização de praças e jardins⁶.

No entanto, a munguba é pouco utilizada pelos brasileiros não sendo reconhecida ainda como uma espécie de importância para exploração econômica. Suas sementes, por apresentarem um conteúdo elevado de óleo e uma quantidade significativa de proteínas, são objetos de estudo nesta pesquisa, a fim de avaliar o potencial de aproveitamento desta espécie e contribuir com informações técnico-científicas relacionadas com a caracterização proteica dessa oleaginosa instituindo sua utilização em consumo humano ou ingrediente funcional na indústria de alimentos.

O referente trabalho teve como objetivo analisar a composição centesimal, extrair e classificar as frações proteicas das amêndoas da munguba, determinar a composição dos aminoácidos da farinha desengordurada, analisá-la eletrofereticamente, além de determinar alguns fatores antinutricionais.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

A matéria-prima empregada nas análises foram as amêndoas das sementes da munguba (*Pachira aquatica* Aubl.) *in natura* adquiridas no centro urbano da cidade de João Pessoa/PB, Brasil. As análises foram realizadas nos Laboratórios do Departamento de Tecnologia Química e de Alimentos do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba – UFPB.

Obtenção da Farinha das Amêndoas

Para obtenção da farinha, as amêndoas da munguba *in natura* foram mantidas em estufa de circulação de ar a 40°C por 24 horas, seguidas de trituração em liquidificador doméstico até uniformidade da massa com movimentos giratórios instantâneos e tamisação em peneira comum.

A farinha integral foi submetida à extração lipídica através do Método de Soxhlet por 12 horas consecutivas utilizando como solvente orgânico hexano P.A. A farinha foi triturada em liquidificador doméstico, tamisada em malha de 48 mesh, acondicionada em recipiente.

Composição Centesimal

As determinações de umidade, cinza, proteínas e lipídeos foram realizadas seguindo a metodologia do

Instituto Adolfo Lutz – IAL⁷. O conteúdo de carboidratos totais foi calculado por diferença de 100 inserindo o teor de fibras com a soma dos demais componentes.

Extração e Classificação das Proteínas

Foi utilizado o sistema de classificação de Osborne⁸, para qualificar e quantificar os tipos de proteínas existentes nas amêndoas da munguba.

A farinha desengordurada foi extraída com solução de NaCl 0,5 M na proporção de 1:10 (m/v) e agitada durante quatro horas. Mais três reextrações foram realizadas no resíduo com as mesmas condições, mas mudando o tempo de agitação que passou a ser duas horas. O sobrenadante total obtido, após filtração à vácuo, foi submetido à diálise contra água destilada por 72 horas seguida de centrifugação (5.000 x G por 30 min, 5°C). O novo sobrenadante obtido representou a fração de albuminas e o precipitado, após ressuspensão em solução de NaCl 0,5M, a fração de globulinas. Para a obtenção das outras frações proteicas, o processo inicial anteriormente descrito foi repetido a partir do resíduo total, tendo como mudança o tempo de agitação, que passou a ser de uma hora, e as soluções de extração. O resíduo total foi tratado inicialmente com etanol a 70% para solubilização das prolaminas, o resíduo 1, com HCl 0,1M, para obtenção das glutelinas básicas. Os sobrenadantes contendo as prolaminas, as glutelinas ácidas e as glutelinas básicas foram submetidos à diálise contra água, centrifugação (5.000 x G por 30 min, 5°C), congelamento e liofilização. Os volumes dos sobrenadantes de cada extração foram medidos e o teor de proteínas solúveis determinado por Biureto⁹.

Determinação da Composição de Aminoácidos

A composição dos aminoácidos na farinha desengordurada foi determinada em amostras hidrolisadas com ácido clorídrico (HCL) 6N contendo 1% de fenol, seguida de derivação com fenilisotiocianato (PITC) e separação dos derivativos feniltiocarbamil-aminoácidos (PTC-aa) em coluna de fase reversa C 18. A quantificação da amostra foi feita por calibração interna multinível, com auxílio do ácido alfa aminobutírico (AAAB) como padrão interno, quantificados pela absorvidade UV em 254 nm. A determinação da amostra foi baseada na área de cada pico de aminoácido, tomando-se como referência a área do pico do padrão de aminoácidos com concentração conhecida¹⁰. Para cálculo do escore químico de aminoácidos, seguiu-se o método de Block e Mitchell¹¹. Os valores do conteúdo de

aminoácidos foram expressos em g/100 grama de proteína e comparados com o padrão da FAO¹² para adultos.

$$EQ = \frac{\text{mg de AA em 1 g de proteína teste}}{\text{mg de AA em padrão de necessidade}} \times 100 \text{ (Equação 1)}$$

Análise Eletroforética

Os experimentos de eletroforese em gel de poliácridamida em presença de SDS e 2-mercaptoetanol seguiram a técnica descrita por Laemmli¹³, adaptada para o uso de géis de separação em placas. Foi usado um gel separador a 12% de acrilamida e um gel condensador a 4% de acrilamida, ambos na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%.

Para avaliar o peso molecular da proteína da farinha desengordurada, o gel foi calibrado com marcador proteico contendo seis proteínas de peso moleculares 205, 116, 97,4, 66, 45 e 29 KDA (SIGMA, MW- SDS-200) e a imagem obtida da amostra foi comparada com o marcador através das bandas reveladas.

Fatores antinutricionais

Tanino

O teor de tanino especificado na farinha integral e desengordurada foi determinado colorimetricamente baseado na redução do ácido fosfotungstomolibdico (Folin-Denis) a molibdato. Utilizando-se espectrofotômetro e tomado a absorbância a $\lambda = 760 \text{ mn}$, segundo a metodologia de Rangana¹⁴.

Lectina

Para a determinação de lectinas nas amostras, utilizou-se o método descrito por Moreira e Perrone¹⁵, o qual se baseia na capacidade desses compostos em aglutinar células sanguíneas.

Hemácias humanas do sistema ABO e de coelho foram utilizadas no estado normal e tratada enzimaticamente (bromelina, papaína e tripsina). As amostras foram coletadas em recipientes contendo EDTA, lavadas cinco vezes com NaCl 0,15 M, centrifugadas e submetidas à determinação do hematócrito.

Análise Estatística

Foi aplicada a estatística descritiva com observação de médias e desvio padrão aos dados da composição

centesimal, frações proteicas, composição de aminoácidos e fatores antinutricionais. As análises foram realizadas pelo Programa SPSS 14.0 for Windows Evaluation Version 2, segundo método descrito por Maroco¹⁶.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Composição Centesimal da Farinha Integral das Amêndoas

A Tabela 1 apresenta os resultados da composição centesimal da farinha integral das amêndoas da munguba.

Tabela 1. Composição centesimal das amêndoas da munguba

Componentes	Teor (%)
Umidade	5,53 ± 0,09
Cinza	4,89 ± 0,09
Lipídeos	46,62 ± 0,85
Proteínas (N x 6,25)	13,75 ± 0,46
Carboidratos*	29,20

*Carboidratos por diferença (100 menos o somatório dos demais componentes). Resultados das análises com média e desvio-padrão de três repetições

Estudos realizados por Oliveira et al¹⁷, detectaram para as amêndoas da munguba, valores superiores em lipídeos (53,9%) e umidade (6,0%), inferior a cinza (3,5%), e semelhantes para proteína (12,9%) e carboidratos (29,7%).

Analisando as características químico nutricionais de espécies de sementes da Amazônia, Lago et al¹⁸, alcançaram para a semente da munguba um teor de lipídeos (44,1%) e proteína (15,1%), semelhantes aos índices encontrados. Nesse mesmo estudo, reportaram valores muito superiores de carboidratos (40,8%) quando comparados com a amostra e obtiveram também um teor de fibra de 9,1% para a semente.

Quando comparadas com outras oleaginosas, as amêndoas da munguba indicaram um percentual de proteínas (13,75%) inferior a colza (23,6%), soja (35,85%), de acordo com Barcelos et al¹⁹, e girassol (27,3%), algodão (32,3%), amendoim (27,6%), gergelim (21,0%), segundo Khalil et al²⁰. Os resultados mostraram-se semelhantes à fava de morcego (13,3%)²¹, e superiores às amêndoas da macadâmia (9,2%)²².

O teor de lipídeos observado (46,62%) foi superior ao da soja (14,2-25,5%), segundo estudos realizados por Deshpande e Damodaran²³, chichá (28,64%) de acordo com Oliveira et al¹⁷, e semente de melão (30,83%), conforme análises feitas por Melo et al²⁴. Portanto, é similar à semente de girassol (45,7-53,2%)²⁵ e ao amendoim (45,2%), segundo Associação Brasileira das Indústrias de Óleos – ABIOVE²⁶. Quanto ao índice proteico (N x 6,25) da farinha desengordurada, esta foi de 28,27 % respectivamente.

Classificação das Frações Proteicas da Munguba

Na Tabela 2, estão os resultados adquiridos das frações proteicas das amêndoas da munguba obtidas a partir da farinha desengordurada.

Tabela 2. Índices de proteínas das frações proteicas, de acordo com sua solubilidade

Frações Proteicas	Índices (%)
Albumina	22,86 ± 0,02
Globulina	56,24 ± 0,26
Prolamina	1,43 ± 0,01
Glutelinas	14,22 ± 0,14
Resíduo	5,36

Resultados das análises com média e desvio padrão de três repetições

As amêndoas da munguba seguem o perfil característico para as proteínas de reserva vegetais, apresentando a globulina como a principal fração com o índice de 56,24%, seguindo da albumina, com 22,86%, glutelinas, com 14,22% e prolamina, com 1,43%.

Para efeito de comparação, Chavan, Mckenzie e Shahidi²⁷ alcançaram valores superiores em albumina (43,00%) e prolamina (4,5%), e inferiores em globulina (41,00%) e glutelina (14,22%) para a semente de ervilha. Lourenço²⁸ obteve menores índices de globulina (30,66-32,16%) e de albumina (9,65-10,64%), e maiores índices de glutelina (30,04-30,22%) e de prolamina (5,33-4,54%), respectivamente, para a canola (variedade *Hyola 601* e 420). Já El-Adawy et al²⁹ e Khalil et al²⁰, encontraram valores semelhantes para a albumina (22,6-25-01%) e glutelina (13,57-18%), inferior para a fração globulina (41,9-45,13%), sendo superior a prolamina (7,2-8,9%) nas sementes de *roselle* e tamarindo. Bora e

Ribeiro³⁰ alcançaram, para as proteínas da amêndoa da macadâmia, valores superiores para a globulina (68,67%) e prolamina (2,15%), sendo inferiores à albumina (14,32%) e semelhante à prolamina (2,15%). Voigt et al³¹ atingiram, para a amêndoa de cacau, índice superior de albumina (52%) e índices inferiores para as frações globulina (43,00%) e glutelina (5,0%). As prolaminas não foram determinadas nesse estudo.

Determinação da Composição dos Aminoácidos

Os resultados da composição dos aminoácidos da farinha desengordurada da munguba e os requerimentos mínimos estabelecidos para adultos estão discriminados na Tabela 3. A Figura 2 mostra o aminograma da farinha desengordurada de acordo com a área de cada pico de aminoácido.

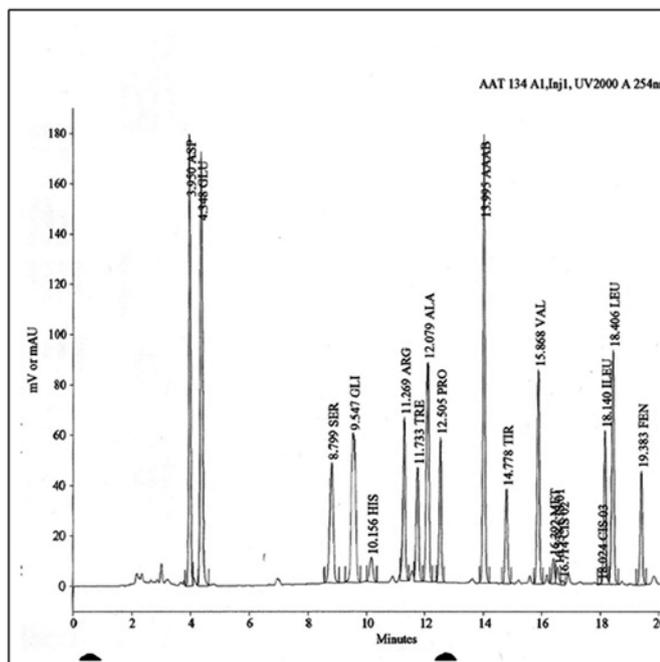


Figura 2. Aminograma da farinha desengordurada das amêndoas da *Pachira aquatica Aubl*

Os índices de aminoácidos essenciais mais pronunciados foram a leucina (7,97 g/100g de proteína), valina (7,16 g/100g de proteína) e a lisina, com 5,27 g/100g de proteína, porém, limitante em metionina + cisteína (2,42 g/100g de proteína) e histidina. Quanto aos aminoácidos não essenciais, os maiores índices obtidos foram o ácido aspártico (12,70 g/100g de proteína) e o ácido glutâmico (17,11 g/100 g de proteína), respectivamente.

Tabela 3. Composição aminoacídica na farinha desengordurada

Aminoácidos	Valor (g/100g de proteína)	Padrão FAO (g/100g) Adulto	Escore (g/100g) Adulto
Aminoácidos essenciais			
Lisina	5,27 ± 0,01	1,6	329,38
Treonina	3,71 ± 0,02	0,9	412,22
Valina	7,16 ± 0,01	1,3	550,77
Metionina + Cisteína	2,42 ± 0,02	3,4	85,29
Isoleucina	4,97 ± 0,02	1,3	382,31
Leucina	7,97 ± 0,01	1,9	419,47
Fenilalanina	4,90 ± 0,03	1,9	257,89
Tirosina	3,88 ± 0,02	1,9	204,21
Histidina	1,51 ± 0,02	1,6	94,38
Triptofano	N.d		
% AA essenciais	41,80		
Aminoácidos não essenciais			
Ác. aspártico	12,70 ± 0,02		
Ác. glutâmico	17,11 ± 0,03		
Serina	5,38 ± 0,01		
Glicina	5,06 ± 0,01		
Arginina	8,56 ± 0,05		
Alanina	5,38 ± 0,00		
Prolamina	3,73 ± 0,01		
% AA não essenciais	57,91		
TOTAL (%)	99,71		

Resultados das análises com média e desvio padrão de duas repetições
Legenda: N.d – não determinado

Esse perfil aminoacídico mostrou altos teores na maioria dos aminoácidos essenciais, quando comparado ao recomendado pela FAO/WHO¹². Os aminoácidos deficitários, comparados ao padrão, são os sulfurados (metionina + cisteína), sendo os limitantes com escore químico de 85,29%.

Segundo Matuda e Maria Netto³², aminoácidos sulfurados são limitantes na maioria das leguminosas, e o valor obtido para a semente da munguba foi próximo ao relatado para soja (*Glycine max L.*), (84%), e inferior para outras leguminosas como *Vicia faba* (56%) e *Vigna sinensis*.

Oliveira et al¹⁷, para as sementes da munguba, alcançaram valores similares para a leucina (7,99 g/100g de proteína) e histidina (1,60 g/100 g de proteína) inferiores para valina (6,38 g/100 g de proteína) e lisina (4,85 g/100 g de proteína), portanto, também limitantes para metionina e cisteína. Os aminoácidos não essenciais, ácido aspártico e ácido glutâmico também atingiram semelhança como os mais destacados.

Com base nessa comparação, confirma-se a limitação existente de aminoácidos sulfurados para essa espécie oleaginosa como na maioria das farinhas de origem vegetal. Mesmo assim, é possível sua implementação para elaboração de produtos, seja complementando com outros alimentos ou através de suas propriedades funcionais.

Análise Eletroforética

A Figura 1 representa o perfil eletroforético no sistema PAGE-SDS-2 β Me da farinha desengordurada das amêndoas da munguba.

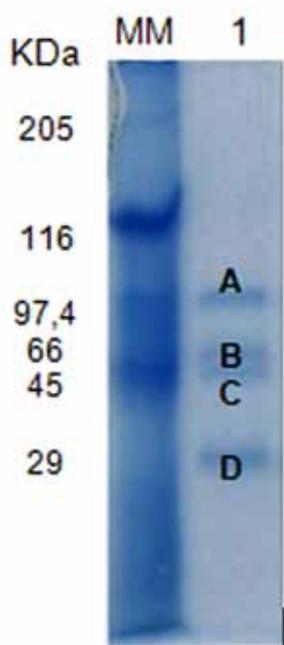


Figura 1. Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e 2 β Me, do marcador padrão (MM) e farinha desengordurada (Faixa 1)

É possível visualizar a existência de 4 bandas, as quais foram referenciadas pelas letras (A, B, C, D, E) na faixa 1, representando pesos moleculares de aproximadamente 97,4 KDa, 66 KDa, 45 KDa e 29 KDa, de acordo com a referência do marcador (MM) para as bandas de proteínas apresentadas no gel.

Chavan, Mckenzie e Shahidi²⁸, acompanhando o comportamento da fração proteica do isolado de ervilha e empregando o SDS-PAGE, identificaram a presença de várias bandas, a principal delas com pesos moleculares variando entre 35 KDA e 47 KDA. Adebowale e Lawal³³ relataram, para o concentrado proteico da mucuma, a presença de cinco bandas polipeptídicas com pesos moleculares variando de 200 KDA a 59 KDA, referente as amostras obtidas sob condições não reduzidas (sem 2-mercaptoetanol) e duas subunidades com peso molecular entre 97 KDA e 40 KDA, respectivamente.

Fatores Antinutricionais

Tanino

O teor de tanino analisado na farinha desengordurada da amêndoa da munguba foi de 6,34 mg/g de amostra. Ao contrastar o resultado com outras sementes, este valor mostrou-se superior para a farinha desengordurada (0,8mg/g) e isolado proteico (0,25 mg/g) da soja, segundo Fernández-Quintela et al³⁴, e, para a semente de canola das variedades Hyola 601 e 420, de acordo com Lourenço²⁸. Da mesma forma para o feijão preto irradiado (1,43 mg/g), em estudo realizado por segundo Mechi et al³⁵.

Os compostos polifenólicos localizam-se primariamente na cobertura das sementes, circunstância que credenciam a deduzir que a coloração das cascas influenciam na concentração de taninos. Segundo Chung e Ferrier³⁶, os taninos quando ingeridos em grandes quantidades e durante largos períodos podem ser responsáveis por reduzir a digestão alimentar, o grau de crescimento, a eficiência nutricional, a energia metabolizável e a digestibilidade de proteína.

Lectina

Quanto aos teores de lectina, verificou-se atividade hemaglutinante. Porém, este resultado foi comprovado por pesquisa feita por Oliveira et al¹⁷, usando as amêndoas. Ruiz e Sotelo³⁷, em estudo com a semente de soja do gênero tremoço, detectaram também atividade hemaglutinante para a semente.

CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que as sementes da *Pachira aquatica Aubl*, mostraram-se promissoras quanto aos teores de lipídeos e

proteínas, podendo se constituir uma boa fonte para exploração econômica.

As proteínas mostraram-se solúveis em sua classificação revelando a globulina como principal fração. A composição aminoacídica na farinha desengordurada detectou deficiência de aminoácidos sulfurados podendo se constituir base no preparo de alimentos industrializados.

Quanto aos fatores antinutricionais presentes, estes têm pequena consequência, pois são termolábeis e parte deles é geralmente destruída nas condições normais de preparo, doméstico ou industrial, dos alimentos.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Universidade Federal da Paraíba (UFPB) pela utilização dos Laboratórios do Departamento de Tecnologia Química e de Alimentos (DTQA) do Centro de Tecnologia e do Departamento de Biologia Molecular (DBM) e pelas análises executadas no Laboratório de Bioquímica, para realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Moure A, Sineiro L, Domínguez H, Parajó JC. Functionality of oilseed protein products: a review. *Food Res Int*. 2006;39:945-63.
2. Pires CV, Oliveira MGA, Rosa JC, Costa NMB. Qualidade Nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes protéicas. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2006; 26(1):179-87.
3. Paraíso PR, Andrade CMG, Zemp RJ. Destilação da Miscela II: Modelagem do *Stripping* do Hexano. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2005;25(1):37-44.
4. Souza ML, Menezes, HC. Avaliação sensorial de cereais matinais de castanha do Brasil com mandioca extrusados. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2006;26(4):950-5.
5. Mitchell HS, Anderson L, Dibble M, Turkki PR, Rynbergen H. *Nutrition in health and disease*, 17^a ed. Rio de Janeiro, 1988.
6. Peixoto AL, Escudeiro A. *Pachira aquatica* (Bombacaceae) na obra "História dos Animais e Árvores do Maranhão" de Frei Cristóvão de Lisboa. *Rodriguésia*. 2002;53(82):123-30.
7. 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.
8. Osborne TB. *The vegetable proteins*, 2^a Edição, London: Longman-Green, 1924.
9. Gornall AG, Bordawill CS, David MM. The determination of protein by the biuret reaction. *J Biol Chem*. 1949;177: 751-80.
10. Bidingmeyer BA, Cohen SA, Tarvin TL. Rapide analysis of amino acids using pré-column derivitilization. *J Chromatogr*. 1984;336: 93-104.
11. Block RJ, Mitchell HH. The correlation of the amino acid composition of protein with their nutritive value. *Nutr Abstr Rev*. 1946; 16(2):249-78.
12. FAO/OMS/ONU. *Organização Mundial de Saúde, Genebra. Relato de uma Junta de Conselho de Especialistas. Necessidades de Energia e Proteínas*. São Paulo: Roca, 1998.
13. Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage. *Nature*. 1970;227: 689-95.
14. Rangana S. *Manual of Analysis of Fruit and Vegetable Products*. New Dellhi: Tata McGraw-Hill, 1979.
15. Moreira RA, Perrone JC. Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol*. 1977; 59: 783-7.
16. Maroco J. *Análise estatística – com utilização do SPSS*. Lisboa: Sílabo, 2003.
17. Oliveira JTA, Vasconcelos IM, Bezerra LCNM, Silveira SB, Monteiro ACO, Moreira RA. Composition and nutritional properties of seeds *Pachira aquatica* Aubl, *Sterculia striata* St Hil et Naud and *Terminalia catappa* Linn. *Food Chem*. 2000; 70: 185-91.
18. Lago RCA, Pereira DA, Siqueira FAR, Szpiz RR, Oliveira JP. Estudo preliminar das sementes e do óleo de cinco espécies da Amazônia. *Acta Amaz*. 1986/87;16/17:369-76.
19. Barcelos MFP, Vilas Boas EVB, Lima MAC. Aspectos nutricionais de brotos de soja e de milho combinados. *Ciênc Agrotec*. 2002; 26(4):817-25.
20. Khalil M, Ragab M, Hassanien FR. Some functional properties of oilseed proteins. *Die Nahrung*. 1985; 29(3):275-82.
21. Queiroga Neto V. *Caracterização físico-química e nutricional do óleo e proteínas de amêndoas de fava de morcego (Dipteryx lacunifera, L.)* [tese de doutorado]. João Pessoa (PB): Universidade Federal da Paraíba; 2005.
22. Ribeiro D. *Caracterização dos lipídios e de proteínas das amêndoas de macadâmia (Macadâmia integrifolia Maiden e Betche)*. [dissertação de mestrado]. João Pessoa (PB): Universidade Federal da Paraíba; 2003.
23. Deshpande S, Damodaran S. *Food Legumes: chemical and technology*. *Adv Cereal Sci Technol*. 1990;10:147-241.
24. Melo MLS, Narain N, Bora PS. Characterization of some nutritional constituents of melon (*Cucumis melo* hybrid AF-522) seed. *Food Chem*. 2000; 68: 411-14.
25. Raymond J, Inquello V, Azanza JL. The seed proteins of sun flower: comparative studies of cultivars. *Phytochemistry*. 1991; 30(9): 2849-56.
26. Associação Brasileira das Indústrias de Óleos - Abiove . [Acesso 2008 maio 10]. Disponível em: [http://www.abiove.com.br].
27. Chavan UD, Mckenzie DBE, Shahidi F. Protein classification of beach pea (*Lathyrus maritimus* L.). *Food Chem*. 2001; 75:145-53.
28. Lourenço KDS. *Estudo comparativo parcial das características lipídica, e protéicas, determinação de fatores antinutricionais em sementes de duas cultivares de canola (Brassica napus, L.)*. [dissertação de mestrado]. João Pessoa (PB): Universidade Federal da Paraíba; 2004.

29. El-Adawy TA, Rahma EH, El-Bedawey AA, Gafar AF. Nutritional potential and functional properties of sweet and bitter lupin seed protein isolates. *Food Chem.* 2001; 74:455-62.
30. Bora PS, Ribeiro D. Note: Influence of pH on the Extraction Yield and Functional Properties of Macadamia (*Macadamia Integrofolia*) Protein Isolates. *Food Sci Technol Int.* 2003;10:263-7.
31. Voight J, Bichl B, Wazir SKS. The major seed protein of *Theobroma cacao L.* *Food Chem.* 1993;47:145-51.
32. Matuda GT, Maria Netto, F. Caracterização química parcial da semente de jatobá-do-cerrado. *Ciênc Tecnol Aliment.* 2005; 25:353-7.
33. Adebowale KO, Lawal OS. Foaming, gelation and eletroforetic characteristics of mucuma bean (*Mucuma pruriens*) protein concentrates. *Food Chem.* 2003:1-10.
34. Fernández-Quintela A, Macarulla MT, Del Barrio AS, Martínez JA. Composition and functional properties of protein isolates obtained from commercial legumes grown in northern Spain. *Plant Foods Hum Nutr.* 1997; 51: 331-42.
35. Mechi R, Caniatti-brazaca SG, Arthur V. Avaliação química, nutricional e fatores antinutricionais do feijão preto (*Phaseolus vulgaris L.*) irradiado. *Ciênc Tecnol Aliment.* 2005; 25 (1): 109-14.
36. Chung SL, Ferrier LK. pH and sodium chloride effects on emulsifying properties of egg yolk phosvitin. *J Food Sci.* 1992; 57(1): 40-2.
37. Ruiz-lopes MA, Sotelo A. Chemical composition, nutritive value, and toxicology evaluation of Mexican wild lupins. *J Agric Food Chem.* 2001; 49(11): 5336-9.

Composition, sensory evaluation and melting properties of caprine ice cream produced with different fat sources

Composição, avaliação sensorial e propriedades de derretimento do sorvete de leite de cabra produzido a partir de diferentes fontes de gordura

RIALA6/1298

Priscilla Diniz Lima da SILVA, Magdiely Stefanos Santana VARELA, Roberta Targino Pinto CORREIA*

*Corresponding author: Graduate Program in Chemical Engineering (PPGEQ). Laboratory of Bioactive Compounds and Animal Food Technology (LABTA), Chemical Engineering Department, Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN), 59078-900, Natal/RN, Brazil. Telephone: +55(84) 32153769 ext.231. Email: roberta@eq.ufrn.br.

Recebido: 17.03.2010 – Aceito para publicação: 28.09.2010

ABSTRACT

This study evaluated the composition (soluble and total solids, pH, titratable acidity, protein, fat, ash, total reducing sugar), the sensory attributes (appearance, odor, consistency and taste) and the melting behavior of two experimental formulations of caprine ice cream made with two different fat sources, hydrogenated vegetable fat (F1) and a trans-free fat replacer (F2). Soluble and total solids, fat and total reducing sugar of the ice cream samples were statistically different ($p < 0.05$). The sensory results showed high sensory acceptability index (AI) ($> 70\%$) for both formulations, with the exception of the flavour attribute of F1 formulation, which had AI equal to 62.041%. In the meltdown test, the F2 group melted faster than the F1 formulation. The results demonstrated that the source of fat used in the ice cream mix directly interferes with the melting characteristics, acceptance rate and physicochemical composition of ice cream.

Key words. goat milk, ice cream, sensory acceptance, meltdown test.

RESUMO

O presente estudo avaliou a composição (sólidos totais e solúveis, pH, acidez total titulável, proteína, gordura, cinzas, açúcares totais), os atributos sensoriais (aparência, odor, consistência e sabor) e o comportamento, durante o derretimento, de duas formulações experimentais de sorvete caprino elaborados com duas diferentes fontes de gordura, gordura vegetal hydrogenada (F1) e um substituto de gordura livre de ácidos graxos trans (F2). Os teores de sólidos totais e solúveis, gordura e açúcares totais das amostras de sorvete apresentaram diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$). Os resultados sensoriais mostram elevado índice de aceitação (IA) sensorial ($> 70\%$) para ambas as formulações, com exceção do atributo sabor da formulação F1 que apresentou IA de 62,041%. No teste de derretimento, o grupo F2 derreteu mais rápido que a formulação F1. Os resultados demonstraram também que o tipo de gordura usada interfere diretamente nas características de derretimento, nível de aceitação sensorial e composição do sorvete caprino.

Palavras-chave. leite de cabra, sorvete, aceitação sensorial, teste de derretimento.

INTRODUCTION

Nowadays, the Brazilian dairy industry is based on bovine milk products. Despite that, caprine milk has been historically produced in significant amounts in Northeastern Brazil, where nearly 90% of the national herd is located¹. Despite the larger volume available for cow milk, the production and marketing of goat milk and its products is a niche in the dairy industry sector, since the uniqueness of goat milk can be powerful in promoting dairy goats as a valuable complement to the dairy cow industry^{2,3}. It is also believed that goat milk and its processed products are greatly useful as functional foods, especially for those who suffer from cow milk allergy^{4,5}. Other important attributes of goat milk are its higher digestibility, distinct rheological characteristics and higher buffering capacity^{2,6,7}.

Despite its nutritional and technological significance, few attempts have been made to systematically study the use of caprine milk for production of dairy products other than cheese and yoghurt⁸. Ice cream, for example, is one of the many popular dairy products that could be successfully produced with goat milk. It is a product with high nutritional value, but in some countries ice cream is still identified by consumers simply as a dessert and its consumption is highly seasonal⁹.

One of the particularities of ice cream is its unique structure. The foamy structure of ice cream, in which air bubbles are covered by ice crystals, individual or partially coalesced fat globules and lactose crystals, can be classified as a colloidal complex of high consistency¹⁰. Fat behavior during stabilization, freezing and aeration has an important influence on the structure of ice cream. The fat crystals, when well homogenized, allow for the desired incorporation of air cells during whipping, maintaining a smooth texture^{11,12}. Fat contributes to the melting resistance of ice cream, promote softness and body and have the property of absorbing and retaining flavors¹³. The types of fat commonly used in ice cream formulations are hydrogenated fats. More recently fat-free formulations have been used as a result of a trend towards increased consumption of reduced fat products and one area where this potential exists is the production of fat reduced ice cream¹⁴.

Based on that, this study aimed to develop passion fruit ice cream using caprine milk by testing two experimental groups of ice cream samples made with different fat sources, hydrogenated vegetable fat and a trans-free fat replacer. Each experimental group

was characterized with respect to physicochemical composition and sensory acceptance. Melting behavior was also evaluated and the differences found between the two types of ice cream produced are discussed.

MATERIALS AND METHODS

Ice cream preparation

For each sample, an approximately 6.50 kg batch of ice cream mix was prepared and ingredients were added to the mixing tank (Brasfrio, Brazil) in the following order: 4.50 kg of reconstituted goat milk (Caprilat, Brazil), 0.32 kg of corn syrup (Corn Products Brazil, Brazil) and 0.80 kg of granular sugar. The mixture was heated to 40°C and mixed for 20 minutes. After that, it was added 0.14 kg of hydrogenated fat for group F1 (Duas Rodas Industrial, Brazil) or 0.40 kg of Selecta Cream fat replacer for group F2 (Duas Rodas Industrial, Brazil), 0.56 kg of stabilizer-emulsifier (Duas Rodas industrial, Brazil) and 0.20 kg of passion fruit flavoring (Duas Rodas Industrial, Brazil). The ice cream mixes were pasteurized in a batch pasteurizer (Etiel, Brazil) at 70°C for 30 minutes, cooled, transferred to a refrigerated holding tank (Brasfrio, Brazil) and aged for 20 hours at 4°C. The aged mixes were then frozen using a batch freezer (PHB 80/100, Brasfrio, Brazil), with an adjusted 100% overrun, packaged into 500 mL polyethylene containers (Copobras, Brazil), hardened and stored in a freezer (Electrolux, Brazil) at -18°C for 24 hours. Three batches of the two formulations were prepared in different days and ice cream samples were collected for triplicate analysis.

Analytical methods

For the pH measurement, about 10g ice cream samples were dissolved in 90 ml distilled water. After homogenization, the pH was measured using a pH meter (Hanna Instruments, USA)¹⁵. The acidity was determined by titration with a sodium hydroxide N/9 standard solution, using a 1% alcoholic phenolphthalein solution as an indicator¹⁶. The results were expressed as % lactic acid. The analyses of soluble solids were carried out using a model Smart1 refractometer (Atago, Japan), while total solids¹⁶ and ash content¹⁵ were analyzed using gravimetric determinations¹⁴. Protein analyses were performed using the Kjeldahl method¹⁵. The levels of total reducing sugars were determined by the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method¹⁷. Fat content was determined according to O'Dell and Watrous¹⁸ in which the Gerber butyrometer method for cream was used.

Sensory test

The sensory analyses were performed with 90 untrained panelists using a structured 9-point hedonic scale ranging from 1 (disliked it very much) to 9 (liked it very much). Ice cream was evaluated for appearance, odor, consistency and taste. Approximately 15g of each sample was placed in a 50ml disposable container which was coded with three-digit numbers, sealed and kept in a thermal box to maintain the samples' temperature (approx. 10°C). The acceptability index (AI) was calculated according to the equation $AI (\%) = Y \times 100/Z$, where Y = the average score obtained for the product, and Z = the maximum score given to the product. It was considered that for a product to be sensory accepted, the AI must be equal to or greater than 70%¹⁹.

Meltdown test

Meltdown properties evaluation was based on Innocente et al²⁰. Samples of 100 g were placed on a wire screen fitted in a funnel that drained into a graduated cylinder. The sample was allowed to melt in a controlled temperature room at $22 \pm 0.5^\circ\text{C}$. The melted volume was determined at 5-minute intervals and plotted as a function of time.

Statistical analysis

One-way analysis of variance (one-way Anova) was conducted using Statistica Software. A significance level of 5% was adopted for all comparisons. Tukey's test was used to determine the significant difference between different treatments.

RESULTS AND DISCUSSION

Composition

Table 1 shows the results for formulations F1 and F2 of passion fruit ice cream made with goat milk. The composition of the ice cream samples statistically differed ($p < 0.05$) for soluble and total solids, fat and total reducing sugars. The pH values were lower when compared to Davidson et al²¹ and Akalin and Erişir²², who respectively found pH ranging from 5.60 and 5.47 for fermented probiotic ice cream. It is important to emphasize that the use of powdered milk can act as a product standardization factor to minimize the expected variations in milk composition due to the breed, diet, lactation stage, health and physiology of the animal.

The main role of the fat substitute is to efficiently replace the hydrogenated vegetable fat. Nevertheless, usually

it has high solid, carbohydrate and protein contents²³, a fact which explains the higher solids, total reducing sugar and protein content observed for the F2 formulation.

Table 1. Physicochemical and sensory results of goat milk ice cream samples

Physicochemical analysis	F1	F2		
pH	4.423 ± 0.010 ^a	4.654 ± 0.03 ^a		
Acidity, % lactic acid	0.840 ± 0.061 ^a	0.872 ± 0.02 ^a		
Soluble solids, °Brix	33.282 ± 0.252 ^a	39.520 ± 0.612 ^b		
Total solids, %	33.340 ± 0.012 ^a	36.243 ± 0.06 ^b		
Protein, %	2.664 ± 0.130 ^a	3.024 ± 0.32 ^a		
Fat, %	5.331 ± 0.570 ^b	2.331 ± 0.570 ^a		
Ash, %	0.722 ± 0.021 ^a	0.761 ± 0.032 ^a		
Total reducing sugars (g/100g)	10.752 ± 0.563 ^a	14.042 ± 0.95 ^b		
Sensory analysis	F1	F2	F1	F2
	Average score		Acceptance Index (AI),%	
Appearance	6.960 ± 1.162 ^a	7.044 ± 1.082 ^a	77.310	78.243
Odor	6.381 ± 1.55 ^a	7.631 ± 1.202 ^b	70.832	84.722
Consistency	7.172 ± 1.230 ^a	6.832 ± 1.34 ^a	79.630	75.931
Taste	5.583 ± 1.932 ^a	6.883 ± 2.25 ^b	62.041	76.390

The values are mean ± standard deviation

^{a,b}Values in the same line followed by different superscripts are significantly different ($p < 0.05$)

Sensory analyses

Sensory quality is most closely linked to the choice of food products. This evaluation technique can be applied from designing a new food product to the standardization and evaluation of the reference of product quality. When it comes to sensory analyses, ice cream has its own particularities like the ideal temperature of degustation ranging from 10 until 12°C and a maximum of six samples for capture and absorption of sensory interactions by judges. In addition to that, during consumption it undergoes phase changes from solid to liquid²⁴. All these facts make ice cream a complex food system to be sensory evaluated.

The values of the sensory analysis are displayed in **Table 1**. Similarly to what was observed for the physical chemical results, the experimental groups showed marked sensory differences and the average odor and flavor scores were statistically higher ($p < 0.05$) for F2 formulation.

The ice cream made with fat substitute (F2) had acceptance indices (AI) greater than 75% for all attributes considered and it also stood out for its proper creaminess and taste. This can be explained by its higher solids, protein and total reducing sugar content, which could influence the flavor and general impression of the product, with a significant effect on the product's firmness¹⁴.

It is known that a great deal of flavour compounds is at least partially soluble in fat. Changes in the amount and the type of fat in food may affect the perceived intensity and duration of flavours²⁴. Despite that, the sensory scores obtained by F2 formulation suggest that the lower fat content of the samples haven't produced a negative effect on the tested sensory attributes.

Meltdown test

During the melting of ice cream, two events occur: the melting of ice and the collapse of the stabilized foamy structure. Initially the exterior ice melts and diffuses into the viscous unfrozen serum phase, flowing downwards through the elements – destabilized fat globules, air cells and ice crystals - that form the ice cream structure. The meltdown test evaluates the dripping through the screen on which the ice cream rests, giving some insight about how this frozen structure is organized.

For both groups, after ten minutes the melting curve was practically linear. The formulation markedly influenced the melting speed, a parameter obtained from the slope of the linear regression curves corresponding to the melting curves. The equations for the melting of goat milk ice cream with hydrogenated vegetable fat (F1) ($y = 2.179x - 12.994$; $r^2 = 0.9602$) and goat milk ice cream with fat substitute (F2) ($y = 2.789x - 8.055$; $r^2 = 0.9779$) (**Figure 1**) show that formulation F2 displayed faster melting than F1, in view of the higher value of the curve slope. This may be a consequence of the weakening of the structural network, caused by the lower amount of fat in the formulation. Fat contributes to the melting resistance of ice cream, maintenance of the three-dimensional ice cream network, also contributing to the structure maintenance²⁵. The results may infer that the fat replacer created a different ice cream structure giving it a smoother and softer texture.

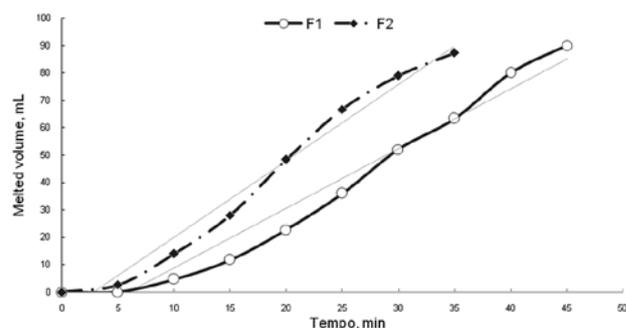


Figure 1. Melting over time of formulations F1(o) and F2(♦) of caprine ice cream

Previously, it was observed that caprine ice cream exhibits a faster melting speed and smoother texture when compared to ice cream made with bovine milk¹⁷. It is known that the fat globules of goat milk have smaller diameters²⁶, which can influence the behavior of ice cream during melting²⁷. According to Koxholt et al²⁸, fat globules larger than a critical diameter are retained in the foam lamellae, which help to stabilize the foam structure, while smaller fat globules, like those found in caprine milk, flow out of the foam structure. If there are too many of these smaller globules and agglomerates, ice cream is less stable and melts faster.

Parameters such as fat destabilization, ice crystal size and consistency coefficient index affect the melting rate of bovine ice cream²⁹. These specific structural relationships still have to be worked out for caprine ice cream.

CONCLUSION

Caprine ice cream samples made with different fat sources were tested. The composition of ice cream made with hydrogenated fat (F1) and fat replacer (F2) were different for soluble and total solids, fat and reducing sugars ($p < 0.05$). Formulation F2 had higher acceptance indexes and average sensory scores. Besides that, it was observed that the meltdown behavior of the samples was influenced by the type of fat used in the formulation. Results show that ice cream made with fat replacer melted faster when compared with samples formulated with the traditional hydrogenated fat.

Although bovine ice cream manufacture and structural elements have been widely studied, little has been shown for caprine ice cream. Here we investigate important particular attributes for the ice cream made with goat milk, besides showing that the replacement of hydrogenated vegetable fat by trans-free products is a technological alternative for the developments of caprine ice cream.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the CAPRILAT, Duas Rodas Company for the donation of supplies, PROMOCAPRI/SEBRAE and CNPq for the research support.

REFERENCES

1. Ribeiro A, Ribeiro S. Technology transfer to goat producers in Brazil – The Capritec experience. *Trop Subtrop Agroecosyst*. 2009; 11 (1): 161-4.
2. Haenlein G. Goat milk in human nutrition. *Small Rumin Res*. 2004; 51(2): 155-63.
3. Haenlein G. Past, present and future perspectives of small ruminant dairy research. *J Dairy Sci*. 2001; 84(9): 2097-115.
4. Park, YW. Hypoallergenic and therapeutic significance of goat milk. *Small Rumin Res*. 1994; 14(2): 151-9.
5. Ribeiro A, Ribeiro S. Specialty products made from goat milk. *Small Rumin Res*. 2010; 89(2-3): 225-33.
6. Knights M, Garcia G. The status and characteristics of the goat (*Capra hircus*) and its potential role as a significant milk producer in the tropics: a review. *Small Rumin Res*. 1997; 26(3): 203-15.
7. Park YW. Rheological characteristics of goat and sheep milk. *Small Rumin Res*. 2007; 68(1-2): 73-87.
8. Pandya A, Ghodje K. Goat and sheep milk products other than cheeses and yoghurt. *Small Rumin Res*. 2007; 68(1-2): 193-206.
9. Correia R, Pedrini M, Magalhães M. Sorvete: aspectos tecnológicos e estruturais. *Hig Alim*. 2007; 21(148): 19-23.
10. Goff HD. Colloidal aspects of ice cream: a review. *Int Dairy J*. 1997; 7(6-7):363-73.
11. Bolliger S, Kornbrust B, Goff HD, Tharp BW, Windhab EJ. Influence of emulsifiers on ice cream produced by conventional freezing and low-temperature extrusion processing. *Int Dairy J*. 2000a; 10(7): 497-504.
12. Bolliger S, Goff HD, Tharp BW. Correlation between colloidal properties of ice cream mix and ice cream. *Int Dairy J*. 2000b; 10(4): 303-9.
13. Marshall RT, Arbuckle WS. *Ice Cream*. 5th ed. New York: International Thomson Publishing; 2000.
14. Aime DB, Arntfield SD, Malcomson LJ, Ryland D. Textural analysis of fat reduced vanilla ice cream products. *Food Res Int*. 2001; 34(2-3): 237-46.
15. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo, Brasil). *Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. 4ª ed. Brasília, (DF): Anvisa; 2005.
16. Pereira D, Silva P, Costa Jr. Luiz, Oliveira L. *Físico-química do leite e derivados: métodos analíticos*. 2ª ed. Juiz de Fora (MG): EPAMIG; 2001.
17. Correia R, Magalhães M, Pedrini M, Cruz A, Clementino I. Sorvetes elaborados com leite caprino e bovino: composição química e propriedades de derretimento. *Rev. Ciênc Agron*. 2008; 39(2): 251-6.
18. O'Dell W, Watrous G. Comparison of acid and non acid volumetric methods for determining percentage of milk fat in homogenized milk and in ice cream. *J Dairy Sci*. 1966; 49(9): 1158-62.
19. Teixeira E; Meinert E; Barbeta P. *Análise sensorial de alimentos*. Florianópolis (SC): Ed. UFSC; 1987.
20. Innocente N, Comparin D, Corradini C. Proteose-peptone whey fraction as emulsifier in ice-cream preparation. *Int. Dairy J*. 2002; 12(1): 69-74.
21. Davidson RH, Duncan SE, Hackney CR, Eigel WN, Boling JW. Probiotic cultures survival and implications in fermented frozen yogurt characteristics. *J Dairy Sci*. 2000; 83(4): 666-73.
22. Akalin AS, Erişir D. Effects of inulin and oligofructose on the rheological characteristics and probiotic culture survival in low-fat probiotic ice cream. *J. Food Sci*. 2008; 73(1): 184-8.
23. Rechsteiner MS. *Desenvolvimento de amidos fosfatados de batata doce e mandioca e aplicação como substitutos de gordura em sorvetes [tese de doutorado]*. Botucatu(SP): Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 2009.
24. Frost M, Heymann H, Bredie W, Dijksterhuis G, Martens M. Sensory measurement of dynamic flavour intensity in ice cream with different fat levels and flavourings. *Food Qual Prefer*. 2005; 16(4): 305-14.
25. Sofjan RP, Hartel RW. Effects of overrun on structural and physical characteristics of ice cream. *Int Dairy J*. 2004; 14(3): 255-62.
26. Guo MR, Park YW, Dixon PH, Gilmore JA, Kindstedt PS. Relationship between the yield of cheese (Chevre) and chemical composition of goat milk. *Small Rumin Res*. 2004; 52(1-2): 103-7.
27. Trgo C. Factors affecting texture of ice cream. In: McKenna, B editor. *Texture in food – semi-solid foods*. Boca Raton, FL: CRC Press; 2003. pp. 388-403.
28. Koxholt M, Eisenmann B, Hinrichs J. Effect of fat globule size on the meltdown of ice cream. *J Dairy Sci*. 2001; 84(1): 31-7.
29. Muse M, Hartel R. Ice cream structure elements that affect melting rate and hardness. *J Dairy Sci*. 2004; 87(1): 1-10.

Queijo Prato com teor reduzido de gordura adicionado de enzima proteolítica: características físicas e sensoriais

Reduced fat Prato cheese added of proteolytic enzyme: physical and sensorial characteristics

RIALA6/1299

Grazielle Aparecida Chiuchi GARCIA¹, Ana Lúcia Barretto PENNA^{1*}

¹Laboratório de Leite e Derivados, Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Rua Cristóvão Colombo, 2265. 15054-000 São José do Rio Preto – SP, Brasil

Tel. (17) 3221-2266. E-mail: grazielegarcia@yahoo.com.br; analucia@ibilce.unesp.br*

Recebido: 26.04.2010 – Aceito para publicação: 23.08.2010

RESUMO

O queijo Prato, segundo queijo mais consumido no Brasil, obtido por coagulação enzimática do leite e maturado por pelo menos 25 dias, é classificado como gordo e de média umidade. Devido à preocupação com a saúde, os consumidores de queijos têm procurado produtos em suas versões com menor teor de gordura. Contudo, a gordura confere as características sensoriais desejáveis, como sabor, cremosidade, maciez e textura aos queijos. Alterações têm sido introduzidas no processo tecnológico de fabricação dos queijos com teor reduzido de gordura, com o intuito de efetuar melhoria nesses produtos; e o uso de enzimas proteolíticas é uma importante estratégia a ser considerada. A capacidade de derretimento, cor e avaliação sensorial são fundamentais indicadores da qualidade dos produtos obtidos. O presente trabalho analisou as características físicas e sensoriais de queijo Prato com teor reduzido de gordura adicionada enzima proteolítica fastuosaina, extraída do fruto verde do gravatá. A adição da fastuosaina não interferiu na capacidade de derretimento, tampouco promoveu o desenvolvimento de amargor, que é característica comum não apreciada em queijos com teor reduzido de gordura.

Palavras-chave. queijo Prato, enzima proteolítica, capacidade de derretimento, cor, avaliação sensorial, modelo Etana.

ABSTRACT

The Prato cheese is the second most consumed cheese in Brazil. It is produced by milk enzymatic coagulation, and matured for at least 25 days; it is classified as fatty cheese and of medium moisture. Due to the concern to health, the cheeses consumers have been seeking for products with low fat contents; however fat is essential for providing desirable sensory and physiologic characteristics, such as flavor, softness and texture to cheeses. Alterations on the technological processing of low fat cheeses have been made seeking for improved products, and the use of proteolytic enzymes has been a significant strategy. The meltability, color and sensory characteristics are fundamental quality indicators of the final products. This study reports the findings from the analyses on the physical and sensory characteristics of low fat Prato cheese with addition of proteolytic enzyme – fastuosain, that is extracted from unripe gravata fruit. The addition of fastuosain improved the quality of the product, as this additive neither affected the meltability, nor produced bitterness, which is a common unpleasant taste in low fat cheeses.

Key words. Prato cheese, proteolytic enzyme, meltability, color, sensory evaluation, Etana model.

INTRODUÇÃO

O queijo Prato é classificado como gordo, contendo de 45 a 59,9% de matéria gorda no extrato seco, e de média umidade, entre 36 e 46%. É fabricado por meio de coagulação enzimática do leite e deve ser maturado por 25 dias^{1,2}. O queijo Prato apresenta uma produção anual de 133.000 t., sendo o segundo queijo mais consumido no Brasil³.

A gordura participa de múltiplas funções nos queijos, sendo um importante ingrediente para os aspectos sensoriais e fisiológicos dos alimentos, contribuindo para o sabor, cremosidade, aparência, aroma, odor, sensação de saciedade após as refeições, além de outros atributos sensoriais como maciez, suculência, sendo determinante na textura dos alimentos⁴. Assim, a redução do teor de gordura nos queijos, sem alteração no processo tecnológico de fabricação, resulta em mudanças que comprometem a textura, o aroma e o sabor. Dentre as alterações no processamento visando melhoria destes produtos, podem ser citadas: mudanças de temperatura e tempo de cozimento, seleção de culturas lácticas ou adição de culturas adjuntas, pré-concentração do leite por ultrafiltração, adição de substitutos de gordura ou de enzimas proteolíticas⁵. Estas modificações são necessárias, pois a aceitabilidade dos queijos com reduzido teor de gordura pelos consumidores está diretamente relacionada aos atributos de aparência, sabor, aroma e textura, originados pela combinação de fatores microbiológicos, bioquímicos e dos parâmetros tecnológicos.

A capacidade de derretimento, a cor e a avaliação sensorial de queijos são importantes indicadores de sua qualidade. As propriedades de derretimento são controladas pela composição do queijo no momento do aquecimento, sendo os teores de proteína, gordura, umidade, sal, cálcio, hidrólise proteica e extensão da hidratação da proteína, parâmetros importantes, influenciados pela variedade do queijo, pelas condições de processamento e pelo grau de maturação⁶. O aumento na capacidade de derretimento durante o armazenamento pode ser relacionado mais à hidrólise secundária da proteína do que à hidrólise inicial. Estudos com queijo Cheddar não encontraram relação entre a quebra da fração α_{s1} -caseína e o derretimento, mas relacionaram o aumento no derretimento com a degradação da β -caseína⁷. Dave et al⁸ sugeriram que a capacidade de derretimento é influenciada pela hidrólise contínua das frações α_{s1} e β -caseína em pequenos peptídeos e não da hidrólise inicial das proteínas intactas.

Além da capacidade de derretimento, a cor do queijo também está relacionada ao teor de gordura e à degradação proteica que ocorre durante a maturação. Mudanças na coloração dos queijos, devido às variações sazonais, podem ser corrigidas pela adição de corantes durante o processamento. O corante natural extraído da semente de urucum, uma árvore denominada *Bixa orellana*, é responsável pela coloração amarela característica do queijo Prato⁹. As mudanças nos parâmetros de cor são utilizadas para avaliar o processo de maturação de queijos em função do tempo. De acordo com a escala CIELAB, o valor de L, em uma escala de 0 (preto) a 100 (branco) mede a luminosidade. Um aumento positivo ou negativo no valor de a^* corresponde a um aumento na proporção das cores verde (-100) e vermelha (+100). O valor b^* representa a variação de azul (-100) a amarelo (+100)¹⁰. Alguns estudos foram realizados analisando-se as variações nos parâmetros de cor de queijos, observando, em geral, decréscimo do valor de L e aumento dos valores de a^* e b^* durante o processo de maturação^{5,11,12}.

Queijos maturados com baixo teor de gordura apresentam sabor e aroma atípicos, que são associados com a redução nos níveis de ácidos graxos, como os ácidos hexanoico e butanoico, e de metil cetona. Os peptídeos amargos são formados pela ação de várias proteases na caseína. Quando estes peptídeos se acumulam em altas concentrações, devido à produção excessiva ou degradação inadequada por peptidases microbianas, ocorre o amargor em queijos, característica que também pode ser resultante de alguns aminoácidos, amidas, cetonas de cadeias longas e alguns monoglicérides. O desenvolvimento de amargor é um defeito comum em queijos com baixo teor de gordura, devido ao baixo conteúdo de sal e alta umidade. Compostos hidrofóbicos produzidos por proteólise são perceptíveis com a maior intensidade de amargor nestes queijos, uma vez que estes compostos são adsorvidos pela gordura¹³.

Os ácidos graxos de cadeias curtas são liberados por meio da atividade lipolítica e contribuem para o sabor e aroma dos queijos. A gordura contribui na liberação destes compostos, porém, quando o conteúdo de gordura é diminuído, estes ácidos graxos estão presentes em menor quantidade e o queijo apresenta falta de sabor e aroma. Frequentemente, em queijos com teor reduzido de gordura, o pH diminui com o passar do tempo e este decréscimo resulta em um forte sabor, que tende a ser cada vez mais intenso. O sabor de ranço, em queijos com teor reduzido de gordura fabricados em baixa temperatura de cozimento, pode ser resultado da alta

umidade e de uma baixa proporção de sal/umidade. Esta proporção é um indicador do verdadeiro conteúdo de sal na fase úmida do queijo, que, sendo baixa, pode resultar na proliferação de bactérias não pertencentes à cultura láctica (NSLAB – *non starter lactic acid bacteria*), aceleração de reações enzimáticas e alterações no metabolismo de bactérias da cultura¹⁴.

Vários estudos propuseram modificações no processo de fabricação de queijo Prato com teor reduzido de gordura, tais como adição de cultura adjunta, uso de enzimas proteolíticas e pré-concentração do leite por ultrafiltração. Também foi verificado o efeito destas modificações nas características sensoriais dos queijos^{5,15}. A análise sensorial é uma medida multidimensional que permite identificar a presença ou ausência de diferenças perceptíveis, identificar e quantificar as características sensoriais importantes, de forma rápida, além de identificar problemas particulares que não poderiam ser detectados por outros procedimentos analíticos.

Em estudos com queijo Prato com redução de 50% no teor de gordura, Katsuda et al¹⁶ observaram que, após 45 dias de maturação, o queijo Prato com baixo teor de gordura não apresentou diferenças significativas em relação ao aroma, coesividade, adesividade e mastigabilidade. Apresentou-se com melhor aparência, mais firme e elástico do que o queijo controle.

Enzimas proteolíticas adicionadas a queijos com teor reduzido de gordura atuam nas proteínas presentes, principalmente na a e b-caseínas, contribuindo para melhorar a textura, aroma, sabor e aspecto dos queijos, além de acelerarem o processo de maturação. É comum o uso de enzimas em queijos processados industrialmente, visando a modificação do sabor e aroma^{5,17}.

Frente à importância econômica e nutricional dos produtos lácteos, particularmente do queijo Prato, e a preocupação com a saúde, tornam-se necessários estudos para desenvolver tecnologias de fabricação de queijo Prato com teor reduzido de gordura. Todavia, é importante a garantia da qualidade e segurança do produto, além do desenvolvimento de um produto competitivo, inovador e saudável. Considerando que são poucos os trabalhos disponíveis na literatura sobre o uso de enzimas para melhoria das características funcionais do queijo Prato, estudos neste sentido podem contribuir para o setor de tecnologia de produtos lácteos. Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar as características físicas e sensoriais de queijo Prato com teor reduzido de gordura adicionado de enzima proteolítica fastuosáina.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção da enzima e determinação da atividade enzimática

A enzima fastuosáina foi obtida e caracterizada por Cabral¹⁸. Para determinação da atividade enzimática, 50 mg de enzima foram dissolvidos em 1,5 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0. Duas alíquotas de 50 µL de solução foram coletadas e denominadas: tubo teste e um tubo branco, às quais foram adicionados 20 µL de cloridrato de cisteína 0,005 M, seguido de incubação a 37°C por 5 minutos. Posteriormente, foram adicionados 50 µL de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0 e 800 µL de caseína 1% preparada na solução tampão citada. À amostra denominada tubo branco, adicionou-se também ácido tricloroacético 10%, visando interrupção da reação enzimática, sendo ambas as amostras submetidas à incubação a 37°C por 20 minutos. Após este período, foram adicionados 200 µL de ácido tricloroacético 10% às amostras e os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 9.300 x g em uma microcentrífuga 5414D (Eppendorf, Hamburg, Alemanha). O sobrenadante foi submetido à leitura da absorbância em 280 nm (Abs_{280}), em cubetas de quartzo, utilizando-se um espectrofotômetro de duplo feixe Cary Scan 100. A unidade de atividade (U) foi adotada, segundo Baeza et al, em que 1U corresponde ao aumento de Abs_{280} causado por 1 µmol Tirosina/min, nas condições do ensaio^{19,20,21}.

Caracterização do leite pasteurizado

Para a caracterização do leite pasteurizado tipo A utilizado na fabricação dos queijos controle e modificados foram feitas análises físico-químicas, em triplicata. A densidade foi determinada por meio do termolactodensímetro de Quevenne, com escala entre 1,015 a 1,040 g/cm³, corrigida para 15°C em função da temperatura²². O teor de gordura foi determinado pelo método de Gerber²². O teor de extrato seco total (EST) foi determinado de forma indireta, utilizando os valores encontrados para os teores de gordura e densidade, por meio do disco de Ackermann²². A acidez titulável foi determinada por titulação com NaOH 0,1 N e solução de fenolftaleína como indicador, sendo expressa em porcentagem de ácido láctico²².

Preparo e análise dos queijos

Foram realizados 4 processamentos de queijo Prato com teor reduzido de gordura, sendo um

controle (A - sem adição de enzima proteolítica) e três pelo método modificado, com a adição da enzima fastuosáina apresentando atividade total de: B: 607.500 U., C: 1.395.000 U. e D: 1.822.500 U., obtida, purificada e caracterizada por Cabral¹⁸.

Os queijos Prato foram elaborados a partir de 25 litros de leite pasteurizado padronizado, aquecido a 32°C e adicionado de 12,5 mL de cloreto de cálcio 50%, 2,5 mL de corante extraído de urucum, 3 g de ácido sórbico, 20 mL de cultura mesofílica composta por *Lactococcus lactis ssp. lactis* e *Lactococcus lactis ssp. cremoris* (LL 50A), correspondente a 10¹⁶ UFC/mL e 1,25 mL de coagulante Chy-Max (Chr. Hansen). A coagulação foi realizada a 32°C por aproximadamente 40 minutos. Após isso, fez-se o corte da massa, seguido da 1ª dessoragem (retirada de 30% do soro) e aquecimento até 38°C. O tempo de tratamento da massa foi de aproximadamente 60 minutos, após o momento do corte. Para os queijos modificados (B, C e D), foi feita a drenagem de 60% da quantidade inicial de soro e adição da enzima fastuosáina. O tratamento enzimático do coágulo foi efetuado a 42°C por 20 minutos. Em seguida, foi feita a drenagem total do soro, enformagem da massa, prensagem por 30 minutos, inversão e prensagem até o dia seguinte. Realizou-se então a salga, em salmoura com densidade entre 18 e 20°Baumé, durante 5 horas. Os queijos foram retirados da salga e após secagem, por 24 horas, foram embalados a vácuo e estocados em câmara para maturação a 12°C e 80% de umidade relativa.

Determinação da composição centesimal dos queijos Prato

Foram determinados: o teor de extrato seco total por secagem em estufa a vácuo a 70°C/24h²³, o teor gordura pelo método de Gerber – Van Gulik²², o teor de nitrogênio total (NT) pelo método de Kjeldahl, sendo que o teor de proteína total foi calculado multiplicando-se o valor do nitrogênio total por 6,38²⁴, o teor de cinzas por incineração em mufla a 550°C/24h²², atividade de água²⁵, o teor de sal²⁶, os índices de extensão e profundidade da maturação²⁷, a acidez²² e o teor dos aminoácidos tirosina e triptofano²⁸.

Capacidade de derretimento

A capacidade de derretimento (CD) foi determinada após 1, 15, 30, 45 e 60 dias de maturação, em triplicata, pelo método modificado de Schreiber, conforme descrito por Kosikowski e Mistry²⁹, consistindo em retirar da peça de queijo um cilindro de 36 mm de diâmetro. Com o auxílio de um fatiador, foram cortados discos de 5 mm de espessura. As

fatias foram colocadas em placas de Petri divididas em 8 áreas iguais por meio de diâmetros. Foram medidos 8 diâmetros iniciais (Di) da amostra, e as placas foram transferidas para a estufa a 107°C, por 7 minutos, e a 130°C, por 10 minutos³⁰. Posteriormente, as placas foram deixadas, por 30 minutos, à temperatura ambiente, e os diâmetros finais (Df) de cada amostra foram medidos. A capacidade de derretimento foi calculada por meio da seguinte equação:

$$CD (\%) = \frac{(Df^2 - Di^2) \times 100}{Di^2} \quad (1)$$

Parâmetros de cor

As mudanças nos parâmetros de cor (L, a* e b* da escala CIELAB) foram obtidas para luz padrão D65 e observação a 10°, em triplicata, aos 30 e 60 dias de maturação, utilizando-se um espectrofotômetro portátil Hunter Lab Mini Scan XE Plus (Hunter Associates Laboratories, Reston, EUA), calibrado com padrões branco e preto, sendo a cor das amostras mensurada por reflectância³¹.

Avaliação sensorial

Seleção do painel de provadores e aplicação do teste

A seleção dos provadores e a aplicação do teste sensorial foram aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da UNESP (Protocolo CONEP n° 0003.0.229.000-05). Para a seleção do painel de provadores, foi utilizado um método de avaliação da sensibilidade de possíveis provadores por meio da detecção do gosto amargo em amostras de queijo tipo Prato³². Amostras comerciais de queijo Prato foram cortadas em cubos com 1,25 cm de aresta. Uma parte das amostras (controle) foi imersa em solução aquosa a 5°C/12 horas e outra parte foi imersa em solução de cafeína 0,00038% a 5°C/12 horas, visando adquirir amargor. Todas as amostras foram posteriormente submetidas à secagem a 5°C/24 horas e armazenadas em recipientes fechados até o momento de aplicação dos testes. Os possíveis provadores foram escolhidos ao acaso, entre alunos, docentes e funcionários da UNESP, que realizaram quatro sessões com 3 testes de diferença (teste triangular) cada uma. Os provadores receberam uma bandeja contendo as amostras de queijos codificadas com três dígitos, apresentadas de forma monádica em pratos descartáveis brancos, água e uma ficha de avaliação com instruções para que o provador assinalasse o código referente à amostra diferente. A ordem de apresentação das amostras foi aleatória e os provadores

foram selecionados conforme o número de acertos nos testes de diferença.

Treinamentos dos provadores e avaliação sensorial dos queijos Prato controle e modificados

Os provadores selecionados, aqueles que apresentaram o número de respostas corretas correspondentes a uma significância de 0,05% no teste triangular, foram submetidos a um treinamento baseado em dois guias: *A guide to the sensory evaluation of texture of hard and semi-hard cheeses* e *Guide to smell, aroma and taste evaluation of hard and semi-hard cheeses*³³. No treinamento, os provadores receberam amostras de diferentes tipos de queijos (Gorgonzola, Provolone, Prato e Requeijão cremoso), de diferentes marcas comerciais e aprenderam a identificar e quantificar as características sensoriais que seriam analisadas nos queijos Prato controle e modificados.

A avaliação sensorial foi realizada nas amostras de queijo tipo Prato, controle e modificados, após 30 e 60 dias de maturação. Foram avaliadas as características de odor, aroma, doce, ácido, salgado, amargo, adstringente, picante, elasticidade, firmeza, friabilidade, adesividade, solubilidade e umidade, pelos provadores treinados, utilizando-se o modelo Etana³⁴. As avaliações sensoriais foram realizadas nos períodos da manhã (entre 9 e 11 horas) e tarde (entre 15 e 17 horas) em cabines individuais, com iluminação artificial. Os provadores receberam uma bandeja contendo a amostra, água e uma ficha de avaliação. Os termos empregados na avaliação sensorial foram descritos por Silva et al¹⁵.

Análise estatística

Para a homogeneidade das variâncias dos resultados experimentais, realizou-se o teste de Levene. De acordo com os resultados obtidos, foram aplicados o teste de Mann-Whitney, para análises estatísticas referentes aos queijos de um mesmo processamento e diferentes parâmetros e dias de maturação, e o teste de Kruskal-Wallis, para as análises referentes aos queijos de diferentes processamentos em relação ao mesmo parâmetro, considerando-se o mesmo dia de maturação. As análises estatísticas foram realizadas, considerando-se um nível de significância de 0,05, utilizando-se o programa computacional Minitab 15.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização do leite pasteurizado utilizado para a fabricação dos queijos controle e modificados.

Após realização da análise do teor de gordura dos leites pasteurizados integral e desnatados, tipo A, foi realizada a padronização do teor de gordura. Após a padronização, observou-se que os valores de densidade das amostras de leite padronizado utilizadas nos diferentes processamentos dos queijos Prato variaram de 1,032 g/mL, para os queijos A, B e D, a 1,033 g/mL, para o queijo C, enquanto os valores de extrato seco total foram iguais a 9,96%, 9,90 %, 10,15% e 10,11% para os queijos A, B, C e D, respectivamente.

Embora tenha sido realizada a padronização do teor de gordura do leite, houve uma pequena variação entre os processamentos de 1,3% de gordura, para os queijos B e C, a 1,5%, para os queijos A e D. Estes valores foram menores que os encontrados por Katsuda et al¹⁶, que foi de 1,7% de gordura para o leite utilizado na fabricação de queijo Prato com teor reduzido de gordura. De acordo com Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado³⁵, os leites utilizados em todos os processamentos foram classificados como semidesnatados, por apresentarem conteúdo de gordura entre 0,6 e 2,9%.

Os valores de acidez das amostras de leite padronizado analisadas, expressos em % ácido láctico, variaram de 0,16 para os queijos A, B e D a 0,17 para o queijo C, estando de acordo com a legislação, que estabelece o intervalo de variação de 0,14 e 0,18% de ácido láctico³⁵. A acidez do leite deve-se a presença de caseína, fosfatos, albumina, dióxido de carbono e citratos. A transformação da lactose por enzimas microbianas, com formação de ácido láctico, pode elevar a acidez do leite, indicando alta atividade microbiana e tornando o produto impróprio ao consumo.

Composição centesimal, índices de maturação, acidez e teores de aminoácidos dos queijos

A composição centesimal dos queijos está apresentada na Tabela 1 e os índices de maturação, acidez e teores de aminoácidos, na Tabela 2. Todos os queijos atenderam os requisitos físico-químicos estabelecidos na legislação brasileira, que classifica o queijo Prato como de média umidade (36 a 46%), devendo apresentar, portanto, o conteúdo de extrato seco total variando de 54 a 64%². De acordo com a legislação o queijo Prato tradicional deve apresentar de 45,0 a 59,9% de matéria gorda no extrato seco². Os valores encontrados nas amostras dos queijos analisados (29,4 a 34,1%) foram menores que os encontrados por Katsuda et al¹⁶, que obtiveram 36,21%, e semelhantes aos encontrados por Silva et al³⁶, que variaram de 30,10 a 32,13%. Os teores de gordura no extrato seco (GES), encontrados nos diferentes processamentos, permitiram que estes fossem

classificados, de acordo à legislação, como semigordos, que inclui queijos com matéria gorda no extrato seco, entre 25,0 e 44,9%¹. O teor de proteína total variou de 28,00 a 30,48%. A redução do conteúdo de gordura resulta em um aumento significativo no conteúdo de proteína. Os valores de proteína total foram maiores que os encontrados por Silva et al³⁶, que variaram de 24,39 a 26,33%, e por Katsuda et al¹⁶, de 27,85%, provavelmente devido à diferença nos teores de umidade dos queijos comparados. As amostras de queijo do processamento D foram as que apresentaram os maiores conteúdos de cinzas (4,74 %), o que pode ser justificado pelo elevado teor de extrato seco total. Estes valores são próximos ao relatado por Katsuda et al¹⁶, que obtiveram 4,65% e por Silva et al³⁶, que observaram variação de 4,01 a 4,39% para queijo Prato “light” comercial. Entretanto, os valores obtidos diferiram dos encontrados para queijo Prato “light” produzido em planta piloto, cuja variação no teor de cinzas foi de 5,07 a 5,20%³⁶.

Os valores de atividade de água (0,96 a 0,98) obtidos foram semelhantes aos encontrados por Silva et al³⁶, que variaram de 0,97 a 0,98. A disponibilidade de água em um alimento regula e limita a atividade biológica de micro-organismos e de reações químicas e enzimáticas, sendo importante durante a maturação. Segundo Van Dender et al²⁵, uma diminuição do ponto de congelamento do extrato aquoso dos queijos reflete em uma redução da atividade de água.

O teor médio de sal em queijos situa-se entre 1,6 e 1,9%, sendo assim, os valores encontrados (0,47 a 1,06 %) nas amostras analisadas foram menores. Queijos com baixos teores de gordura apresentam maiores teores de umidade, comparados aos tradicionais, e conseqüentemente, baixa proporção sal/umidade. Por outro lado, queijos com menor teor de umidade apresentam menor teor de sal, devido ao retardamento no processo de salga, necessitando permanecer por mais tempo na salga. Altos teores de sal podem inibir o crescimento de micro-organismos e baixos teores favorecem a proteólise e o desenvolvimento de acidez.

Os índices de extensão da maturação (IEM) e de profundidade da maturação (IPM) apresentaram diferenças estatisticamente significativa entre os processamentos (P<0,05) em todos os períodos de maturação. Os menores IEM foram encontrados nas amostras dos queijos do processamento A, em que não houve adição de enzimas, e os maiores IEM nas amostras do queijo do processamento B, com adição de enzimas com menor atividade enzimática. O IEM obtido na amostra de queijo do processamento A, aos 60 dias de maturação, foi observado nas amostras dos queijos dos processamentos B e C, aos 45 dias, mostrando

Tabela 1. Composição centesimal dos queijos Prato com teor reduzido de gordura. Valor P referente ao teste Kruskal-Wallis

Parâmetro	Processamento	X ± S	Md	CV	Valor P
EST (%)	A	54,31 ± 0,15	54,24	0,28	0,024
	B	57,20 ± 0,84	56,86	1,46	
	C	54,47 ± 0,83	54,66	1,52	
	D	56,34 ± 0,03	56,35	0,06	
GES (%)	A	34,1 ± 0,1	34,1	0,28	0,022
	B	29,9 ± 0,1	28,9	1,45	
	C	29,4 ± 0,5	29,3	1,53	
	D	32,8 ± 0,0	32,8	0,06	
Proteína total (%)	A	28,00 ± 0,01	28,00	0,03	0,044
	B	29,72 ± 0,44	29,57	1,47	
	C	30,14 ± 0,44	30,17	1,46	
	D	30,48 ± 0,36	30,68	1,17	
Cinzas (%)	A	4,56 ± 0,05	4,54	1,16	0,016
	B	4,38 ± 0,02	4,37	0,38	
	C	4,14 ± 0,02	4,13	0,54	
	D	4,74 ± 0,02	4,74	0,36	
Atividade de água	A	0,96 ± 0,00	0,96	0,01	0,013
	B	0,98 ± 0,00	0,98	0,00	
	C	0,98 ± 0,00	0,98	0,00	
	D	0,96 ± 0,00	0,96	0,01	
Sal (%)	A	1,06 ± 0,06	1,04	5,75	0,015
	B	0,54 ± 0,02	0,55	3,74	
	C	0,47 ± 0,03	0,49	7,16	
	D	0,89 ± 0,02	0,90	2,69	

EST: extrato seco total; GES: gordura no extrato seco. Processamentos (A): sem adição de enzima; (B): adição de fastuosaina com atividade total de 607.500 U; (C): adição de fastuosaina com atividade total de 1.395.000 U; (D): adição de fastuosaina com atividade total de 1.822.500 U. X ± S: média ± desvio padrão amostral; Md: mediana; CV: coeficiente de variação

que a adição da enzima proteolítica reduziu o tempo de maturação em 15 dias. Aos 60 dias, o maior índice de profundidade da maturação (IPM) foi obtido na amostra de queijo do processamento A (controle) e o menor na amostra do processamento D.

O teor de acidez apresentou diferença estatisticamente significativa entre os processamentos (P<0,05) em todos os períodos de maturação, sendo que os maiores teores de acidez foram observados aos 60 dias de maturação. O aumento da acidez está relacionado à glicólise, na qual a lactose é convertida em ácido lático pelas bactérias do fermento, sendo responsável pela produção

de sabor e aroma do queijo. O comportamento crescente nos teores de acidez dos queijos B, C e D são semelhantes aos descritos por Silva et al³⁶, que encontraram variação de 0,62 a 0,81% para queijo Prato “light” comercial, aos 30 e 48 dias de maturação, respectivamente, embora os teores de acidez observados neste experimento sejam superiores.

Os teores dos aminoácidos tirosina e triptofano apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) entre os processamentos durante os períodos de maturação avaliados. Os maiores teores de tirosina foram obtidos nas amostras dos queijos dos processamentos em que houve adição de enzima proteolítica, semelhante ao encontrado por Silva³⁷, em que o uso da enzima Neutrase[®] em queijo Prato promoveu maiores degradações na proteína com aumento dos teores de tirosina. A variação nos teores do aminoácido tirosina durante o período de maturação nas amostras de queijo ocorreu devido às reações de desaminação, transaminação e descarboxilação, em que os aminoácidos livres são hidrolisados e posteriormente resultam em aminas, aldeídos, álcoois e compostos sulfidrílicos, os quais apresentam propriedades flavorizantes responsáveis pelo desenvolvimento de

sabor de origem proteolítica⁹. Os maiores teores de triptofano foram obtidos nas amostras do processamento B, provavelmente pela autólise enzimática ocorrida nos demais queijos em que foi adicionada a fastuosaina. Neste processamento, utilizou-se a enzima com menor atividade enzimática, mostrando que esta sofreu menor autólise que as dos demais queijos, permanecendo ativa até o final do período de maturação e proporcionando maior liberação de triptofano, aminoácido obtido a partir de degradação proteica. A partir do 15º dia de maturação, o teor de triptofano foi inversamente proporcional à atividade enzimática. No 60º dia, a amostra de queijo do processamento D, em que se utilizou a enzima com maior atividade enzimática inicial, apresentou menor poder de degradação proteica que a do queijo A, em que não se utilizou enzima, resultando em um menor teor de triptofano. Os resultados são semelhantes aos obtidos por Silva³⁷, que mostrou que os maiores teores de triptofano foram obtidos nos processamentos em que se utilizou a enzima Neutrase[®] em queijo Prato e que estes teores também foram inversamente proporcionais à atividade enzimática.

Tabela 2. Evolução dos índices de extensão e profundidade da maturação, acidez e dos aminoácidos tirosina e triptofano, durante a maturação dos queijos Prato com teor reduzido de gordura

Parâmetro	Processamento	Dia de Maturação				
		1	15	30	45	60
IEM (%)	A	3,56 ± 0,10	7,59 ± 0,05	9,17 ± 0,29	11,99 ± 0,22	13,59 ± 0,18
	B	3,84 ± 0,06	10,20 ± 0,20	13,10 ± 0,25	15,26 ± 0,22	17,94 ± 0,12
	C	3,81 ± 0,10	7,96 ± 0,16	11,59 ± 0,12	14,05 ± 0,17	15,45 ± 0,48
	D	3,64 ± 0,07	7,74 ± 0,13	9,73 ± 0,21	12,81 ± 0,14	14,94 ± 0,29
IPM (%)	A	2,42 ± 0,14	5,11 ± 0,05	6,85 ± 0,10	9,15 ± 0,11	14,92 ± 0,18
	B	2,06 ± 0,01	6,27 ± 0,09	8,02 ± 0,04	10,13 ± 0,28	12,11 ± 0,17
	C	2,13 ± 0,02	5,64 ± 0,08	7,97 ± 0,08	9,69 ± 0,27	11,49 ± 0,44
	D	2,18 ± 0,09	4,99 ± 0,25	7,16 ± 0,38	9,26 ± 0,14	10,61 ± 0,22
Acidez (%)	A	0,60 ± 0,01	0,97 ± 0,01	1,17 ± 0,01	1,37 ± 0,01	0,88 ± 0,02
	B	0,58 ± 0,00	0,78 ± 0,00	0,89 ± 0,01	1,29 ± 0,11	1,47 ± 0,24
	C	0,49 ± 0,01	0,79 ± 0,01	1,05 ± 0,19	1,28 ± 0,01	1,76 ± 0,01
	D	0,77 ± 0,18	0,78 ± 0,00	0,96 ± 0,19	1,27 ± 0,00	1,33 ± 0,00
Tirosina (mg/100 g queijo)	A	226,60 ± 1,76	276,13 ± 1,37	260,81 ± 0,86	273,17 ± 0,61	349,99 ± 0,19
	B	238,34 ± 1,64	245,92 ± 0,69	313,51 ± 0,00	330,67 ± 0,00	357,02 ± 0,00
	C	261,35 ± 0,00	296,57 ± 0,00	300,86 ± 0,00	341,70 ± 0,00	396,78 ± 0,00
	D	228,07 ± 0,43	262,92 ± 0,00	264,23 ± 0,00	253,84 ± 0,32	274,35 ± 0,00
Triptofano (mg/100 g queijo)	A	34,83 ± 0,03	27,21 ± 0,36	64,56 ± 0,02	50,20 ± 0,18	72,53 ± 0,17
	B	57,39 ± 0,32	65,39 ± 0,18	82,71 ± 0,00	86,87 ± 0,00	105,36 ± 0,00
	C	46,11 ± 0,18	60,29 ± 0,00	70,75 ± 0,00	73,20 ± 0,00	71,89 ± 0,00
	D	49,92 ± 0,03	40,51 ± 0,31	67,38 ± 0,53	63,09 ± 0,47	65,96 ± 0,01

IEM: índice de extensão da maturação; IPM: índice de profundidade da maturação. Processamentos (A): sem adição de enzima; (B): adição de fastuosaina com atividade total de 607.500 U; (C): adição de fastuosaina com atividade total de 1.395.000 U; (D): adição de fastuosaina com atividade total de 1.822.500 U.

Capacidade de derretimento e cor

Observaram-se muitos valores de capacidade de derretimento negativos, mostrando que os queijos ao invés de derreter, encolheram, conforme observado na Tabela 3. Queijos com baixo teor de gordura desidratam rapidamente, criando uma camada seca que promove a queima do material e uma redução no seu derretimento. A capacidade de derretimento de queijos está relacionada ao rompimento da matriz proteica durante o aquecimento. Queijos com baixo teor de gordura apresentam grandes glóbulos de lipídeos espalhados separadamente em uma densa rede de caseína, o que não é suficiente para romper a matriz proteica ao aquecer. Não houve diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$) na capacidade de derretimento em diferentes temperaturas (107°C/7 min e 130°C/10 min) para queijos de um mesmo processamento, em um mesmo período de maturação. Porém, quando se compararam queijos de

diferentes processamentos (A, B, C e D), considerando-se os mesmos períodos de maturação e temperaturas de derretimento, o queijo correspondente ao processamento B, com baixo teor de gordura no extrato seco e alto teor de extrato seco total, apresentou maior capacidade de derretimento na condição 130°C/10 min., no 1º dia de maturação ($P = 0,026$). Em queijos com baixo teor de gordura há insuficiente difusão da gordura na superfície a 38°C, temperatura em que a gordura começa a tornar-se líquida. Em altas temperaturas, a superfície desidrata-se rapidamente, ocorrendo formação de bolhas, resultando em uma aparência atípica. Baixo teor de umidade e altos teores de sal são fatores que influenciam negativamente o derretimento de queijos com baixo teor de gordura. O nível ótimo de sal deve estar entre 1,5 e 1,7%; valores maiores ou menores afetam as propriedades de derretimento, conforme se observou no presente trabalho, cujos teores de sal variaram de 0,47 a 1,06%³⁸.

Tabela 3. Capacidade de derretimento das amostras dos queijos nos diferentes processamentos, em diferentes temperaturas

Processamento	Condições Analíticas	Dias				
		1	15	30	45	60
A	107°C/7min (%)	-30,28 ± 28,75	-13,66 ± 12,53	-16,27 ± 8,36	8,49 ± 36,90	0,00 ± 0,00
	130°C/10 min (%)	66,62 ± 32,03	-89,46 ± 26,70	0,25 ± 43,70	60,76 ± 57,86	-8,36 ± 14,48
B	107°C/7min (%)	-43,33 ± 101,25	-64,33 ± 3,06	-128,00 ± 61,00	-63,67 ± 62,07	-106,33 ± 37,53
	130°C/10 min (%)	275,00 ± 304,32	160,33 ± 173,78	240,00 ± 420,74	364,67 ± 280,52	-0,67 ± 68,00
C	107°C/7min (%)	-88,67 ± 37,58	-101,67 ± 91,39	0,67 ± 113,81	-66,33 ± 66,00	-42,67 ± 36,96
	130°C/10 min (%)	-64,33 ± 64,00	-18,33 ± 126,98	21,67 ± 97,33	0,67 ± 64,00	0,00 ± 110,89
D	107°C/7min (%)	-108,55 ± 27,93	-28,00 ± 17,89	-20,90 ± 60,15	-40,41 ± 16,12	-5,59 ± 4,85
	130°C/10 min (%)	-144,07 ± 27,83	-54,45 ± 52,35	-75,29 ± 47,98	-11,13 ± 41,86	8,35 ± 48,00

Processamentos (A): sem adição de enzima; (B): adição de fastuosáina com atividade total de 607.500 U.; (C): adição de fastuosáina com atividade total de 1.395.000 U.; (D): adição de fastuosáina com atividade total de 1.822.500 U

Houve diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) entre os parâmetros de cor dos diferentes processamentos, considerando-se os mesmos períodos de maturação (Tabela 4). Aos 30 dias de maturação, os valores de L mostraram a maior luminosidade na amostra de queijo do processamento A, em relação aos demais. Durante a maturação, os valores dos parâmetros L, a^* e b^* , para queijos de um mesmo processamento, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Buffa et al¹⁰ observaram

redução do valor de L, aumento do valor de b^* e não observaram uma tendência definida de aumento ou redução no valor de a^* durante a maturação de queijos fabricados com leite cru, pasteurizado ou tratado a alta pressão. Segundo Ginzinger et al³⁹, o índice de “amarelamento” dos queijos, correlacionado ao valor de b^* , aumenta com o tempo. Os resultados observados nas amostras não seguem a tendência descrita por estes autores. Este fato pode ser explicado pela provável distribuição não homogênea do

corante urucum ou da enzima fastuosáina nos queijos. Quando a gordura é retirada do queijo, o número de centros que permitem que a luz se espalhe diminui, fazendo com que queijos com baixo teor de gordura fiquem menos opacos. Esta mudança na opacidade destes queijos também pode ser relacionada ao grau de agregação interna da matriz proteica do queijo, sendo que quanto mais hidratada a matriz, menor o número de centros que permitem que a luz se espalhe.

Tabela 4. Caracterização dos parâmetros de cor das amostras dos queijos tradicionais e modificados aos 30 e 60 dias de maturação. Valor P referente ao teste Kruskal-Wallis

Parâmetro	Dia	Processamento	X ± S	Md	CV	Valor P
L	30	A	82,52 ± 0,88	82,42	1,07	0,027
		B	81,02 ± 0,82	81,44	1,01	
		C	79,64 ± 0,34	79,52	0,42	
		D	80,28 ± 0,41	80,40	0,51	
L	60	A	80,56 ± 0,09	80,55	0,11	0,029
		B	83,01 ± 0,54	83,12	0,65	
		C	80,37 ± 0,37	80,16	0,46	
		D	81,76 ± 0,99	81,33	1,21	
a*	30	A	11,30 ± 0,32	11,29	2,83	0,019
		B	8,56 ± 0,08	8,59	0,93	
		C	10,93 ± 0,06	10,91	0,57	
		D	9,99 ± 0,13	10,03	1,31	
a*	60	A	10,74 ± 0,01	10,74	0,09	0,024
		B	9,67 ± 0,17	9,74	1,72	
		C	11,70 ± 0,27	11,83	2,30	
		D	9,73 ± 0,45	9,97	4,63	
b*	30	A	38,52 ± 0,65	38,43	1,69	0,015
		B	32,58 ± 0,23	32,45	0,71	
		C	34,53 ± 0,15	34,46	0,42	
		D	33,37 ± 0,30	33,29	0,89	
b*	60	A	32,49 ± 0,39	32,49	1,19	0,019
		B	34,00 ± 0,52	34,23	1,54	
		C	35,25 ± 0,70	35,46	1,97	
		D	31,38 ± 1,31	32,00	4,17	

Processamentos (A): sem adição de enzima; (B): adição de fastuosáina com atividade total de 607.500 U.; (C): adição de fastuosáina com atividade total de 1.395.000 U.; (D): adição de fastuosáina com atividade total de 1.822.500 U. X ± S: média ± desvio padrão amostral; Md: mediana; CV: coeficiente de variação

Seleção do painel, treinamento dos provadores e avaliação sensorial

Foram avaliados 33 candidatos em 4 sessões, contendo 3 testes de diferença cada uma, totalizando 12 julgamentos totais. Para uma significância de 0,05%, seria necessário que cada candidato tivesse 8 julgamentos corretos para ser selecionado. Foram realizadas seis sessões nas quais foram selecionados 6 provadores.

As análises sensoriais dos queijos controle e modificados estão ilustradas por meio do modelo Etana na Figura 1. Considerando-se um mesmo parâmetro sensorial, houve diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) entre os queijos dos diferentes processamentos, nos mesmos períodos de maturação, apenas para os parâmetros firmeza (aos 30 dias de maturação), friabilidade e solubilidade (aos 60 dias de maturação). Katsuda et al¹⁶ observaram que queijos Prato, com teor normal e com baixo teor de gordura, não apresentaram diferença de aroma a partir do 15º dia de maturação. A maturação dos queijos envolve reações microbiológicas e químicas, em que as proteínas complexas do leite são degradadas em pequenos peptídeos e aminoácidos livres, e ésteres de ácidos graxos são convertidos em ácidos graxos livres. Esta mistura dos compostos resultantes da degradação proteica é responsável pelo sabor, aroma e textura do queijo⁴⁰.

O parâmetro ácido aumentou durante o período de maturação na amostra do queijo do processamento B, o que pode ser explicado pela conversão da lactose em ácido láctico, pela cultura láctica. O parâmetro elasticidade pode ser relacionado à proteólise, sendo que a amostra de queijo do processamento B foi a que apresentou maior extensão da proteólise durante todo o período de maturação e maior elasticidade aos 60 dias de maturação. Katsuda et al¹⁶ observaram diferença na elasticidade em queijo Prato a partir do 30º dia de maturação. A alteração da firmeza durante a maturação é resultante da proteólise que promove a degradação das proteínas, deixando os queijos menos firmes. Estas características foram observadas no queijo B, que apresentou aumento de odor (de 2,00 para 3,33), adesividade (de 1,83 para 3,00) e redução de firmeza (de 2,83 para 1,67), e no queijo D, que apresentou aumento de aroma (de 2,20 para 3,42) e redução de firmeza (de 4,10 para 3,00), considerando-se o período de maturação de 60 dias. A maior firmeza foi observada na amostra do queijo D (4,10), a qual, durante o período de maturação analisado, apresentou os maiores teores de extrato seco total e os menores índices de extensão da maturação. Aos 30 dias de maturação, os valores dos parâmetros sensoriais friabilidade, adesividade, solubilidade e umidade das amostras do queijo do processamento D foram relacionados ao teor de umidade da amostra, a qual apresentou o maior teor de extrato seco total (Tabela 2) na análise físico-química, neste período de maturação. A adesividade das amostras dos queijos A, C e D são semelhantes aos de Katsuda et al¹⁶, que não observaram diferença de adesividade no queijo Prato com baixo teor de gordura durante a maturação.

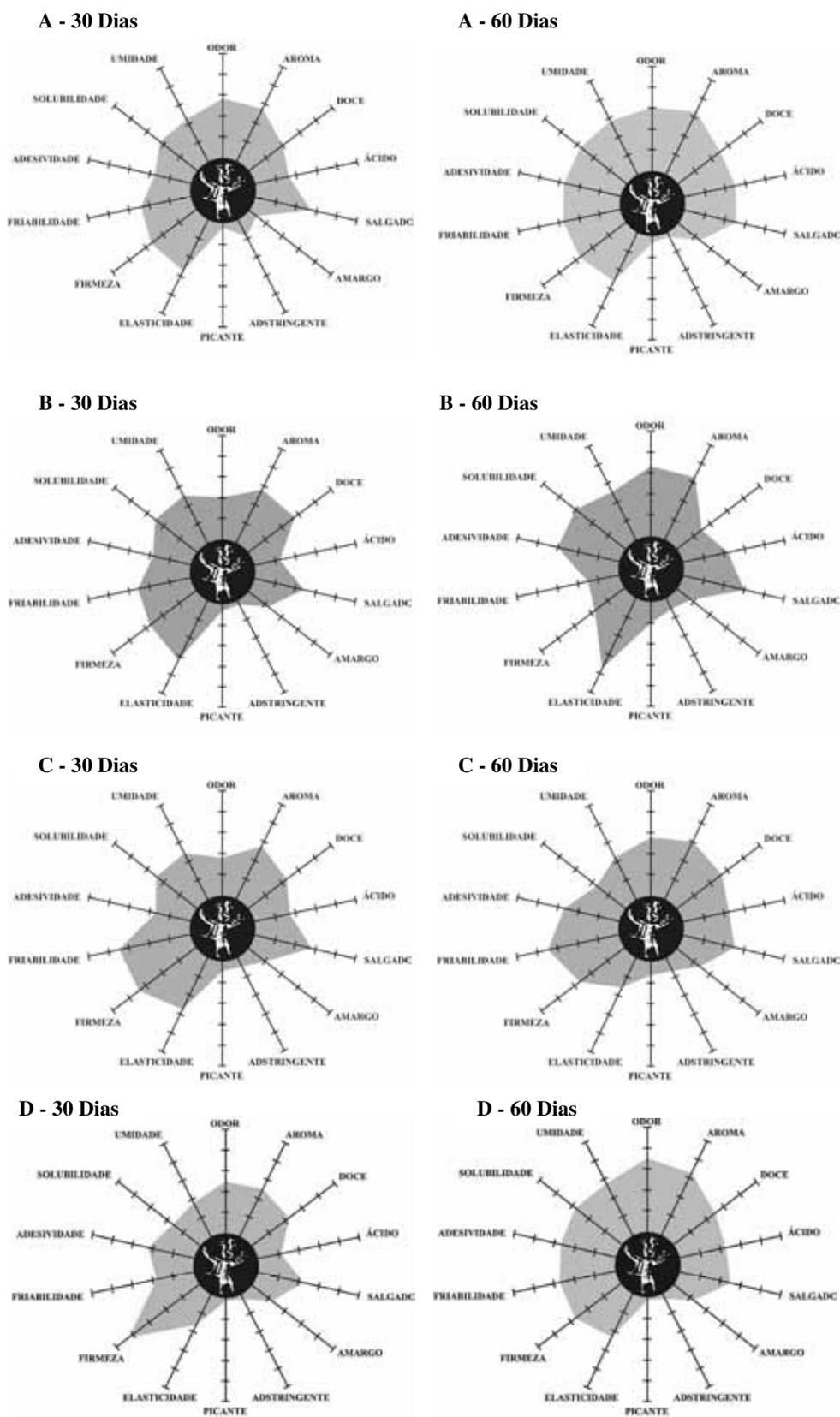


Figura 1. Avaliação sensorial, conforme o Modelo Etana, das amostras dos queijos A, B, C e D aos 30 e 60 dias de maturação

A formação de sabor em queijo é um processo complexo e resultante de um equilíbrio entre os compostos originários do metabolismo da lactose, lipídeos e proteínas. O amargor em queijos ocorre devido ao acúmulo de peptídeos amargos em altas concentrações, aminoácidos, amidas, cetonas de cadeias longas e alguns monoglicerídeos¹³. Este desenvolvimento de amargor é um defeito comum em queijos com baixo teor de gordura devido ao baixo conteúdo de sal e alta umidade. Segundo Silva³⁷, o uso de enzimas proteolíticas em queijos pode provocar desenvolvimento de gosto amargo. Porém, neste experimento não se observou diferenças estatisticamente significativas ($P>0,05$) entre as amostras de queijos controle e modificados em relação ao parâmetro amargor.

CONCLUSÃO

A adição da enzima *fastuosaina* com diferentes atividades enzimáticas não influenciou os parâmetros de cor dos queijos controle (sem adição da enzima) e modificados (com adição da enzima). Os queijos com teor reduzido de gordura adicionados de enzimas proteolíticas não apresentaram amargor, defeito comum em queijos. A amostra do queijo modificado B, com elevados índices de proteólise, apresentou menor firmeza que os queijos obtidos nos demais processamentos, evidenciando maior degradação proteica para as amostras submetidas a este processamento. Os resultados apontam o uso da enzima proteolítica *fastuosaina*, extraída do fruto verde do gravatá (*Bromelia fastuosa*) como uma interessante alternativa para melhoria da qualidade dos queijos Prato com teor reduzido de gordura.

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. Aprova o Regulamento técnico de identidade e qualidade de produtos lácteos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 07 mar. 1996. Seção 1, p. 3877.
2. Brasil. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria nº 358, de 04 de setembro de 1997. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade do queijo Prato. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 8 set. 1997. Seção 1, p.19690.
3. Associação Brasileira das Indústrias de Queijos. Queijos: mercado total brasileiro, 2008.
4. Pinheiro MVS, Penna ALB. Substitutos de gordura: tipos e aplicações em produtos lácteos. *Aliment Nutr*. 2004;15(2):175-86.
5. Garcia GAC. Efeito do uso de enzimas proteolíticas na maturação de queijo Prato com teor reduzido de gordura [dissertação de mestrado]. São José do Rio Preto (SP): Universidade Estadual Paulista; 2007.
6. Tunick MH, Mackey KL, Shieh JJ, Smith PW, Cooke P, Malin EL. Rheology and microstructure of low-fat mozzarella cheese. *Int Dairy J*. 1993;3(7):649-62.
7. Bogenrief DD, Olson NF. Hydrolysis of β -casein increases Cheddar cheese meltability. *Milchwissenschaft*. 1995;50(12):678-82.
8. Dave RI, McMahon DJ, Oberg CJ, Broadbent JR. Influence of coagulant level on proteolysis and functionality of mozzarella cheeses made using direct acidification. *J Dairy Sci*. 2003;86(1):114-26.
9. Perry KSP. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. *Quim Nova*. 2004;27(2):293-300.
10. Buffa MN, Trujillo AJ, Pavia M, Guamis B. Changes in textural, microstructural, and colour characteristics during ripening of cheese made from raw, pasteurized or high-pressure-treated goat's milk. *Int Dairy J*. 2001;11(11):927-34.
11. Bosset JO, Sieber R, Gallmann PU. Light transmittance: influence on the shelf life of milk and milk products. *Bull Int Dairy Federat*. 1995;300:19-39.
12. Rohm H, Jaros D. Colour of hard cheese 1. Description of colour properties and effect of maturation. *Zeitschrift fur Lebensmittel Untersuchung Forschung*. 1996;203(3):241-4.
13. McSweeney PLH. The flavour of milk and dairy products: III. Cheese: taste. *Int J Dairy Technol*. 1997;50(4):123-8.
14. Mistry VV. Low fat cheese technology. *Int Dairy J*. 2001;11(4):413-22.
15. Silva CRB, Nabuco AC, Moretti BR, Penna ALB. Efeito da adição de *Streptococcus thermophilus* como cultura adjunta na maturação e caracterização físico-química e sensorial de queijo Prato. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2006;65(3):199-203.
16. Katsuda MS, Miglioranza LHS, Ferreira SHP, Fonseca ICB. Caracterização química, sensorial e de textura, de queijo tipo Prato com teor reduzido de gordura. *Rev Inst Lat Cândido Tostes*. 1999;54(309):128-33.
17. Robinson RK, Wilbey RA. Fabricación de queso. 2ª ed. Zaragoza: Acribia, S.A.;1998.
18. Cabral H. Isolamento e caracterização de uma cisteino-peptidase de frutos de *Bromelia fastuosa* (gravatá) [dissertação de mestrado]. São José do Rio Preto (SP): Universidade Estadual Paulista; 2001.
19. Sarath G, De La Motte RS, Wagner FW. Protease assay methods. In: Beynon RJ, Bond JS Proteolytic enzymes a practical approach. New York: Oxford University Press;1996.p.25-55.
20. Baeza G, Correa D, Salas C. Proteolytic enzymes in *Carica candamarcensis*. *J Sci Food Agric*. 1990;51(1):1-9.
21. Garcia GAC, Moretti BR, Gomes RG, Casarotti SN, Penna ALB. Composição de macronutrientes e evolução da maturação de queijo Prato com teor reduzido de gordura adicionado de enzima proteolítica *fastuosaina*. *Braz J Food Technol*. 2009;VII BMCFB:69-77.
22. Case RA, Bradley Jr RL, Williams RR. Chemical and physical methods. In: American Public Health Association. Standard methods for the examination of dairy products. 15ª ed. Washington, 1985.p.327-404.

23. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo, Brasil). Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análises de alimentos. 3ª ed. São Paulo: Governo do Estado de São Paulo; 1985.
24. Cunniff, P. Official methods of analysis of AOAC International. 16ª ed. Gaithersburg: AOAC International; 1997. v. 2. p.1-75.
25. Van Dender AGF, Sevillano LA, Yotsuyanagi K, Jardim DCP. Determinação da atividade de água de queijos usando crioscopia eletrônica. *Rev Inst Lat Cândido Tostes*. 1995;50(3):18-26.
26. Serres L, Amariglio S, Petransxiene D. Contrôle de la qualité des produits laitiers. Ministère de l'Agriculture. Direction des Services Vétérinaires. Tome I. Analyse Physique et Chimique (Chimie VII – 6), 1973.
27. Wolfschoon-Pombo AF. Índices de proteólise em alguns queijos brasileiros. *Rev Bol Leite*. 1983;55(661):1-8.
28. Vakaleris DG, Price WV. A rapid spectrophotometric method for measuring cheese ripening. *J Dairy Sci*. 1959; 42(2):264-76.
29. Kosikowski FV, Mistry VV. Cheese and fermented milk foods. 3ª ed. Ann Arbor: Edwards Bros; 1997.
30. Nonogaki CO, Monteiro VS, Gigante ML. Metodologia para avaliar a capacidade de derretimento de queijo Prato. *Rev Inst Lat Cândido Tostes*. 2004;59(339):230-3.
31. Harte F, Luedecke L, Swanson B, Barbosa-Cánovas GV. Low fat set yogurt made from milk subjected to combinations of high hydrostatic pressure and thermal processing. *J Dairy Sci*. 2003;86(4):1074-82.
32. Augusto MMM, Queiroz MI, Viotto WH. Seleção e treinamento de julgadores para avaliação do gosto amargo em queijo Prato. *Cienc Tecnol Aliment*. 2005;25(4):849-52.
33. Lavanchy P, Bérodiér F, Zannoni M, Noël Y, Adamo C, Squella J, Herrero L. A guide to the sensory evaluation of texture of hard and semi-hard cheeses. Paris: INRA; 1994.
34. Giomo A. Tasting the cheese and sensory analysis. *Bulletin Int Dairy Federation*. 2001;369:30-3.
35. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Regulamento técnico de identidade e qualidade do leite pasteurizado. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 18 set. 2002. Seção 1, p.13.
36. Silva CRB, Moretti, BR, Nabuco A.C, Garcia GAC, Penna ALB. Maturação de queijo Prato: comparação entre o produto integral e o produzido com teor reduzido de gordura. *Rev Inst Lat Cândido Tostes*. 2005;60(345):235-8.
37. Silva AT. Maturação do queijo tipo Prato: Influência da Adição de enzimas proteolíticas no processo. [dissertação de mestrado]. Campinas (SP): Universidade de Campinas; 1998.
38. Van Hekken DL, Tunick MH, Malin EL, Holsinger VH. Rheology and melt characterization of low fat and full fat Mozzarella cheese made from microfluidized milk. *LWT*. 2007;40 (1):89-98.
39. Ginzinger W, Jaros D, Lavanchy P, Rohm H. Raw milk flora affects composition and quality of Bergkase – 3. Physical and sensory properties, and conclusions. *Lait*. 1999;79(4):411-21.
40. Vianna PCB, Mazal G, Santos MV, Bolini HMA, Gigante ML. Microbial and sensory changes throughout the ripening of prato cheese made from milk with different levels of somatic cells. *J Dairy Sci*. 2008;91:1743-50.

Características físico-químicas e sensoriais de marcas comerciais de queijo mozzarella de leite de búfala

Physical-chemical and sensorial characteristics of marketed buffalo mozzarella cheese

RIALA6/1300

Augusto Ludvik Filip MARINO¹, Maria Teresa Mendes Ribeiro BORGES², Caetano BRUGNARO³, Solange Guidolin CANNIATTI-BRAZZACA³, Marta Helena Fillet SPOTO³, Marta Regina VERRUMA-BERNARDI^{2*}

¹Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Bolsista IC/CNPq. Centro de Ciências Agrárias/UFSCar

^{2*}Endereço para correspondência: Centro de Ciências Agrárias/UFSCar. Via Anhanguera, Km 174 – C.P. 153, CEP 13600-970. Araras, SP, Brasil. e-mail: verruma@cca.ufscar.br

³Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/Universidade de São Paulo

Recebido: 26.11.2009 – Aceito para publicação: 03.08.2010

RESUMO

No presente estudo foram avaliados os parâmetros físico-químicos e sensoriais de oito marcas de queijo Mozzarella de búfala, analisando-se os teores de umidade, extrato seco total, lipídios, lipídios no extrato seco, proteínas, proteínas no extrato seco, cinzas, carboidratos, pH, digestibilidade *in vitro* de proteínas e β -caroteno. Realizou-se a análise instrumental da cor por meio de colorímetro Kônica Minolta CR 400. Sob o aspecto sensorial, foram feitos testes de ordenação de cor (branco claro – escuro), maciez (menos – mais), efetuados por 30 provadores, e preferência (gostei menos – gostei mais), realizado por 55 pessoas. As amostras de queijos analisadas apresentaram diferenças significativas nos parâmetros avaliados, com exceção da digestibilidade *in vitro*. Observou-se também a ausência de β -caroteno nas amostras de todas as marcas, o que indica que estão em conformidade com a legislação. Verificou-se que a variação na tonalidade branca não afetou a preferência, o que sugere que as marcas de produtos mais macios foram as mais aceitas e que as variações encontradas estejam provavelmente associadas à variação da composição química da matéria-prima, bem como à forma de processamento do produto.

Palavras-chave. Mozzarella de búfala, físico-química, colorímetro, sensorial, teste de ordenação, digestibilidade *in vitro*.

ABSTRACT

The sensorial and physical-chemical parameters of eight brands of buffalo mozzarella cheese were assessed analyzing humidity rate, total dry extract, lipids, lipids in dry extract, proteins, proteins in dry extract, ashes, carbohydrates, pH, *in vitro* digestibility of proteins and β -carotene. The instrumental color analysis was performed by using Konica Minolta colorimeter CR 400. Sensorial color ordination tests (light – dark), softness (less - more) and preference (liked less – liked more) were performed by 30 testers, and the preference test by 55 persons. The cheeses samples from different brands showed significant differences in the evaluated parameters, except for *in vitro* digestibility. It was also found a lack of β -carotene in all of product brands, being in agreement with the legislation in force. The range of white tonality did not affect the preference; therefore, it was inferred that the softest product brands were the best accepted and the softness variations were probably related to the chemical composition of raw material and also to the procedure for manufacturing the product.

Key words. Buffalo mozzarella, physical-chemical, colorimeter, sensorial, ordination test, *in vitro* digestibility.

INTRODUÇÃO

No Brasil, ocorre um aumento crescente na criação de búfalos, principalmente para a produção leiteira, em decorrência das características físico-químicas peculiares do seu leite. As características do leite de búfala permitem fácil identificação sob o ponto de vista físico-químico e sensorial. Seu valor é peculiar, ligeiramente adocicado e ele é mais branco do que o leite bovino, em virtude da ausência quase total de β -caroteno¹.

A maior parte do leite, iogurte e queijo consumidos no Brasil são provenientes do gado leiteiro bovino, no entanto, o leite bubalino apresenta vantagens em relação ao leite de outras espécies, com destaque para a qualidade nutricional. Pelo fato de possuir teores de proteínas, gorduras e minerais que superam consideravelmente os do leite da vaca, seu aproveitamento industrial é efetivamente extraordinário, chegando comparativamente a superar o rendimento do leite bovino em mais de 40%¹. Os níveis elevados de proteína e de gordura em relação ao leite de outras espécies permitem que seu uso seja uma alternativa economicamente mais favorável para a produção de queijos, concentrados do soro e outras variedades de produtos lácteos².

O leite bubalino apresenta características próprias permitindo a sua fácil identificação físico-química e sensorial, possui teores de proteínas, gorduras e minerais, que superam os do leite bovino. Entretanto, é no seu aproveitamento industrial sua grande importância, por proporcionar a obtenção de produtos lácteos de boa qualidade, podendo-se destacar: queijos, doce de leite, manteiga e iogurte³. A industrialização do leite de búfalas produz alimentos cuja remuneração é normalmente superior a de produtos do leite bovino como queijo Mozzarella e provolone, ricota, entre outros⁴.

O queijo Mozzarella é originário das províncias de Salerno e Castela (Itália). Conforme legislação brasileira, pode-se adotar as denominações: mozzarella, mozzarella ou muzzarella; sendo a grafia “Mozzarella” a mais empregada. Originalmente, a Mozzarella era fabricada a partir de leite de búfala. Hoje, dada a grande aplicação culinária, é fabricada a partir de leite de vaca. A Mozzarella é provavelmente o mais conhecido e popular entre os queijos do país europeu, sendo o queijo mais fabricado e consumido no Brasil. Este tipo de queijo apresenta características peculiares, como: massa filada, massa semi-cozida, não maturado, consistência firme, sabor suave e levemente ácido. O queijo encontra-se em vários formatos tais como nozinho, bola, palito⁵.

A Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos⁶ implantou o “Selo de Pureza” do queijo Mozzarella de leite de búfala, com o objetivo de garantir ao consumidor um produto puro, sem mistura, além de fomentar e proteger a bubalinocultura das fraudes cometidas pelas indústrias que substituem o leite de búfala pelo de vaca. Este trabalho tem como objetivo comparar marcas comerciais de queijo Mozzarella elaborado com leite de búfala, quanto às características físico-químicas e sensoriais.

MATERIAL E MÉTODOS

Os queijos foram adquiridos em hipermercados nas cidades de Araras, São Carlos e Ribeirão Preto, sendo todas as marcas oriundas do Estado de São Paulo. Para escolha das amostras, utilizou-se como critério as informações na rotulagem, tais como: designação do produto, razão social e endereço do fabricante, peso líquido, ingredientes, data de fabricação, período de validade, seguindo a recomendação descrita pela Resolução 12/33 de 1978 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos⁷, garantindo, desta maneira, a qualidade do produto, por se tratar de um projeto que envolve análise sensorial. Coletaram-se oito marcas, no período de 3 dias. O queijo coletado foi o de formato de bolas. Todas as amostras apresentavam data de fabricação e prazo de validade semelhantes. As amostras foram acondicionadas e armazenadas (6°C/10 dias) em geladeira até a realização das análises.

Análises físico-químicas

Os queijos foram analisados quanto aos teores de umidade, extrato seco total, lipídios, lipídios no extrato seco, proteínas, proteínas no extrato seco, cinzas, carboidratos, digestibilidade *in vitro* de proteínas e pH. As análises de composição foram realizadas de acordo com as recomendações das Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz⁸. Para o β -caroteno, seguiu-se as recomendações descritas por Rodrigues e Penteado⁹. A determinação da digestibilidade de proteínas foi feita segundo Akeson e Stahmann¹⁰. As análises foram realizadas em triplicata.

Análise sensorial

Teste de ordenação

As amostras foram apresentadas a 30 provadores não treinados, que realizaram o teste sensorial de ordenação, segundo a ABNT¹¹, de cor crescente (mais clara para mais escura), gosto (menos gostou a mais gostou) e

maciez (mais macia a menos macia). Os provadores foram devidamente instruídos a avaliar as amostras.

Avaliação de preferência

Cinquenta e cinco provadores não treinados foram convidados a participar deste estudo. Assim sendo, 20g de cada queijo foram colocados em pratos plásticos codificados com números de três dígitos e servidos aos provadores com idade entre 18 e 60 anos, acompanhados de água mineral à temperatura ambiente para lavar o palato entre uma amostra e outra. A ordem de apresentação das amostras foi balanceada e seguiu o delineamento de blocos completos, segundo MacFie et al¹². As amostras foram apresentadas monadicamente e utilizou-se uma escala hedônica de sete pontos, variando de “gostei muito” (nota 7) a “desgostei muito” (nota 1).

Para ambos os testes sensoriais foram utilizados aproximadamente 20 gramas de cada amostra, que foram apresentadas aos consumidores em pratos plásticos transparentes, codificadas com três dígitos, temperatura em torno de $\pm 7^{\circ}\text{C}$.

Avaliação da cor instrumental

Realizou-se a análise instrumental de cor através do colorímetro Kônica Minolta CR 400. Efetuou-se uma calibração branca, a fim de se obter um padrão, e então analisou-se os seguintes parâmetros: L = luminosidade (zero = preto e 100 = branco) a (-80 até zero = verde, do zero ao +100 = vermelho) b (-100 até zero = azul, do zero

ao + 70 = amarelo). Foram realizadas três repetições para cada uma das amostras.

Análise estatística

Para os dados de análises físico-químicas, de cor instrumental e de preferência (escala hedônica, de 1 a 7), fez-se análise de variância, aplicando-se o teste *F*. Em seguida, fez-se a comparação múltipla entre médias pelo teste de Tukey a 5% de significância.

A análise estatística dos dados obtidos nos testes de ordenação foi realizada pelo teste de Friedman, utilizando a tabela de Newell e MacFarlane para verificar se há ou não diferença significativa entre amostras. Se a diferença entre as somas das ordens for maior ou igual ao valor tabelado, conclui-se que existe diferença significativa entre as amostras ao nível de significância correspondente¹¹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas Tabelas 1 e 2 encontram-se os resultados obtidos nas análises físico-químicas das oito marcas do queijo Mozzarella de leite de búfala.

Para os teores de umidade, observou-se que houve uma variação entre 47,32 e 55,14%, ocorrendo diferença significativa entre as amostras ($p \leq 0,05$). De acordo com Brasil¹³, o teor de umidade deve ser no máximo 55g/100g de queijo Mozzarella em geral. Desta maneira, verificou-se que as amostras estão de acordo com a legislação.

Tabela 1. Resultados obtidos para a composição físico-química dos queijos Mozzarella elaborados com leite de búfala

Marcas	Umidade (%)		Ext. seco total (%)		Lipídios (%)		Lipídios ext. seco (%)		Proteínas (%)		Proteínas ext. seco (%)	
A	47,32	e	52,68	b	25,46	b	48,34	b	24,21	a	45,95	b
B	55,11	a	44,89	f	14,35	g	31,96	f	22,75	a	50,68	a
C	55,14	a	44,86	f	22,23	c	49,55	ab	16,97	c	37,83	c
D	53,50	bc	46,50	de	16,81	f	36,15	e	22,87	a	49,18	a
E	53,02	c	46,98	d	18,21	e	38,76	d	23,80	a	50,66	a
F	54,29	ab	45,71	ef	19,59	d	42,84	c	23,10	a	50,54	a
G	45,58	f	54,42	a	27,56	a	50,65	a	20,36	b	37,40	c
H	50,90	d	49,10	c	24,84	b	50,60	a	18,08	c	36,82	c

Médias com letras diferentes implica em diferença significativa ($p \leq 0,05$)

Tabela 2. Resultados obtidos para a composição físico-química dos queijos Mozarela elaborados com leite de búfala

Marcas	Cinzas (%)		Carboidratos (%)		pH		Digestibilidade <i>in vitro</i> de proteínas (%)	
A	1,82	g	1,19	cd	4,87	d	96,13	a
B	2,75	ab	5,04	a	5,10	c	94,88	a
C	2,15	e	3,51	b	5,23	bc	95,87	a
D	2,70	bc	4,12	ab	5,43	b	96,17	a
E	2,86	a	2,11	c	5,93	a	95,37	a
F	2,01	f	1,01	d	4,83	d	94,61	a
G	2,61	c	3,89	b	5,27	bc	95,69	a
H	2,44	d	3,73	b	5,37	b	95,15	a

Médias com letras diferentes implica em diferença significativa ($p \leq 0,05$)

A típica Mozarela de leite de búfala possui em torno de 57%¹⁴ de umidade, e a alta umidade garante propriedades sensoriais como alta maciez. Contudo, deve-se tomar cuidado, pois a mesma proporciona uma maior atividade de água, fator este que, associado à quantidade de nutrientes presentes no queijo, reduz a vida útil do produto, pois há um favorecimento da proliferação de microrganismos patogênicos de risco à saúde humana¹⁵.

Quanto aos teores de proteína, verificou-se também uma diferença significativa entre as amostras, com variação entre 18,08 e 24,21%. Porém, apenas as amostras C, G e H apresentaram diferenças significativas com maior intensidade das demais. Os valores encontrados apresentaram-se muito próximos dos valores obtidos por Verruma & Salgado¹⁶. Quanto aos valores de proteína no extrato seco, estes variaram de 36,82 até 50,68%. As amostras C, G e H apresentaram os menores valores, em torno de 37% ($p \geq 0,05$), seguindo-se a amostra A com 45,95% e o restante das marcas B, D, E e F que não diferem entre si e correspondem aos maiores valores. Estudos descritos por Verruma-Bernardi et al¹⁷ descrevem valores de 43,82% de proteína no extrato seco em Mozarela de leite de búfala.

Os valores de lipídios apresentaram grande variação entre as marcas (14,35% até 27,56%). Valores similares foram encontrados por Marchiori¹⁸, sendo estes 18,68% para queijo Mozarela de búfala. Notou-se que as amostras B e D apresentaram os menores valores de lipídios no extrato seco (31,96% e 36%, 15% respectivamente), enquanto todas as outras apresentam valores superiores a 38%, sendo 50,65% o maior valor para a amostra G. Em estudos realizados com Mozarela de leite de búfala, Marchiori¹⁸ obteve 38,92% e Verruma e Salgado¹⁶, 44,10%.

As variações nas concentrações de proteína e gordura remetem diretamente à composição do leite utilizado para fabricação do produto. Este, por sua vez, é influenciado pelo sistema de criação e alimentação dos animais¹⁹. Os teores de cinzas variaram entre 1,82 e 2,75%. Marchiori¹⁸ encontrou valores de 1,87%.

Os carboidratos também apresentaram diferença significativa, variando de 1,19 a 5,04%. O pH encontrado também apresentou variações de 4,9 a 5,9%.

A digestibilidade *in vitro* de todas as marcas apresentou-se alta e sem diferença significativa (valores divergindo entre 95,1 e 96,1%), mostrando-se muito satisfatórios para o consumo humano. Os valores obtidos foram superiores aos encontrados por Verruma et al²⁰, segundo os quais a digestibilidade do queijo Mozarela de leite búfala foi de 93,70%. Observou-se também a ausência de β -caroteno nas amostras de todas as marcas, o que indica que estão em conformidade com a legislação.

A Tabela 3 mostra os resultados obtidos para análise instrumental de cor dos queijos. O parâmetro L* indica a luminosidade e se refere à capacidade do objeto em refletir ou transmitir luz, variando numa escala de zero a 100. Pode-se observar, que os valores de L* variaram de 72,30, para a marca E, até 88,83, para marca C. Observou-se que todas as amostras apresentaram-se muito claras e com pequena diferença entre si, com exceção da amostra E, que se apresentou mais escura que as demais.

Tabela 3. Resultados obtidos para dos dados de cor instrumental de oito marcas de queijo Mozarela elaborados com leite de búfala

Marcas	Cor L		Cor a		Cor b	
A	86,90	ab	- 5,42	d	15,56	ab
B	85,08	abc	- 4,95	bc	11,90	c
C	88,83	a	- 4,83	bc	11,82	c
D	82,15	bc	- 5,23	cd	12,28	c
E	72,30	d	- 4,39	a	7,28	e
F	85,29	abc	- 4,73	ab	16,64	a
G	81,41	c	- 6,52	e	15,09	b
H	87,46	a	- 4,65	ab	10,41	d

Médias com letras diferentes implica em diferença significativa ($p \leq 0,05$)

Em relação aos valores do parâmetro a^* , que varia da cor verde (-) à vermelha (+), notou-se que todas amostras apresentaram-se dentro do espectro de coloração verde, onde os resultados variaram de -4,65, para a marca H, até -6,52, para a marca G. Notou-se que a marca G apresentou-se maior intensidade e diferiu-se das demais, seguida de A e D que não apresentam diferença significativa entre si, mas diferem do restante das marcas.

Quanto aos valores de b^* , que varia da cor azul (-) à cor amarela (+), os resultados variaram de 7,28 para a marca E, até 16,64, para a marca F. Todos os valores são positivos e, portanto, estão compreendidos na faixa do amarelo. Observou-se maior intensidade para a marca F, que difere de todas as demais, seguida de A e G, que não apresentam diferença significativa entre si. A menor intensidade se deu na marca E.

A marca E apresentou-se como a mais destoante na análise colorimétrica. Esta marca apresentou menor teor de gordura e maior teor de cinzas, fatores que possivelmente podem ter influenciado nos altos valores obtidos nos parâmetros L^* e b respectivamente. Contudo, estudos posteriores, relacionando cor e composição físico-química, são necessários para comprovar tal hipótese.

Na Tabela 4 está a soma das notas atribuídas aos queijos pelos 30 provadores que participaram do teste de ordenação. Observou-se que, para o atributo cor, as amostras A e G ($p \geq 0,05$) apresentaram maior somatório, seguidas das amostras F, E, B, C, e H ($p \geq 0,05$) e, por último, com coloração mais clara, a amostra D, sem diferença significativa para a amostra H.

Tabela 4. Resultados obtidos para análise sensorial de cor, maciez e gosto dos queijos Mozzarella de leite de búfala

Marcas	Cor	Maciez	Gosto
A	215	a	110 bcd 140 a
B	124	b	105 cd 125 ab
C	116	bc	183 a 139 a
D	57	c	155 abc 165 a
E	125	b	121 bcd 69 b
F	142	b	91 d 120 ab
G	207	a	147 abcd 161 a
H	94	bc	168 ab 161 a

Valores seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Friedman. Diferença mínima = 58

Quanto ao atributo maciez, o maior valor pertence à amostra C, seguida de H, G, D, E, A e B. Sendo F a amostra menos macia.

Para o atributo gosto, a maior somatória foi da amostra D, seguida de G, H, A, C, B, F. A amostra E apresentou menor valor com diferença significativa para as demais.

De acordo com os resultados obtidos no teste de preferência (Tabela 5), verificou-se que as notas para cor do queijo Mozzarella de leite de búfala variou de 5,64 (marca F) a 4,45 (marca G), ressaltando que os provadores utilizaram partes bem próximas da escala.

Tabela 5. Resultados obtidos para os resultados do teste de preferência de oito marcas de queijo Mozzarella

Marcas	Cor	Aroma	Sabor	Textura	Global
A	5,36 ab	4,78 a	3,02 c	3,85 c	3,60 c
B	5,16 abc	4,78 a	4,80 ab	4,60 abc	4,96 ab
C	4,67 bc	4,00 b	4,09 b	4,25 bc	4,20 bc
D	5,07 abc	4,55 ab	4,64 ab	4,98 ab	4,84 ab
E	5,13 abc	4,75 ab	5,09 a	5,40 a	5,16 a
F	5,64 a	4,91 a	4,58 ab	4,47 abc	4,69 ab
G	4,45 c	4,31 ab	4,09 b	4,80 abc	4,44 ab
H	5,13 abc	4,64 ab	5,11 a	5,15 ab	5,15 a

Médias com letras diferentes implica em diferença significativa ($p \leq 0,05$). Notas: 7=Gostei muito; 6=Gostei moderadamente; 5=Gostei ligeiramente; 4=Não gostei e nem desgostei; 3=Desgostei ligeiramente; 2=Desgostei moderadamente; 1=Desgostei muito

Para aroma, verificou-se que os provadores utilizaram praticamente a mesma parte da escala, variando de 4,00 a 4,91. Quanto ao sabor, nota-se uma diferença mais acentuada, com valores compreendidos entre 3,02 (marca A) e 5,11 (marca H).

Para os resultados da análise de sabor, o queijo Mozzarella de leite de búfala apresentou menor sabor característico, menor sabor residual de gordura e maior amargo residual. Estudos descritos por Rossi²¹ mostraram que o queijo Mozzarella de leite de búfala apresenta sabor peculiar com tendência para o sabor ligeiramente adocicado.

Bonassi et al²² realizaram um teste de aceitabilidade de queijo Mozzarella de leite de búfala e vaca quanto ao sabor, aroma, coloração e textura e verificaram que o queijo em estudo apresentou-se aceitável, sendo que o mesmo não

apresentou diferenças significativas na aceitabilidade, quanto ao sabor, aroma e textura, quando comparado ao queijo de leite de vaca. Porém, houve diferenças em relação à cor.

A análise de preferência pela textura mostrou uma variação de 3,85 (marca A) para 5,15 (marca H), mostrando uma diferença maior do que os critérios de cor e aroma.

Quanto à preferência global, variou-se de 3,60 até 5,15, verificando-se que provavelmente o parâmetro cor e aroma teve pequena influência na preferência global dos queijos. Já os parâmetros sabor e textura afetaram mais. Notou-se que as marcas E e H apresentam os maiores valores para sabor e, textura e na impressão global, foram cotados como as marcas de maior preferência.

CONCLUSÃO

- Os resultados indicaram que os queijos Mozzarella de leite de búfala de diferentes marcas apresentaram diferenças significativas nos parâmetros físico-químicos avaliados, com exceção da digestibilidade *in vitro*;

- Sugere-se que as marcas mais macias foram as mais aceitas e que as variações encontradas estão relacionadas provavelmente com a variação da composição química da matéria-prima, bem como a forma de processamento do produto.

AGRADECIMENTOS

CNPq pela Bolsa Iniciação Científica PIBIC/CNPq/UFSCar 2008-2009.

REFERÊNCIAS

1. Coelho KO, Machado PF, Coldebella A, Cassoli LD, Corassin CH. Determinação do perfil físico-químico de amostras de leite de búfalas por meio de analisadores automatizados. *Ciênc Animal Bras*. 2004;5(3):167-70.
2. FAO. Food of Agriculture Organization. O búfalo. Brasília (DF): Associação Brasileira dos Criadores de Búfalo; 1991.320p.
3. Benevides CM. Leite de búfala: qualidades tecnológicas. *Rev Hig Alim*. 1998; 54, [acesso 2010 Jul 07]. Disponível em: [http://www.bichoonline.com.br/artigos/ha0015.htm].
4. Jorge AM, Andrighetto C, Millen DD, Calixto M, Vargas ADF. Desempenho e eficiência biológica de bubalinos de três grupos genéticos terminados e confinamento e abatidos em diferentes estádios de maturidade. *R Bras Zootec*. 2006;35:252-7.
5. Robert NF. Dossiê técnico: Fabricação de queijos especiais a partir do leite de vaca. Rede de tecnologia do Rio de Janeiro - REDETEC. 2007, 39p.
6. Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos - ABCB. [acesso 2009 Jun 25]. Disponível em: [http://www.bufalo.com.br].
7. Brasil. Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos-CNNPA. Resolução RDC nº 12, de 24 de julho de 1978. Aprova as normas técnicas especiais, do estado de São Paulo, revistas pela CNNPA, relativas a alimentos (e bebidas), para efeito em todo o território brasileiro. Diário Oficial [da] União. Brasília, DF, 24 jul. 1978. Seção1.
8. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo – Brasil). Métodos químicos e físicos para análise de alimentos: normas analíticas do instituto Adolfo Lutz. 3ª ed. São Paulo: Governo do Estado de São Paulo; 1985.
9. Rodrigues RSM, Penteadó MVC. Carotenóides com atividade próvitamínica A em hortaliças folhosas. *Rev Bras Cienc Farm* 1989;25(1):39-52.
10. Akesson WR, Stahmann MA. A pepsin pancreatin digest index of protein quality evaluation. *J Nut*. 1964;83:257-61.
11. Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT (Rio de Janeiro – Brasil). Teste de ordenação em análise sensorial (NBR 13170). 1994; 7p.
12. MacFie HJH et al. Designs to balance the effect of order of presentation and first-order carry-over effects in hall tests. *J Sens Stud*. 1989;4:129-48.
13. Brasil. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria nº 366, de 04 de setembro de 1997. Aprova o Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de massa para elaborar queijo mozzarella (muzzarella ou mozzarella). [acesso 2009 Jun 25]. Disponível em: [http://www.agais.com/normas/leite/queijo_Mozzarella_massa.htm].
14. Castaldo MC. La búfala il tipico prodotto la mozzarella. *Rev Zootec*. 1960; 32(7/8): 203-9.
15. Pietrowski GAM, Ranthum M, Crozeta T, Jonge V. Avaliação da qualidade microbiológica de queijo tipo mussarela comercializado na cidade de Ponta Grossa, Paraná. *Rev Bras Tecn Agroind*. 2008;2(2):25-31.
16. Verruma MR, Salgado JM. Análise química do leite de búfala em comparação ao leite de vaca. *Sc Agric*. 1994;51(1):131-37.
17. Verruma-Bernardi MR, Damásio MH, Valle JLE, Oliveira AJ. Elaboração do queijo Mozzarella de leite de búfala pelos métodos tradicional e da acidificação direta. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2000; 20(2):138-44.
18. Marchiori JMG. Qualidade nutricional dos queijos mozzarella orgânico e convencional elaborados com leite de búfala e de vaca. [dissertação de mestrado]. Araraquara (SP): Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho;2006.
19. Oliveira RL, Bagaldo AR, Ladeira MM, Barbosa MAAF, Oliveira RL, Oliveira GJC. Desempenho produtivo e custos com alimentação de búfalas lactantes submetidas a dietas com diferentes fontes de lipídeo. *Rev Bras Zootec*. 2008;37(8):1503-8.
20. Verruma MR, Oliveira AJ, Salgado JM. Avaliação química e nutricional do queijo mozzarella e iogurte de leite de búfala. *Sci Agric*. 1993;50(3):438-43.
21. Rossi G. Manuale di tecnologia casearia. 1997.684p.
22. Bonassi IA, Carvalho JBC, Villares JB. Utilização do leite de búfala como matéria-prima para a elaboração do queijo Mozzarella. ALAN. 1982;32(4):903-12.

Estudo das características sensoriais e da composição química de queijo de coalho industrializado

Sensorial characteristics and chemical composition of manufactured *coalho* cheese

RIALA6/1301

Maria Eugênia de Oliveira MAMEDE^{1*}, Arão Cardoso VIANA², Adriana Lucia Costa SOUZA¹, Sayonara Andrade de Oliveira FARIAS¹, Pollyana Alves de ARAUJO¹

*Endereço para correspondência: Rua; Barão de Jeremoabo, s/n, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Ondina, Salvador/BA. CEP: 40170-115. E-mail: (mmamede@ufba.br)

¹Departamento de Análises Bromatológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia

²Departamento de Desenvolvimento Educacional, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano, Campus de Guanambi, Distrito de Ceraíma – Guanambi/BA. CEP. 46430-000

Recebido: 09.12.2009 – Aceito para publicação: 20.08.2010

RESUMO

O trabalho teve como objetivo avaliar as características de queijo de coalho industrializado utilizando a Análise Descritiva Quantitativa (ADQ), teste de aceitabilidade, intenção de compra e análises físico-químicas. O teste de aceitabilidade foi realizado por 50 consumidores. A amostra A foi analisada nos aspectos como: aroma típico de queijo de coalho e sabor típico de queijo de coalho; a amostra B foi caracterizada pela coloração amarela e qualidade de mastigação. Os atributos, como olhaduras, sabor de gordura e sabor ácido não foram relevantes na caracterização das amostras analisadas. A amostra C recebeu maior pontuação nos atributos como aroma de manteiga (5,4) e sabor salgado (4,6). A amostra A obteve a maior média de aceitabilidade para aparência (7,14) e sabor (7,02) e, conseqüentemente, a maior intenção de compra nos conceitos “certamente compraria” (40,0%) e “provavelmente compraria” (32,0%). As amostras apresentaram alto teor de umidade, variando de 51,98% (amostra A) – 53,25% (amostra C). A amostra A apresentou teor de cloreto de 1,37%, acidez de 0,91 (g% de ácido láctico) e pH 6,0. O teor de sal e a porcentagem de acidez encontrados na amostra A estão próximos aos valores desejáveis para queijo de coalho.

Palavras-chave. queijo de coalho, parâmetros físico-químicos, ADQ, aceitabilidade, intenção de compra.

ABSTRACT

This study evaluated the defining features of manufactured *coalho* cheese by Quantitative Descriptive Analysis (QDA), as acceptability test, purchasing intention and physical-chemical analyses. The acceptability test was carried out by 50 consumers. The sample A was assessed on the features as typical curd cheese aroma, typical curd cheese taste, while sample B was evaluated on its yellow color and chewiness. Characteristics as holes, fatty taste, and acid taste were not relevant for qualifying any of the samples. Sample C was highly scored on buttery aroma (5.4) and salty taste (4.6). Sample A received the highest acceptance score on appearance (7.14) and taste (7.02) features, and therefore it got the highest purchasing intention score, being “I would certainly buy” (40.0%) and “I would probably buy” (32.0%). The samples showed a high humidity varying from 51.98% (sample A) to 53.25% (sample C). Chloride contents in sample A was 1.37%, and acidity of 0.91 (g% of lactic acid) and pH 6.0. Presumably, the salt contents and the percentage of acid found in sample A are close to the desirable rates for *coalho* cheese.

Key words. *Coalho* cheese, physical-chemical parameters, QDA, acceptability, purchasing intention.

INTRODUÇÃO

O queijo Coalho é produzido há mais de 150 anos em vários estados da região nordeste do Brasil, e, muito antigamente, utilizava-se o coalho do estômago seco e salgado de animais silvestres ou bezerros para coagulação do leite. Atualmente, esta prática foi substituída pelo uso de coalho industrial¹. Com o desenvolvimento tecnológico de sua produção, surgiram em nível nacional muitas variedades, sendo algumas de expressão regional². Na região Nordeste, sabe-se da existência de numerosas unidades de produção caseira, sendo possível afirmar que a grande produção ainda é artesanal (71,57%)³. Geralmente, a produção artesanal utiliza leite cru, obtido sem os devidos cuidados de higiene, e a produção não adota as Boas Práticas de Fabricação. Consequentemente, não apresenta segurança microbiológica e padronização da qualidade⁴.

De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Queijo de Coalho⁵, entende-se por queijo de coalho o queijo que se obtém por coagulação do leite por meio do coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas e comercializadas normalmente com até dez dias de fabricação. Este produto deve apresentar características de queijos de média (36-45%) a alta umidade (46% a 55%), de massa semidura a macia e com teor de gordura nos sólidos totais entre 35% e 60%^{5,6}. Alguns autores avaliaram a qualidade físico-química de queijo de coalho, produzido de modo artesanal, comercializados nas cidades de Fortaleza (CE), Aracajú (SE), Feira de Santana (BA) e Campinas (SP), encontrando valores de umidade para estes queijos na faixa de 33,6% a 40,7%^{1,7,8,9,10}.

Há um grande número de métodos sensoriais de diferentes características e campos de aplicação, podendo ser classificados em discriminativos, descritivos e afetivos¹¹. O teste de aceitação (Teste Afetivo) avalia quanto os julgadores gostam ou desgostam de um produto. A Análise Descritiva Quantitativa (ADQ) é uma metodologia sofisticada e traz informações mais detalhadas da qualidade do produto. Por isso, se tornou a metodologia sensorial mais utilizada no controle de qualidade dentro da indústria de alimentos¹². A ADQ já foi aplicada para estudo das características de vários tipos de queijos^{13,14}. Andrade et al¹⁵ realizaram o estudo do levantamento da terminologia descritiva de queijo de coalho, produzido de forma artesanal, comercializada na cidade de Fortaleza (CE). Atributos, como cor amarela, olhaduras, aroma de manteiga, sabor típico de queijo de coalho, aroma típico de queijo de coalho, sabor salgado, sabor ácido e maciez foram levantados por 23 julgadores.

Não há dados estatísticos oficiais da produção industrial de queijo de coalho, pois sua grande produção ainda é artesanal. Nem tão pouco há informação da qualidade sensorial desse produto industrializado. Neste caso, o objetivo deste trabalho foi avaliar as características sensoriais e de composição química de três marcas de queijo de coalho industrial, comercializados em grandes supermercados da cidade de Salvador (BA).

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das Amostras

Foram coletadas três marcas de queijo coalho comercializadas em grandes supermercados na cidade de Salvador/BA. Todas as amostras possuíam a denominação do tipo de queijo e o selo do Serviço de Inspeção Federal – SIF. As amostras foram codificadas em A, B e C.

Preparo das Amostras

Até o momento de serem assadas, as amostras foram conservadas sob refrigeração a 4°C. No momento da avaliação sensorial, as amostras foram cortadas nas dimensões de aproximadamente 2 x 3 x 1,5 centímetros. Nestas dimensões, as amostras foram colocadas em uma grelha aquecida através de resistência elétrica por 3 minutos.

Análise Descritiva Quantitativa

Local: Os testes sensoriais foram realizados em laboratório de Análise Sensorial em cabines individuais, sob luz branca.

Análise Descritiva Quantitativa (ADQ): A aplicação da ADQ foi realizada segundo Stone e Sidel¹². Primeiramente, foi distribuído um questionário de recrutamento a alunos de graduação, pós-graduação e professores da Faculdade de Farmácia, através do qual foi levantada a disponibilidade de tempo em participar das análises e se consumiam queijo coalho com frequência. Um total de 35 julgadores (homens e mulheres, entre 18 e 50 anos da comunidade da Faculdade de Farmácia) respondeu o questionário. Destes trinta e cinco julgadores, 20 foram escolhidos com base na disponibilidade de tempo para realização das análises. Estes julgadores escolhidos anteriormente fizeram o teste de reconhecimento de gostos básicos. Neste teste, todos os julgadores foram capazes de reconhecer o gosto de pelo menos 6 soluções, das 9 apresentadas, o que representou 67% de acerto. As soluções apresentadas foram: sacarose (0,4% e 0,8%);

ácido cítrico “g.a.” (0,02%, 0,03% e 0,04%); cafeína “g.a.” (0,02%, 0,04%); sal de cozinha (0,08% e 0,15%).

Para avaliar a capacidade discriminatória de cada julgador, foi utilizado o teste triangular, segundo Stone e Sidel¹², e os resultados analisados segundo tabela específica a 5% de significância. Um total de treze julgadores foi selecionado para o levantamento dos termos descritores das amostras.

Os termos descritores foram levantados segundo o Método de Rede¹⁶. As amostras foram apresentadas aos julgadores em pares, nas combinações: AB, AC e BC, e foi solicitado que eles descrevessem as similaridades e diferenças entre cada par de amostras quanto à aparência, aroma, sabor e textura. O levantamento individual dos termos descritores foi discutido com todos os julgadores sob a supervisão de um líder da equipe. Em consenso geral da equipe, termos poucos citados e redundantes foram eliminados e, então, escolhidos os termos que melhor descrevessem as amostras. Em seguida, a equipe elaborou uma lista de definições e escolheu padrões de referência para cada termo descritor. A equipe, sob a supervisão de um líder, também confeccionou a ficha de avaliação quantitativa. Treinamentos com os padrões de referência foram realizados duas vezes e o poder de discriminação e repetibilidade avaliados através da Análise de Variância Univariada (ANOVA) de dois fatores (amostras e repetições), utilizando $p < 0,50$, para F das amostras e $p \geq 0,05$, para F de repetição (Damásio e Costell)¹⁷. Um julgador foi eliminado da equipe, pois não conseguiu discriminar nove dos treze atributos levantados (dados não demonstrados). Portanto, doze julgadores compuseram a equipe final da análise descritiva quantitativa. Todos os julgadores selecionados avaliaram as três amostras em 3 repetições, onde as amostras foram apresentadas na forma de blocos completos balanceados.

Teste de Aceitação

A aceitação foi avaliada com a participação de 50 consumidores (alunos de graduação e pós-graduação da Faculdade de Farmácia) de queijo de coalho. Para aplicação do teste foi utilizada escala hedônica estruturada de 9 pontos (abrangendo de “desgostei muitíssimo” (1) a “gostei muitíssimo” (9)) para os atributos aparência, aroma, sabor e textura. Para avaliar a intenção de compra foi adotada uma escala estruturada de cinco pontos, com extremos de “certamente não compraria” (1) a “certamente compraria” (5), descrita em Meilgard et al¹¹.

O trabalho foi avaliado pelo comitê de ética em pesquisa da Maternidade Climério de Oliveira/UFBA, de acordo com a Resolução nº196/96.

Analises Físico-químicas

O queijo foi cortado em pedaços pequenos, triturados, homogeneizados e mantidos sob refrigeração até o momento das análises. A gordura foi realizada segundo metodologia de Gerber, e o resultado expresso como gordura em base seca (%). Para determinação da umidade, foi utilizada estufa de circulação de ar contínua, a 105°C, por 6 horas. O teor de proteína foi determinado pelo método de Kjeldahl, convertendo-se o nitrogênio quantificado para proteína, pelo fator de conversão de 6,25. A determinação da acidez total foi realizada por titulação com solução padronizada de NaOH 0,1 N, e o resultado expresso em porcentagem de ácido láctico. O pH foi determinado utilizando um pHmetro (Marca: Quimis/Q-400 AS). O teor de sal foi calculado através da análise de cloretos e expresso em porcentagem. Todas as análises citadas acima foram realizadas de acordo com Instituto Adolfo Lutz¹⁸. O resíduo mineral fixo foi determinado segundo Cecchi¹⁹.

Análise dos Resultados

Os dados sensoriais foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey (5% de significância) e Análise de Componentes Principais (ACP). Os programas utilizados para confecção dos gráficos da ACP foram o SAS (2001) e o Minitab V15 (14.12.0).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise Descritiva Quantitativa

Os termos descritores levantados pela equipe de julgadores foram: cor amarela, olhaduras, homogeneidade, firmeza, aroma de manteiga, aroma típico de queijo de coalho, sabor salgado, sabor de gordura, sabor típico de queijo de coalho, sabor ácido, elasticidade, mastigabilidade e maciez.

A tabela 1 apresenta as médias de cada atributo avaliado pela equipe para cada amostra (A, B e C) e também as notas de julgador. As amostras A, B e C diferiram estatisticamente ao nível de 5% de significância, em relação aos atributos cor amarela, aroma típico de queijo de coalho e sabor típico de queijo de coalho. As amostras não diferiram estatisticamente (5% de significância) em relação aos atributos olhaduras, sabor de gordura e sabor ácido. A amostra C diferiu estatisticamente (5% de

significância) apenas da amostra A, em relação aos atributos homogeneidade e firmeza, mas, com relação ao aroma de manteiga e sabor salgado, a amostra C diferiu da amostra A e B. A amostra B apresentou a maior média (3,9) para a elasticidade, diferindo estatisticamente (5% de significância) das demais amostras. A elasticidade não é a característica de textura mais apreciada em queijo de coalho produzido de forma “artesanal”, mas as amostras industrializadas, estudadas neste trabalho, apresentaram esta característica.

O termo elasticidade é comum de ser percebido em queijo cheddar e mussarela¹⁴. O queijo de coalho deve apresentar característica mais firme com certo grau de dificuldade para mastigação¹⁵. A mastigabilidade foi definida como: número de mordidas necessárias para desintegrar o queijo; portanto, quanto maior a mastigabilidade maior a característica de “queijo borrachudo”. Das três amostras avaliadas, a amostra B apresentou a maior média (5,1), diferindo estatisticamente (5% de significância) apenas da amostra A (4,0).

Tabela 1. Médias das notas de cada provador e da equipe sensorial para cada atributo avaliado

Atributo	Amostra	Média da equipe	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12
Cor amarela	A	3,1c	3,4	2,4	2,9	3,2	3,2	1,3	6,3	2,5	2,1	3,1	3,5	3,4
	B	5,5a	4,1	5,0	5,8	7,5	4,5	3,3	8,2	6,4	4,6	4,6	6,3	6,3
	C	3,9b	3,8	4,2	3,7	3,4	4,4	2,3	7,1	2,2	3,6	2,9	3,4	5,4
Olhaduras	A	2,9a	4,3	1,2	1,6	5,4	2,2	2,5	0,4	4,8	2,7	0,6	3,6	4,6
	B	2,9a	4,3	1,7	2,8	6,5	1,4	2,8	0,5	3,3	2,6	0,8	2,3	6,0
	C	2,4a	4,3	1,0	1,6	1,5	1,8	1,4	0,5	4,0	1,9	0,8	5,2	4,6
Homogeneidade	A	4,6b	3,4	4,4	1,2	7,1	4,9	5,2	7,4	4,7	1,1	7,4	3,4	4,5
	B	4,7ab	3,2	5,0	2,3	7,6	4,3	5,0	7,6	4,4	1,6	7,5	3,7	4,5
	C	5,5a	4,0	6,0	2,6	7,1	5,5	5,4	8,4	4,5	3,8	7,7	6,4	4,5
Firmeza	A	4,1b	3,7	1,7	1,5	6,2	5,9	4,8	6,9	3,0	1,5	2,4	4,6	6,5
	B	4,8ab	3,3	7,1	4,0	7,8	4,2	5,4	4,1	1,8	1,7	6,7	4,1	7,0
	C	5,5a	6,0	3,9	4,3	2,9	6,4	5,8	8,6	6,4	4,3	3,3	8,0	5,7
Aroma de Manteiga	A	3,3b	4,2	2,6	2,6	4,6	4,1	4,4	2,5	5,0	0,9	3,0	3,5	1,9
	B	3,4b	3,1	2,5	1,7	3,6	5,6	4,5	3,5	4,1	0,7	3,5	4,2	3,2
	C	5,4a	3,9	6,4	4,7	5,4	5,3	5,4	7,1	6,2	1,3	5,3	6,4	6,6
Aroma típico de queijo coalho	A	5,9a	4,1	6,6	3,5	5,2	6,5	5,3	6,9	5,7	5,4	6,7	7,3	7,5
	B	3,2c	2,4	2,5	2,7	2,8	3,3	3,9	3,3	2,7	3,8	2,9	4,7	3,8
	C	4,6b	3,0	5,0	2,4	6,6	4,9	4,9	4,2	3,7	4,5	4,4	6,2	5,6
Sabor salgado	A	2,9b	3,9	0,2	1,5	5,4	2,5	3,7	3,5	3,1	1,3	4,1	3,2	2,0
	B	3,2b	2,5	2,7	0,9	5,7	2,8	3,7	2,2	3,7	2,2	3,7	3,9	3,8
	C	4,6a	5,2	0,9	3,2	4,8	4,9	5,2	8,0	6,2	2,4	2,9	5,3	6,9
Sabor de gordura	A	3,2a	5,3	1,7	3,6	4,5	2,7	4,6	1,8	3,1	1,8	3,5	0,9	4,7
	B	3,7a	5,2	0,6	3,7	7,0	4,5	3,9	5,5	4,4	2,0	1,1	2,1	4,5
	C	3,2a	3,8	1,5	1,0	4,1	3,7	4,8	2,1	5,4	1,8	1,4	1,5	7,3
Sabor ácido	A	3,1a	3,9	0,8	1,1	3,8	3,3	4,0	3,9	3,4	4,0	2,4	2,4	4,8
	B	2,3a	3,6	2,2	1,3	5,4	2,9	3,0	2,3	3,1	0,4	0,8	0,1	2,8
	C	2,8a	3,0	0,7	2,0	6,1	3,9	4,4	1,2	3,8	1,5	1,5	0,9	5,1
Sabor típico de queijo coalho	A	5,8a	3,6	5,5	5,4	7,2	5,4	5,7	5,5	6,3	4,8	6,5	6,3	8,0
	B	3,1c	2,3	3,4	3,0	2,5	1,9	6,0	2,2	3,1	2,7	2,4	4,3	3,4
	C	4,1b	2,5	4,3	3,3	5,1	4,0	5,0	3,6	4,7	3,9	3,2	4,3	5,3
Elasticidade	A	3,6ab	2,0	4,6	2,5	3,6	3,6	5,2	3,6	5,4	1,5	4,9	1,7	4,4
	B	3,9a	2,9	3,0	2,3	3,5	4,9	5,3	7,7	6,1	1,7	2,9	2,6	4,4
	C	3,1b	1,2	3,7	3,6	7,3	2,4	4,8	0,9	2,2	0,4	4,0	0,8	5,4
Mastigabilidade	A	4,0b	3,1	3,6	2,5	2,6	5,3	5,7	5,1	4,1	3,5	3,2	4,1	4,9
	B	5,1a	3,1	4,5	5,3	6,8	6,1	5,5	6,6	5,8	3,5	4,5	4,7	4,8
	C	4,5ab	1,4	5,6	4,6	4,6	6,9	5,2	4,6	5,1	1,9	4,1	5,2	5,1
Maciez	A	4,6a	4,6	5,4	3,2	4,1	5,3	6,4	4,8	5,3	1,7	5,3	3,6	5,6
	B	4,4a	3,3	3,7	2,4	6,4	3,7	6,2	6,2	7,0	0,5	3,3	5,0	5,5
	C	3,3b	2,2	2,4	3,8	1,9	3,1	5,2	3,3	2,5	1,9	3,9	4,3	5,5

Médias na coluna seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (5% de significância)

Os dados numéricos da Análise de Componentes Principais (ACP) foram representados graficamente (Figura 2). Verificou-se que 41,2% da variação ocorrida entre as amostras foi explicada pelo componente principal I e 32,7% explicada pelo componente principal II. Os componentes principais I e II juntos explicam 84,4 % da variação entre as amostras.

Embora o atributo olhaduras não tenha apresentado diferença significativa (5% de significância) entre as amostras no teste de Tukey, o vetor que o representa é grande comparado com os demais, destacando sua importância no perfil sensorial das amostras. A amostra B está mais próxima dos vetores que representam a cor amarela, (mastigabilidade e sabor de gordura), enquanto a amostra A está mais próxima dos vetores que representam o aroma e sabor típico de queijo de coalho. Os vetores de aroma de manteiga, sabor salgado, homogeneidade e firmeza estão mais próximos da amostra C. O vetor que representa o sabor ácido é bem menor que os demais. Assim, este vetor foi o que menos contribuiu para o perfil sensorial das amostras. Desta forma, os dados obtidos da ACP estão condizentes com os dados da análise de variância e teste de Tukey.

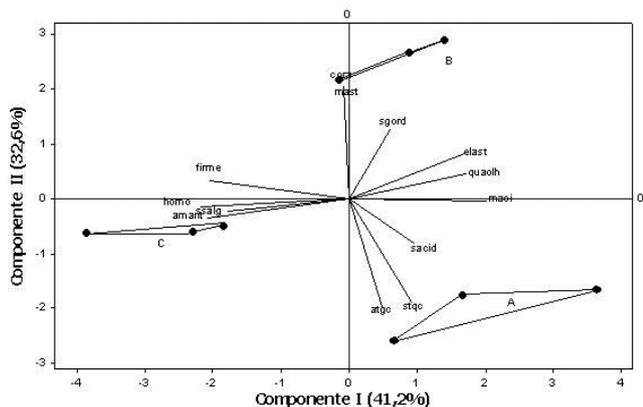


Figura 1. Projeção dos atributos e das amostras nos componentes principais I e II. cora = cor amarela; quaolh = quantidade de olhaduras; homo = homogeneidade; firme = firmeza; amant = aroma de manteiga; atqc = aroma típico de queijo coalho; ssalg = sabores salgado; sgord = sabor de gordura; sacid = sabor ácido; stqc = sabor típico de queijo coalho; elast = elasticidade; mast = mastigabilidade; maci = maciez

Teste de Aceitação

A aceitabilidade da aparência, aroma, sabor e textura foram avaliados por 50 consumidores de queijo de coalho (Tabela 2).

A aparência é o primeiro atributo a ser avaliado pelo provador e, inconscientemente, o influencia

na avaliação de outros atributos, se ele não estiver familiarizado com o teste. A amostra A e C apresentaram as maiores médias de aceitabilidade para a aparência, diferindo estatisticamente (5% de significância) da amostra B. As amostras A e C também tiveram as maiores médias de aceitabilidade para o aroma, sabor e textura. Portanto, as amostras A e C apresentaram similaridade entre as médias de aceitabilidade para os atributos avaliados.

Tabela 2. Valores das médias de aceitabilidade

Amostras	Média de Aceitabilidade			
	Aparência	Aroma	Textura	Sabor
A	7,14 ^a	6,64 ^a	6,78 ^a	7,02 ^a
B	6,14 ^b	6,06 ^a	5,08 ^b	5,24 ^b
C	6,70 ^{ab}	6,36 ^a	7,00 ^a	6,76 ^a

Médias na coluna seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (5% de significância)

A amostra A apresentou maior intenção de compra pelos julgadores, ficando em segunda opção a amostra C e em terceiro a amostra B, conforme ilustrado na Figura 2. Estes resultados correspondem aos dados de aceitabilidade, uma vez que as amostras A e C tiveram as maiores médias de aceitabilidade. Portanto, estas amostras tiveram a maior porcentagem de intenção de compra em relação ao conceito “Certamente Compraria” (~ 40% e 32%, respectivamente).

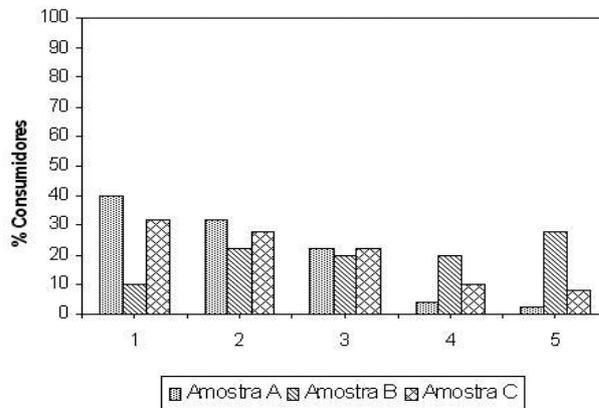


Figura 2. Representação gráfica da intenção de compra dos consumidores para as amostras A, B e C

1. Certamente compraria; 2. Provavelmente compraria; 3. Talvez compraria ou talvez não compraria; 4. Provavelmente não compraria; 5. Certamente não compraria

Análise Físico-química

Análises químicas foram realizadas para avaliar se as amostras estariam com composição dentro de normas de Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ)⁵. A tabela 3 mostra os valores obtidos nas análises físico-químicas realizadas.

O queijo de coalho é classificado como um queijo de média a alta umidade, podendo variar de 36 até 54,9% do seu peso. As amostras analisadas mostram que todas estão com umidade dentro da faixa aceitável e por isso atenderam à legislação. Não há, ainda, na literatura trabalhos que trazem a análise de parâmetros de identidade e qualidade de queijo de coalho industrial. Há trabalhos que estudaram os queijos produzidos de forma artesanal e, nestes produtos, foram encontrados valores de umidade entre 33,6% a 41,1% (Lima)¹, 44,91% (Nascimento et al)⁷ e 40,7% (Santos et al)⁸. Esta diferença do valor de umidade do queijo de coalho artesanal para o queijo de coalho industrial pode ser devido a parâmetros de processamento, procedência da matéria prima de cada fabricante, tipo de estocagem e embalagem.

Com relação ao teor de lipídios, os valores encontrados (Tabela 3) estão abaixo do estabelecido pela legislação, a qual define como padrão valores de 45% a 60,0% de gordura em base seca. Neste caso, a matéria prima poderia ser a responsável pelo fato destes queijos não alcançar a faixa de valor que o caracteriza.

O valor de acidez é um fator decisivo na confecção do queijo, este parâmetro indica particularidades da textura do produto. O valor de acidez alto da amostra C (6,3%), quando comparado ao das outras amostras, pode ser devido à ação de bactérias lácticas fermentativas. Em alguns queijos é desejável a ação desta bactéria, a qual durante a fermentação produz substâncias aromáticas, fator importante na aceitação do produto. Com relação à quantidade de sal, todas as amostras diferiram estatisticamente, tendo a maior concentração a amostra C (1,5%).

Correlação de Dados

Na Figura 1 pode-se observar que o vetor que representa o sabor salgado está voltado e mais próximo da amostra C. Com relação ao teor de sal, analisado como cloreto total (Tabela 3), a amostra C apresentou o maior teor 1,5%. Desta forma, a análise físico-química complementou os dados sensoriais. A aceitabilidade para sabor foi maior para as amostras A e C, não diferindo estatisticamente (5% de significância). Provavelmente, a quantidade de sal desejada e apreciada pelos consumidores esteja entre 1,5% a 1,37 %, expressa em teor de cloreto. A amostra B apresentou 0,83% de cloreto e teve a menor aceitabilidade. Provavelmente à quantidade de sal adicionada foi insuficiente para agradar os consumidores do produto. As medidas de acidez e valor de pH também são importantes para o sabor. O atributo cor amarela caracterizou a amostra B, mas com relação à aceitabilidade para aparência, esta amostra teve a menor média (6,14). Estes dados podem sugerir que a intensidade da cor amarela da amostra B não seja característica da cor de queijo de coalho.

CONCLUSÃO

A Análise Descritiva Quantitativa (ADQ) evidenciou que, dentre os 13 atributos levantados, a cor amarela, o aroma típico de queijo de coalho e o sabor típico de queijo de coalho foram os atributos mais importantes para discriminação das amostras. A ADQ também evidenciou que as amostras A e C apresentaram diferença significativa (5% de significância) na maioria dos atributos avaliados. Já pela Análise de Componentes Principais, foi possível verificar que as três amostras ocuparam quadrantes distintos dentro dos componentes I e II e que apenas o sabor ácido e sabor de gordura não foram importantes para a discriminação das amostras.

Tabela 3. Valores médios de parâmetros físico-químicos

Amostra	Umidade (%)	Teor de Lipídios ¹ (%)	Proteínas (%)	Acidez (%)	Cinzas (%)	Cloretos (%)	pH
A	51,98 ^b	43,27 ^a	21,62 ^b	0,91 ^a	3,68 ^b	1,37 ^a	6 ^b
B	52,34 ^b	43,07 ^a	21,53 ^b	0,69 ^b ^a	2,99 ^c	0,83 ^c	5,88 ^c
C	53,25 ^a	33,10 ^b	26,04 ^a	0,53 ^b	4,3 ^a	1,5 ^a	6,27 ^a

Médias na coluna seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (5% de significância), n experimental igual a 3.

¹Valores referentes a base seca.

O teste de aceitabilidade mostrou que as amostras têm um perfil sensorial semelhante, não apresentando diferença significativa (5% de significância) na maioria dos atributos avaliados. Por outro lado, as amostras A e C apresentaram maior intenção de compra em relação aos conceitos “certamente compraria” e “provavelmente compraria”. Complementando os dados, a análise de composição química mostrou que as amostras têm um perfil de composição química muito semelhante.

REFERÊNCIAS

1. Lima MHP. Elaboração de queijo de coalho a partir de leite pasteurizado e inoculado com *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*. [dissertação de mestrado]. Fortaleza (CE): Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, 1996.
2. Borges MF, Feitosa T, Nassu RT, Miniz CR, Azevedo EHF, Figueiredo EAT. Micoorganismos patogênicos e indicadores em Queijo de Coalho produzido no estado do Ceará, Brasil. *Bol CEPPA*. 2003; 21(1):31-40.
3. Nassu RT, Araújo RS, Borges MF, Lima JR, Macêdo BA, Lima MHP et al. Diagnóstico das condições de processamento de produtos regionais derivados do leite no Estado do Ceará. *Bol Pesq Desenvol, Embrapa, Dez*, 28 págs, 2001.
4. Feitosa T, Borges MF, Nassu RT, Azevedo EHF, Muniz CR. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2003; 23(Supl):162-5.
5. Brasil. Instrução Normativa nº 30 de 26 de junho de 2001. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade de manteiga da terra, queijo de coalho e queijo de manteiga. *Diário Oficial [da] União*. Brasília, DF, 16 de jul. 2001.
6. Brasil. Portaria nº 146 de 07 de março de 1996. Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 04 de mar.1996. Seção 1, p. 3977.
7. Nascimento IR, Silva ES, Felix FF. Estudo das condições de abastecimento de comercialização das características físico-químicas do queijo de coalho comercializado em Aracaju (SE). *Rev Inst Lat Cândido Tostes*. 2002; 57: 250-4.
8. Santos SJ, Nogueira NA, Cunha GMA. Aspectos microbiológicos do queijo tipo coalho comercializado em Fortaleza-Ceará. *Bol CEPPA*. 1995; 13(1): 31-6.
9. Teshima E, Viana AC, Assis MMS, Figueiredo HM. Identidade e Qualidade do Queijo de Coalho Comercializado em Feira de Santana. *Rev Inst Lat Cândido Tostes*. 2004; 59 (339): 194-8.
10. Perez RM, Bohiito WH. Propriedades funcionais e composição de queijos de coalho comerciais. *Rev Inst Lat Cândido Tostes*. 2008;1:1-9.
11. Meilgaard MC, Civille GV, Carr BT. *Sensory evaluation techniques*. 4.ed. Boca Raton, FL: CRCPress; 2007.
12. Stone H, Sidel J. *Sensory Evaluation Practices*. 3. ed. London: 2004.
13. Ritvaven T, Lampolahti S, Lilleberg L, Tupasela T, Isoniemi M, Appelbye U et al. Sensory evaluation, chemical composition and consumer acceptance of full fat and reduced fat cheeses in the Finnish market. *Food Qual Prefe*. 2005; 16: 479-492.
14. Caspia EL, Coggins PC, Schilling MW, Yoon Y, White CH. The relationship between consumer acceptability and descriptive sensory attributes in cheddar cheese. *J Sens Stud*. 2006; 21:112-27.
15. Andrade ASA, Nassu RT, Rodrigues MCP, Silva GJF, Fernandes RLA, Silva AC. Desenvolvimento da terminologia descritiva de queijo de coalho, *Rev Inst Lat Cândido Tostes*. 2006; 61(351): 314-7.
16. Moskowitz HR. *Product testing and sensory evaluation of foods: marketing and R & D approaches*. Westport: Food and Nutrition Press, 1983.
17. Damásio MH, Costell E. Análisis sensorial descriptivo: generación de descriptores y selección de catadores. *Rev Agroquím Technol Alim*. 1991; 31 (2): 165-78.
18. Instituto Adolfo Lutz. *Métodos Físico-químicos para análise de alimentos*, ed. IV, São Paulo, 2005.
19. Cecchi HM. *Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos*. 2ª ed. Unicamp; 2003.

Efeito da remoção de fenilalanina sobre o perfil peptídico de hidrolisados proteicos da farinha de trigo

Phenylalanine removal effect on the peptide profile of hydrolyzed protein from wheat flour

RIALA6/1302

Raquel Linhares CARREIRA¹, Viviane Dias Medeiros SILVA¹, Mauro Ramalho SILVA¹, Harriman Aley MORAIS², Marialice Pinto Coelho SILVESTRE^{3*}

¹Laboratório de Bromatologia/Pesquisa, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, MG/Brasil

²Departamento de Ciências Básicas, Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Diamantina, MG/Brasil

Endereço para correspondência: ^{3*} Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, sala 4132 - Bloco 4. Endereço: Av. Pres. Antonio Carlos, 6627. CEP: 31270-901, Belo Horizonte, MG/Brasil. E-mail: malice@farmacia.ufmg.br

Recebido: 19.01.2010 – Aceito para publicação: 21.06.2010

RESUMO

Para avaliar o efeito da remoção de fenilalanina no perfil peptídico dos hidrolisados proteicos de farinha de trigo, foram preparados nove hidrolisados empregando-se a associação sucessiva de pancreatina e de extrato enzimático bruto obtido da casca de abacaxi (EB). Foram testados o efeito da ordem de adição das enzimas, da temperatura de reação, da relação enzima: substrato (E:S) e do tratamento físico da amostra. A análise do perfil peptídico dos hidrolisados foi realizada em duas etapas: antes e após a remoção da fenilalanina. A cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular foi utilizada para efetuar o fracionamento e a quantificação dos peptídeos e aminoácidos livres pela técnica da Área Corrigida da Fração. O processo de remoção de fenilalanina melhorou o perfil peptídico de três hidrolisados, mas não afetou no de cinco hidrolisados. O efeito benéfico desse processo está associado ao aumento no teor de di- e tripeptídeos ou à redução na quantidade de peptídeos grandes. O melhor perfil peptídico foi obtido após a remoção de fenilalanina, utilizando-se pancreatina E:S de 4:100 a 50°C, durante 210 min, seguida de EB E:S de 10:100 a 70°C durante 90 min.

Palavras-chave. farinha de trigo, hidrolisados proteicos, remoção de fenilalanina, perfil peptídico.

ABSTRACT

The effect of phenylalanine removal on the peptide profile of the protein hydrolysates from wheat flour was investigated. Nine hydrolysates were prepared, using a successive association of a pancreatin and a crude enzymatic extract obtained from pineapple peel (CE), and the effect of the order of enzymes addition, the reaction temperature, the enzyme: substrate (E:S) ratio, and the physical treatment of sample were examined. The analysis of peptide profile of hydrolysates was performed in two stages, that is before and after removing phenylalanine. The size-exclusion high performance liquid chromatography was used for performing the fractionation, followed by Correct Fraction Area technique for quantifying peptides and free amino acids. The process of phenylalanine removal improved the peptide profile of three hydrolyzed samples, but it did not affect the five hydrolysates. The beneficial effect of this process is correlated with the increase of di- and tripeptides contents, or in reducing the amount of large peptides. The best peptide profile was obtained after phenylalanine removal by using pancreatin at E:S ratio of 4:100 at 50°C for 210min, followed by CE at E:S ratio of 10:100 at 70°C for 90 min.

Key words. wheat flour, hydrolysates, phenylalanine removal, peptide profile.

INTRODUÇÃO

A fenilcetonúria é uma doença genética, causada por uma mutação no gene que codifica a enzima fenilalanina hidroxilase, ativa no fígado e responsável pela transformação de fenilalanina (Phe) em tirosina (Tyr). O tratamento da fenilcetonúria é essencialmente dietético e, no Brasil, utilizam-se fórmulas importadas e de alto custo, constituídas de misturas de aminoácidos livres, isentas de Phe, resultando em uma dieta monótona e pouco palatável¹⁻⁵. A ingestão de alimentos de alto valor proteico e com teor de Phe de aproximadamente 5 % é controlada na dieta dos fenilcetonúricos, sendo que os cereais, dentre eles o trigo, fazem parte deste grupo de alimentos, cuja ingestão deve ser controlada. Portanto, a inclusão da farinha de trigo na alimentação destes pacientes, sem restrição, deve passar, necessariamente, por uma etapa de remoção de Phe. Assim, vários métodos foram estudados visando à remoção desse aminoácido de hidrolisados proteicos¹, podendo-se citar a adsorção em carvão ativado (CA) ou resinas de adsorção, cromatografia de troca iônica, peneira molecular ou filtração em gel. A escolha do método deve considerar a praticidade, reprodutibilidade e a relação custo/eficiência de cada tratamento⁶. O laboratório de Bromatologia/Pesquisa da UFMG tem realizado estudos para avaliar a eficiência do CA na remoção de Phe de leite em pó desnatado^{7,8}, soro de leite^{9,10}, fubá de milho¹¹, arroz¹², feijão¹³ e farinha de arroz¹⁴.

Esta etapa de remoção de Phe deve ser precedida da extração proteica e do tratamento enzimático, originando os hidrolisados proteicos. Entretanto, as proteases comerciais são, em sua maioria, importadas e de custo elevado. Assim, com o objetivo de reduzir os custos operacionais, foi testada, neste trabalho, a associação de uma enzima comercial com um extrato enzimático bruto, obtido de um resíduo agroindustrial (casca de abacaxi), preparado no laboratório.

Um dos principais critérios na caracterização de um hidrolisado proteico para utilização dietética é sua distribuição quanto ao tamanho dos peptídeos, sendo utilizados mais efetivamente pelo organismo aqueles contendo um elevado teor de oligopeptídios, especialmente di- e tripeptídeos, do que uma mistura equivalente de aminoácidos livres ou a proteína intacta. Desta forma, a introdução na dieta de hidrolisados enzimáticos ricos em pequenos peptídeos pode ser importante, no sentido de propiciar uma melhor utilização das proteínas^{15,16}.

Visando caracterizar o perfil peptídico de hidrolisados proteicos, diferentes metodologias têm sido desenvolvidas, como por exemplo, eletroforese em gel de poli(acrilamida

dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)¹⁷, cromatografia de exclusão molecular (SEC), cromatografia líquida de alta velocidade com eletrospray acoplado ao espectrômetro de massa¹⁸, HPLC capilar¹⁹, HPLC de fase reversa²⁰, HPLC de exclusão molecular (SE-HPLC) empregando coluna TSK G-2000 SW (6 x 7,5 cm)²¹ e coluna Superose -12HR 10/30^{22,23}. O método desenvolvido por Silvestre et al²⁴ foi empregado na caracterização do perfil peptídico de hidrolisados enzimáticos obtidos de diversas fontes proteicas por este mesmo grupo de pesquisa^{9,12,25-30}. Dessa forma, este método, que permite fracionar e quantificar peptídeos com massas moleculares menores do que 1000 Da, foi aplicado, de forma análoga no presente trabalho, utilizando-se a mesma coluna cromatográfica de exclusão molecular contendo o complexo poli (2-hidroxi-etil-aspartamida)-sílica (PHEA).

O objetivo deste trabalho consistiu em avaliar o efeito da remoção de fenilalanina sobre o perfil peptídico de hidrolisados proteicos de farinha de trigo, estudando-se a influência do tratamento físico da amostra, assim como do emprego da associação sucessiva de uma pancreatina comercial com o extrato enzimático bruto da casca de abacaxi (EB), preparado no laboratório. Além disso, foi estudada a ação de diversos parâmetros hidrolíticos, tais como a ordem de adição das enzimas, a relação E:S e a temperatura de reação.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

A farinha de trigo tipo I foi adquirida no comércio de Belo Horizonte, MG. A protease Protemax[®] 580 L (EC 3.4.21.14), uma serino-endopeptidase de origem bacteriana (cepa do *Bacillus licheniformis*, atividade 580 KDU/g, estável em pH entre 7 e 10, com pH ótimo em 9,5, temperatura ótima de 60°C e temperatura de inativação acima de 85°C por 10 min) foi adquirida da Prozyn (São Paulo, SP, Brasil). A pancreatina (Corolase[®] PP) (complexo enzimático obtido do pâncreas – EC 3.4.21.4, constituído pelas serino-endopeptidases tripsina e quimotripsina e pelas metalo-exopeptidases carboxipeptidases A e B, atividade 200.000 LVE/g, pH ótimo de 9 e temperatura ótima de 50°C), foi adquirida da AB Enzymes Brasil Comercial Ltda (Barueri, SP, Brasil). Os aminoácidos L-fenilalanina, L-tirosina e L-triptofano foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). O carvão ativado (granulado n° 119, 20 x 50 mesh, 12 x 25 mesh, 6 x 12 mesh) foi adquirido da Carbomafrá S.A. (Curitiba, PR, Brasil). O extrato enzimático bruto da casca do abacaxi (*Ananás comosus*) variedade Pérola, foi preparado no laboratório. Utilizou-se o Liofilizador

Freezone, (modelo 77500, Labconco, Kansas City, MI, USA), o compressor (Diapump, Fanem, mod. 089-A, série BE11778, São Paulo, SP, Brasil), o cutter (Sire, modelo Super Cutter, São Paulo, Brasil), ultraturrax (IKA Labortechnik, T25 basic, Wilmington, EUA) e o agitador magnético (Fisatom, modelo 752 A, São Paulo, SP, Brasil). O sistema de cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (SE-HPLC), usado no fracionamento dos hidrolisados proteicos foi constituído por uma coluna cromatográfica poli-(2-hidroxietil-aspartamida)-sílica (PHEA) 250 x 9,4 mm, 5 mm e 200 Å (PolyLC, Columbia, MD, EUA), uma bomba isocrática e um detector espectrofotométrico UV-VIS (série HP1100, Waldbronn, Alemanha), acoplado a um computador com software (HPchemstation, Avondale, EUA). A água usada no cromatógrafo foi purificada em Sistema de Purificação (Áries Vaponics, Rockland, EUA). Todos os reagentes utilizados eram de grau analítico.

Métodos

Preparo dos hidrolisados proteicos da farinha de trigo

Inicialmente, a enzima de *Bacillus licheniformis* foi empregada para extrair as proteínas da farinha de trigo, de acordo com o método desenvolvido no mesmo laboratório do presente trabalho¹¹. O extrato proteico obtido foi submetido à hidrólise enzimática, testando-se a associação sucessiva da pancreatina comercial com o extrato enzimático bruto da casca de abacaxi - EB, variando-se os parâmetros: ordem de adição das enzimas (pancreatina + EB e EB + pancreatina); temperatura (35, 40, 50 e 70°C) e relação enzima:substrato (E:S) (2:100, 3:100 e 4:100) para a pancreatina. Dessa forma, foram obtidos 9 hidrolisados proteicos, que estão apresentados na Tabela 1. O tempo total de reação, para todas as amostras, foi de 5h, sendo testado o efeito do tratamento físico em apenas um dos casos estudados.

Tabela 1. Variáveis empregadas no preparo dos hidrolisados proteicos da farinha de trigo

H	Protease	E:S	Parâmetros Hidrolíticos			
			T (°C)	Tempo (h)	pH	Te
H1	EB + pancreatina	10:100 + 4:100	70/50	90 min/210 min	8/7	Ausente
H2	Pancreatina + EB	4:100 + 10:100	50/70	90 min/210 min	7/8	Ausente
H3	EB + pancreatina	10:100 + 4:100	35	90 min/210 min	7	Ausente
H4	EB + pancreatina	10:100 + 4:100	40	90 min/210 min	7	Ausente
H5	EB + pancreatina	10:100 + 4:100	50	90 min/210 min	7	Ausente
H6	EB + pancreatina	10:100 + 4:100	70	90 min/210 min	7	Ausente
H7	EB + pancreatina	10:100 + 2:100	50	90 min/210 min	7	Ausente
H8	EB + pancreatina	10:100 + 3:100	50	90 min/210 min	7	Ausente
H9	EB + pancreatina	10:100 + 3:100	50	90 min/210 min	7	Ultraturrax

H = hidrolisado; EB: extrato enzimático bruto da casca de abacaxi; E:S: relação enzima:substrato; T = temperatura; Te: tratamento físico do extrato

Remoção de fenilalanina dos hidrolisados proteicos

A remoção da Phe foi realizada pela utilização do CA como meio adsorvente, empregando-se o procedimento de passagem por coluna, desenvolvido no mesmo laboratório do presente trabalho⁸. O CA foi hidratado com água destilada por 10 min sob agitação

constante e, em seguida, colocado em seringa descartável de 10 mL contendo filtro de nylon com lã de vidro. A coluna de carvão ativado foi montada colocando-se embaixo o carvão de menor granulometria, seguido pelo de média e por último o de maior granulometria. Em sequência, os hidrolisados foram passados pela coluna em

quantidade suficiente para atingir a relação proteína:CA 1:88,5 e submetidos à pressão (compressor Diapump, Fanem, mod. 089-A, série BE11778, São Paulo, SP, Brasil), tendo sido recolhidos os eluatos.

Caracterização do perfil peptídico dos hidrolisados proteicos

Para caracterizar o perfil peptídico dos hidrolisados, antes e após a remoção de fenilalanina, empregou-se o fracionamento dos peptídeos, de acordo com o tamanho da cadeia, e a sua posterior quantificação. Este primeiro procedimento foi realizado por cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (SE-HPLC) em coluna PHEA, conforme descrito por Silvestre et al²⁴. Sucintamente, as amostras foram dissolvidas em uma concentração de 1 g % (p/v) na fase móvel (ácido fórmico a 0,05 mol/L, pH 2,5) e submetidas à cromatografia à temperatura ambiente, sob condições isocráticas, a um fluxo de 0,5 mL/min, durante 35 min. O volume injetado foi de 20 mL. A fase móvel foi filtrada, através da membrana de 0,45 mm (Millipore Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, SP, Brasil) e degaseificada imediatamente antes do uso. Posteriormente, a quantificação dos peptídeos e aminoácidos livres presentes nas frações cromatográficas foi realizada empregando-se o método rápido da Área Corrigida da Fração (ACF), desenvolvido por Silvestre et al²⁵. O cálculo da ACF foi realizado após a multidetecção das frações a 230 nm, 280 nm e 300 nm, para se eliminar a interferência devida à absorção dos aminoácidos aromáticos. Finalmente, traçou-se, uma curva padrão,

relacionando a ACF com os teores de aminoácidos das frações cromatográficas.

Análise Estatística

Todos os experimentos foram feitos em 3 repetições e as análises realizadas em triplicata. Os dados foram submetidos à análise de variância e, para a avaliação das diferenças entre as médias dos teores de peptídeos e aminoácidos livres das frações cromatográficas dos hidrolisados proteicos, foi utilizado o Teste de Duncan ($p \leq 0,05$)³¹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização dos hidrolisados proteicos

Perfil peptídico

No intuito de exemplificar o perfil cromatográfico obtido dos hidrolisados proteicos, antes e após a remoção de Phe, apresenta-se, na Figura 1, o hidrolisado H1 a 230 nm. As amostras foram separadas em 4 frações, de acordo com o tempo de eluição, sendo F1, de 11,5 a 16,0 min (grandes peptídeos, com mais de 7 resíduos de aminoácidos); F2, de 16,0 a 19,5 min (peptídeos médios, entre 4 e 7 resíduos); F3, de 19,5 a 20,5 min (di- e tripeptídeos); e F4, de 20,5 a 32,0 min (aminoácidos livres). A análise deste perfil obtido permite concluir que a técnica de SE-HPLC, empregada neste estudo mostrou-se eficiente para fracionar os hidrolisados proteicos com massas moleculares inferiores a 1000 Da. Estes resultados estão de acordo com os obtidos em estudos anteriores realizados neste mesmo laboratório, utilizando esta metodologia, para caracterizar os hidrolisados de diferentes fontes proteicas, tais como o soro de leite^{9,10,30}, a caseína^{26,27,29,32}, o leite^{8,28} e o arroz¹².

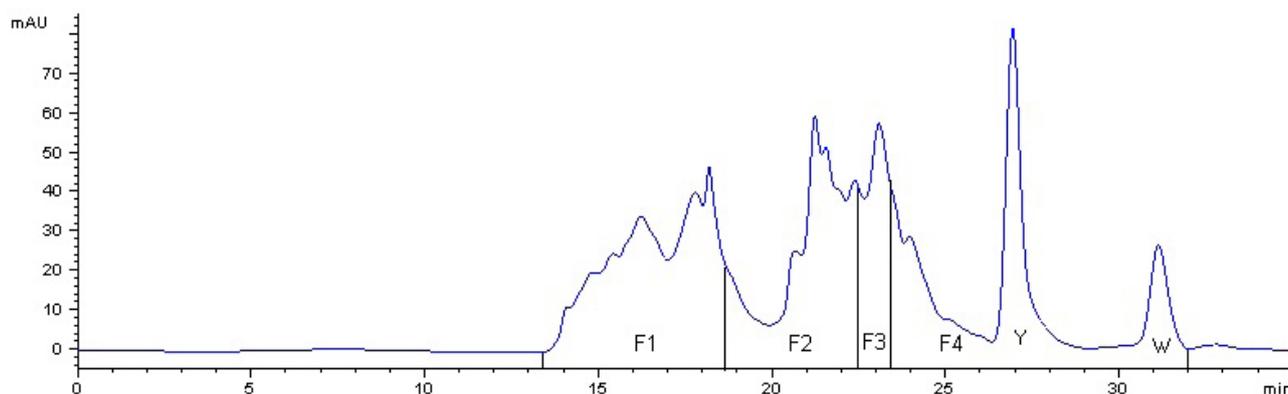


Figura 1. Perfil cromatográfico do hidrolisado H1 a 230 nm. F1: grandes peptídeos (> 7 resíduos de aminoácidos); F2: médios peptídeos (4 a 7 resíduos de aminoácidos); F3: di- e tripeptídeos; F4: aminoácidos livres. Y = pico da tirosina, W = pico do triptofano. Hidrolisado H1: EB (10:100, 70 °C, 90 min, pH 8,0) + pancreatina (4:100, 70 °C, 210 min, pH 7,0)

Ao contrário da técnica aqui utilizada, a maioria dos métodos relatados na literatura, visando o fracionamento de hidrolisados proteicos, apresenta uma série de inconvenientes. Assim, Lemieux et al²¹, empregando a SE-HPLC com uma coluna TSK G-2000 SW, relataram a dificuldade de separar os peptídeos de acordo com o tamanho da cadeia, tendo observado uma superposição de compostos com pesos moleculares diferentes. De acordo com Nogueira et al²⁰, na HPLC de fase reversa há sobreposição de peptídeos e impureza nos picos. Além disso, também pode ocorrer sobrecarga de peptídeos básicos tanto na HPLC de fase reversa quanto na HPLC capilar³³. Golovchenko et al²² e Visser et al²³, também utilizando SE-HPLC, porém com uma coluna Superose -12HR 10/30, verificaram a ocorrência de interações eletrostáticas e/ ou hidrofóbicas entre os solutos e a fase estacionária. Por outro lado, o emprego da eletroforese em gel de poliacrilamida-sódio dodecil sulfato (SDS-PAGE) por Schimidt e Poll³⁴, para estimar a distribuição por pesos moleculares de peptídeos, também não foi adequada, pois esta técnica não permite a identificação dos oligopeptídeos que são arrastados no momento da coloração e lavagem do gel. Dessa forma, a técnica empregada neste trabalho, desenvolvida por Silvestre et al²⁴, possibilitou separar peptídeos com massas moleculares menores do que 1000 Da, apresentando resultados contrários aos encontrados na literatura.

A SE-HPLC também tem sido usada na caracterização do perfil peptídico dos hidrolisados de glúten do trigo, apesar de não ter promovido a separação dos di- e tripeptídeos dos hidrolisados maiores, de acordo com o relatado por Wesley et al³⁵, Wang et al³⁶ e Kong et al³⁷. Assim, Kong et al³⁷, empregaram a SE-HPLC com a coluna Sephadex G-15, para avaliarem a distribuição da massa molecular dos peptídeos obtidos da hidrólise do glúten do trigo, sob ação das enzimas proteolíticas alcalase (*Bacillus licheniformis*) e Neutrased (*Bacillus amyloliquefaciens*), e observaram apenas que os peptídeos apresentavam massa molecular inferior a 1355 Da, não sendo avaliados em separado, o conteúdo de di- e tripeptídeos.

De maneira análoga, Wang et al³⁶ caracterizaram o perfil peptídico dos hidrolisados de glúten do trigo sob a ação de uma papaína, separando os peptídeos obtidos nas seguintes frações: maiores que 15000 Da, entre 15000-10000 Da, entre 5000-10000 Da e menores que 5000 Da. Para tal, empregou o método analítico SE-HPLC com a coluna BioSepSec-4000.

Akiyama et al³⁸, empregando a coluna Superdex™ Peptide HR, com o intuito de separar as frações dos

hidrolisados ácido e enzimático de farinha de trigo, relataram que apenas a faixa de massa molecular foi evidenciada, sendo que no hidrolisado preparado sob a ação de protease, predominaram os peptídeos com massa molecular superior a 1050 000 Da, enquanto que os peptídeos obtidos no hidrolisado ácido, ficaram na faixa de 500-1050 000 Da. Utilizando a coluna Biosep-SEC-S-4000 e a SE-HPLC, Manu e Rao³⁹ fracionaram os extratos proteicos obtidos a partir de diferentes cultivares de farinha de trigo, obtendo-se as frações F1 (>130000 Da), F2 (80000 – 130000 Da), F3 (10000-80000 Da) e F4 (< 5000 Da), sendo estes valores superiores aos determinados no presente estudo. De forma semelhante, Kammoun et al⁴⁰, utilizaram a SE-HPLC e a coluna Shodex KW 802.5 para caracterizar o perfil peptídico do hidrolisado de farinha de trigo, obtido pela ação da enzima Neutrased (endoprotease de *Bacillus subtilis*), obtendo-se também 4 frações: Fração1 (0-1 000 Da), Fração 2 (1000-2000 Da), Fração 3 (2000-3000 Da) e Fração 4 (> 3000 Da), estando apenas a Fração 1 dentro da faixa de massa molecular de principal interesse do presente trabalho.

Não foram encontrados na literatura trabalhos que compararam o perfil peptídico de hidrolisados proteicos de farinha de trigo ou de outros cereais, antes e após a remoção de Phe.

Teores de peptídeos e de aminoácidos livres

Os resultados obtidos para os teores de peptídeos e de aminoácidos livres dos hidrolisados proteicos de farinha de trigo estão expostos na Tabela 2, na qual os valores estão apresentados em termos de porcentagem de peptídeos presentes nas frações F1, F2, F3 e F4. Pode-se observar que houve variação entre os perfis cromatográficos das amostras analisadas, sendo que muitos hidrolisados apresentaram teores peptídicos significativamente diferentes. Entretanto, os elevados teores de di-e tripeptídeos e aminoácidos livres obtidos e, ainda, quantidades moderadas de grandes peptídeos, confirmam o elevado valor nutricional de todos os hidrolisados estudados, uma vez que, em outros trabalhos realizados anteriormente no Laboratório de Bromatologia/Pesquisa, testando-se várias fontes proteicas e diferentes condições hidrolíticas, ficou evidenciada a dificuldade de se obter teores de di-e tripeptídeos acima de 10%, de aminoácidos livres acima de 30% e de grandes peptídeos abaixo de 25%^{8-10,12,26-30,32}. Apenas o processo da ultrafiltração, realizado por Lopes et al⁹ foi capaz de melhorar o perfil peptídico dos hidrolisados analisados, pois promoveu a retirada de peptídeos com massa molecular superior a 10000 Da.

Tabela 2. Teor de peptídeos e de aminoácidos livres nas frações cromatográficas dos hidrolisados proteicos

H	F1		F2		F3		F4	
	AR	DR	AR	DR	AR	DR	AR	DR
H1	15,42 ^{h/3}	20,47 ^{b,c,d,e/3}	32,96 ^{a/2}	28,43 ^{b,c,d,e/2}	12,03 ^{e/3}	14,97 ^{b,c,d,e/4}	39,58 ^{a,b,c/1}	36,75 ^{b,c,d/1}
H2	13,09 ^{i/4}	12 ^{i/4}	27,23 ^{c,d,e/2}	28,43 ^{b,c,d,e/2}	16,98 ^{b/3}	23,58 ^{a/3}	42,70 ^{a/1}	36,00 ^{b,c,d/1}
H3	22,61 ^{a,b/3}	19,18 ^{c,d,e/3}	30,68 ^{a,b,c/2}	30,26 ^{a,b,c,d/2}	13,55 ^{c,d,e/4}	15,50 ^{b,c,d/4}	34,15 ^{c,d/1}	35,06 ^{c,d/1}
H4	17,89 ^{e,f,g/3}	16,64 ^{f,g,h/3}	31,24 ^{a,b/2}	32,69 ^{a/1}	15,16 ^{b,c,d/3}	22,28 ^{a/2}	35,71 ^{c,d/1}	28,40 ^{e/1}
H5	15,85 ^{g,h/3}	17,98 ^{e,f,g/3}	29,95 ^{a,b,c,d,e/2}	29,18 ^{a,b,c,d,e/2}	15,52 ^{b,c,d/3}	15,24 ^{b,c,d/3}	38,68 ^{a,b,c/1}	37,60 ^{a,b,c,d/1}
H6	20,08 ^{c,d,e/2}	20,92 ^{a,b,c,d/3}	32,72 ^{a/1}	27,02 ^{c,d,e/1}	14,64 ^{b,c,d,e/3}	14,34 ^{b,c,d,e/4}	32,56 ^{d,e/1}	34,39 ^{c,d/2}
H7	23,06 ^{a/3}	23,13 ^{a/2}	29,21 ^{a,b,c,d,e/2}	26,18 ^{e/2}	12,85 ^{d,e/4}	14,56 ^{b,c,d,e/3}	34,89 ^{c,d/1}	36,14 ^{b,c,d/1}
H8	18,39 ^{d,e,i/3}	19,38 ^{c,d,e/3}	29,18 ^{a,b,c,d,e/2}	27,38 ^{b,c,d,e/2}	13,80 ^{c,d,e/4}	13,81 ^{c,d,e/4}	38,62 ^{a,b,c/1}	39,43 ^{a,b,c/1}
H9	18,47 ^{d,e,i/3}	17,56 ^{e,f,g/3}	30,37 ^{a,b,c,d/2}	28,49 ^{b,c,d,e/2}	15,95 ^{b,c/3}	17,15 ^{b,c/3}	35,22 ^{c,d/1}	36,40 ^{b,c,d/1}

Todos os valores são apresentados em % nmols das quatro frações. Os resultados representam a média das triplicatas. Médias indicadas por números iguais não diferem entre si a 5% de significância na comparação de diferentes frações de um mesmo hidrolisado (linha). Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de significância na comparação de uma mesma fração para diferentes hidrolisados (coluna). AR: antes da remoção; DR: depois da remoção. F1: maior que 7 resíduos de aminoácidos; F2: entre 4 e 7 resíduos; F3: di- e tripeptídeos e F4: aminoácidos livres

Entretanto, a escolha do hidrolisado com perfil peptídico mais favorável, nutricionalmente, deve ser complementada, baseando-se em estudos realizados por outros autores. Assim, segundo Frenhani e Burini⁴¹, durante o metabolismo de proteínas, o primeiro estágio de hidrólise leva à formação de oligopeptídeos contendo de 2 a 6 resíduos de aminoácidos e aminoácidos livres. Estes peptídeos são, então, quebrados em di- e tripeptídeos e, finalmente, as proteínas são absorvidas na forma de di- e tripeptídeos e de aminoácidos livres. Ainda, de acordo com estes mesmos autores, os di- e tripeptídeos são mais eficientemente absorvidos que os aminoácidos livres, os quais, por sua vez, são melhores que os tetra- ou peptídeos superiores. Em quantidades equivalentes de di- e tripeptídeos e misturas de aminoácidos livres, os di- e tripeptídeos apresentam velocidade de absorção aproximadamente 10 vezes maior.

Conclui-se que o melhor perfil peptídico foi obtido para o hidrolisado H2, após ter sido submetido ao processo de remoção de Phe, apresentando um dos maiores teores de di- e tripeptídeos (23,58%) e de aminoácidos livres (36%) e o menor de grandes peptídeos (12%). Por outro lado, os perfis peptídicos mais desfavoráveis foram obtidos para os hidrolisados H6 e H7, antes e após a remoção de

Phe, uma vez que estes dois hidrolisados apresentaram os menores valores para os di- e tripeptídeos (14,49% e 13,7%, em média, respectivamente), e os maiores conteúdos de grandes peptídeos (20,5% e 23,1%, em média, respectivamente).

Efeito da remoção de Phe sobre o perfil peptídico

Pode-se observar na Tabela 2 que o processo de remoção de Phe interferiu no perfil peptídico de 4 hidrolisados (H1, H2, H3 e H4), o que representa, aproximadamente, 44% das amostras estudadas. Por outro lado, para os hidrolisados H5, H6, H7, H8 e H9, não foram observadas diferenças significativas entre os teores dos peptídeos constituintes das frações cromatográficas dos hidrolisados de farinha de trigo, antes e após a remoção de Phe. Ressalta-se que estes hidrolisados foram obtidos empregando-se as mesmas condições hidrolíticas, referentes à ordem de ação enzimática (EB + pancreatina), tempo de hidrólise (90 min+210 min), e pH (7,0).

A remoção de Phe foi favorável para os hidrolisados H2, H3 e H4, sendo que, no caso dos hidrolisados H2 e H4, o efeito benéfico foi observado, essencialmente, no que diz respeito ao aumento acentuado dos teores de di- e tripeptídeos, que passaram de 16,98% para 23,58% e

de 15,16% para 22,28%, respectivamente. Este resultado está associado à queda nos teores de aminoácidos livres destes hidrolisados, que, por sua vez, poderia ser explicada pela maior facilidade de adsorção da Phe pelo carvão ativado quando presente na forma livre. No preparo dos hidrolisados H2 e H4, apenas a relação enzima:substrato (E:S) empregada foi a mesma; as demais condições hidrolíticas, tais como ordem de ação das enzimas, temperatura e pH foram diferentes.

Quanto ao hidrolisado H3, a melhora do perfil peptídico pela remoção de Phe foi menos pronunciada do que a dos 2 hidrolisados citados acima, relacionando-se apenas a uma pequena redução nos teores de grandes peptídeos (de 22,61% para 19,18%), a qual poderia estar associada a uma maior presença de Phe na fração F1, provavelmente situada na porção -C- ou -N- terminal dos peptídeos.

Dentre todos os hidrolisados analisados, apenas para o H1 a remoção de Phe não favoreceu a obtenção de um perfil peptídico adequado. Além de não terem sido observadas diferenças significativas entre os teores de di- e tripeptídeos e aminoácidos livres, o emprego do CA promoveu uma elevação no conteúdo de grandes peptídeos, passando de 15,42% para 20,47%.

Não foram encontrados na literatura relatos comparando o perfil peptídico de hidrolisados proteicos da farinha de trigo ou de outros cereais, antes e após a remoção de fenilalanina.

CONCLUSÃO

O processo de remoção de fenilalanina aqui empregado interferiu na distribuição de peptídeos e de aminoácidos livres dos hidrolisados proteicos, tendo sido prejudicial apenas, em 1 dos 9 casos estudados. Por meio deste processo, foi possível obter um perfil peptídico adequado, representado, especialmente, por um alto teor de di- e tripeptídeos, em torno de 24%.

REFERÊNCIAS

1. Mira NVM, Marquez UML. Importância do diagnóstico e tratamento da fenilcetonúria. *Rev Saúde Públ*. 2000; 34(1):86-96.
2. Malloy-Diniz LF, Cardoso-Martins C, Carneiro KC, Cerqueira MMM, Ferreira APA, Aguiar MJB et al. Funções executivas em crianças fenilcetonúricas. *Arq Neuropsiquiatr*. 2004; 62(2-B):473-9.
3. Hamman K, Clark H, Montini E, Al-Dhalimy M, Grompe M, Finegold M et al. Low therapeutic threshold for hepatocyte replacement in murine phenylketonuria. *Mol Therapy*. 2005; 12(2):337-44.
4. Monteiro LTB, Cândido LMB. Fenilcetonúria no Brasil: evolução e casos. *Rev Nutr*. 2006; 19(3):381-7.
5. Wasserstein MP, Snyderman SE, Sansaricq C, Buchsbaum MS. Cerebral glucose metabolism in adults with early treated classic phenylketonuria. *Mol Genet Metabol*. 2006; 87(3):272-7.
6. Outinen MT, Tossavainen O, Harju M, Linko P, inventors. Method for removing phenylalanine from proteinaceous compositions, a product so obtained and use thereof. US Patents 5,547,687. 1996 Aug 20.
7. Lopes DCF, Delvivo FM, Silvestre MPC. Dietary supplements for phenylketonuria: removing Phe by activated carbon. *Nutr Food Sci*. 2006; 36(2):96-104.
8. Soares RDL, Biasutti EAR, Capobiango M, Vieira CR, Silva VDM, Januário JN et al. Preparation of enzymatic skim milk hydrolysates with low phenylalanine content. *Acta Farm Bon*. 2006; 25(3):325-32.
9. Lopes DCF, Delvivo FM, Januário JN, Aguiar MJB, Starling ALP, Silvestre MPC. Phenylalanine removal from whey hydrolysates. *J Food Technol*. 2007; 5(2):191-7.
10. Silva VDM, De Marco LM, Afonso WO, Lopes DCF, Januário JN, Aguiar MJB et al. Preparation of low-phenylalanine whey hydrolysates, using papain and pancreatin immobilized on activated carbon and alumina. *Am J Food Technol*. 2007; 2:327-41.
11. Capobiango M, Lopes DCF, Carreira RL, Afonso WO, Segall SD, Silvestre MPC. Optimization of enzyme assisted processes for extracting and hydrolysing corn proteins aiming phenylalanine removal. *Int J Food Eng*. 2007; 3:1-19.
12. Lopes DCF, Bizzotto CS, Silva VDM, Afonso WO, Lopes Jr CO, Silvestre MPC. Obtention of low-phenylalanine protein hydrolysates from rice: use of two pancreatins. *J Food Technol*. 2008; 6:57-65.
13. Lopes Jr CO. Extração protéica e obtenção de hidrolisados proteicos de feijão com baixo teor de fenilalanina [Dissertação de mestrado]. Belo Horizonte, Minas Gerais: Faculdade de Farmácia da UFMG, 2008. 81pp.
14. Silvestre MPC, Vieira CR, Silva MR, Silva MC, Lopes Jr CO, Silva VDM. Use of an enzymatic process for extracting and hydrolyzing rice proteins aiming at phenylalanine removal. *Int J Food Eng*. 2009; 5(1):1-11.
15. Ganapathy V, Gupta N, Martindale RG. Protein digestion and absorption. In: Johnson LR (Ed.). *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, Fourth Edition, Academic Press, 2006. Chapter 65, pp.1667-92.
16. Boza JJ, Moënnos D, Vuichoud J, Jarret AR, Gaudard-de-Weck D, Ballèvre O. Protein hydrolysate vs free amino acid-based diets on the nutritional recovery of the starved rat. *Eur J Nutr*. 2000; 39:237-43.
17. Chicón R, Belloque J, Alonso E, López-Fandiño R. Antibody binding and functional properties of whey protein hydrolysates obtained under high pressure. *Food Hydrocoll*. 2009; 23:593-9.
18. Li-Jun L, Chuan-He Z, Zheng Z. Analyzing molecular weight distribution of whey protein hydrolysates. *Food Bioprod Proc*. 2008; 86(1):1-6.

19. Ito S, Yoshioka S, Ogata I, Yamashita E, Nagai S, Okumoto T et al. Capillary high-performance liquid chromatography/electrospray ion trap time-of-flight mass spectrometry using a novel nanoflow gradient generator. *J Chromatogr A*. 2005; 1090:178-83.
20. Nogueira R, Lämmerhofer M, Lindner W. Alternative high-performance liquid chromatographic peptide separation and purification concept using a new mixed-mode reversed-phase/weak anion-exchange type stationary phase. *J Chromatogr A*. 2005; 1089:158-69.
21. Lemieux L, Piot JM, Guillochon D, Amiot J. Study of the efficiency of a mobile phase used in size-exclusion HPLC for the separation of peptides from a casein hydrolysate according to their hydrodynamic volume. *J Chromatogr*. 1991; 32:499-504.
22. Golovchenko N, Kataeva IA, Akimenko VK. Analysis of pH-dependent protein interactions with gel filtration medium. *J Chromatogr*. 1992; 591(4):121-8.
23. Visser S, Slangen CJ, Robben AJPM. Determination of molecular mass distributions of whey protein hydrolysates by high-performance size-exclusion chromatography. *J Chromatogr*. 1992; 599:205-9.
24. Silvestre MPC, Hamon M, Yvon M. Analyses of protein hydrolysates. 1. Use of poly (2-hydroxyethyl-aspartamide) - silica column in size-exclusion chromatography for the fractionation of casein hydrolysates. *J Agric Food Chem*. 1994; 42:2778-82.
25. Silvestre MPC, Hamon M, Yvon M. Analyses of protein hydrolysates. 2. Characterization of casein hydrolysates by a rapid peptide quantification method. *J Agric Food Chem*. 1994; 42:2783-89.
26. Morato AF, Carreira RL, Junqueira RG, Silvestre MPC. Optimization of casein hydrolysis for obtaining high contents of small peptides: use of subtilisin and trypsin. *J Food Comp Anal*. 2000; 13(5):843-57.
27. Carreira RL, De Marco LM, Dias DR, Morais HA, Ornellas CBD, Silvestre MPC. Analysis of peptide profiles of casein hydrolysates prepared with pepsin, trypsin and subtilisin. *Acta Farm Bon*. 2004; 23(1):17-25.
28. Lopes DCF, Delvivo FM, Silvestre MPC. Hydrolysates of skim milk powder: peptide profiles for dietetic purposes. *Braz Food J*. 2005; 107(1):42-53.
29. Morais HA, De Marco LM, Oliveira MC, Silvestre MPC. Casein hydrolysates using papain: peptide profile and encapsulation in liposomes. *Acta Alim*. 2005; 34(1):59-69.
30. Biasutti EAR, Lopes DCF, Souza MWS, Campos RBD, Segall SD, Silvestre MPC. Obtenção de hidrolisados do soro de leite com alto teor de oligopeptídeos utilizando-se subtilisina. *Braz J Food Technol*. 2007; 10(4):225-32.
31. Pimentel-Gomes F. Curso de estatística experimental. 14 ed. Piracicaba (SP): Nobel; 2000.
32. Barbosa CMS, Morais HA, Delvivo FM, Mansur HS, Oliveira MC, Silvestre MPC. Papain hydrolysates of casein: molecular weight profile and encapsulation in lipospheres. *J Sci Food Agric*. 2004; 84(4):1891-900.
33. Mccalley DV. Effect of buffer on peak shape of peptides in reversed-phase high performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 2004; 1038:77-84.
34. Schmidt DG, Poll JK. Enzymatic hydrolysis of whey proteins. Hydrolysis of a-lactoalbumin and b-lactoglobulin in buffer solutions by proteolytic enzymes. *Neth Milk Dairy J*. 1991; 45(4):225-40.
35. Wesley IJ, Larroque O, Osborne BG, Azudin N, Allen H, Skerritt JH. Measurement of gliadin and glutenin content of flour by NIR spectroscopy. *J Cereal Sci*. 2001; 34:125-33.
36. Wang J, Zhao M, Jiang Y. Effects of Wheat Gluten Hydrolysate and Its Ultrafiltration Fractions on Dough Properties and Bread Quality. *Food Technol Biotechnol*. 2007; 45:410-14.
37. Kong X, Zhou H, Qian H. Enzymatic hydrolysis of wheat gluten by proteases and properties of the resulting hydrolysates. *Food Chem*. 2007; 102: 759-63.
38. Akiyama H, Sakata K, Yoshioka Y, Murata Y, Ishihara Y, Teshima R et al. Profile Analysis and Immunoglobulin e Reactivity of Wheat Protein Hydrolysates. *Int Arch Allergy Immunol*. 2006; 140: 36-42.
39. Manu BT, Rao UJSP. Influence of size distribution of proteins, thiol and disulfide content in whole wheat flour on rheological and chapati texture of Indian wheat varieties. *Food Chem*. 2008; 10: 88-95.
40. Kammoun R, Bejar S, Ellouz R. Protein size distribution and inhibitory effect of wheat hydrolysates on Neutras. *Bior. Technol*. 2003; 90: 249-54.
41. Frenhani PB, Burini RB. Mecanismos de absorção de aminoácidos e oligopeptídeos. *Arq. Gastroenterol*. 1999; 36: 227-37.

Avaliação físico-química e aceitação sensorial de biscoitos tipo *cookies* elaborados com farinha de resíduos de acerola

Physical-chemical and sensory characteristics of cookies formulated with acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) residues flour

RIALA6/1303

Ana Carolina Moura de Sena AQUINO^{1*}, Raisa Soares MÓES¹, Karina Magna Macena LEÃO¹, Ana Virginia Dantas FIGUEIREDO², Alessandra Almeida CASTRO¹

*Endereço para correspondência: Cidade Universitária Prof. José Aloísio de Campos, São Cristóvão, Sergipe, Brasil, CEP 49100-000, Departamento de Tecnologia de Alimentos, fone (79) 8101-1152, e-mail: carolsena@ig.com.br

¹Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE, Brasil

²Laboratório de Bromatologia, Instituto Tecnológico e de Pesquisas do Estado de Sergipe, Aracaju, SE, Brasil

Recebido: 17.02.2010 – Aceito para publicação: 28.09.2010

RESUMO

A farinha obtida dos resíduos de processamento da polpa de acerola foi utilizada para preparar biscoitos tipo *cookies*. O efeito da mistura dessa farinha foi avaliado na composição e aceitabilidade dos *cookies*. Foram elaboradas formulações com 0% (padrão), 10% (Tipo I) e 20% (Tipo II) de farinha de resíduos de acerola em substituição parcial da farinha de trigo. A farinha de resíduos, constituída de cascas e sementes, apresentou 8,60% de umidade, 8,88% de proteína, 0,52% de lipídios, 3,03% de cinzas, 24,33% de açúcares redutores em glicose, 8,09 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de carotenoides totais, 47,5°Brix e 9549,61 mg de ácido ascórbico.100g⁻¹. Os *cookies* preparados com farinha de resíduos obtiveram menores notas na impressão global (5,34-Tipo I e 4,14-Tipo II) em comparação à formulação padrão (6,62). Há necessidade de se efetuar melhorias, como ajuste no teor de umidade nas formulações, para maior aceitação do produto. No biscoito padrão não houve detecção de carotenoides totais e ácido ascórbico, mas estes estiveram presentes no Tipo I, respectivamente, nos valores de 1,51 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ e 2172,60 mg.100g⁻¹. A farinha de resíduos de acerola, pelo elevado teor de ácido ascórbico, torna-se boa alternativa para substituição parcial da farinha de trigo em *cookies* para melhorar seu valor nutritivo. **Palavras-chave.** resíduos de acerola (*Malpighia emarginata* D.C.), biscoito, aceitação sensorial, caracterização.

ABSTRACT

Acerola pulp processed residues flour was used as a mixture material for cookies. The effect of the addition of this flour was evaluated in the cookies composition and acceptability. Formulations containing 0% (standard), 10% (Type I) and 20% (Type II) of acerola residues flour were prepared partially replacing the wheat flour. The residue flour, consisting of peels and seeds, showed 8.60% humidity, 8.88% protein, 0.52% lipids, 3.03% ash, 24.33% of reducing sugars into glucose, 8.09 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ of total carotenoids, 47.5°Brix, and 9549.61 mg of ascorbic acid.100g⁻¹. The cookies prepared with acerola residue flour formulations were not well scored on the global impression of them, being 5.34 (Type I) and 4.14 (Type II) when compared with the standard one (6.62). Improvements as adjusting the moisture contents have to be carried out for increasing cookies acceptance. Neither total carotenoids nor ascorbic acid were detected in the standard cookies, however in Type I cookies these substances rates were of 1.51 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ and 2172.60 mg.100g⁻¹, respectively. Acerola residue flour showed a distinct advantage owing to its high ascorbic acid contents, being an useful alternative for partially replacing the wheat flour to improve the nutritional value of prepared cookies.

Key words. acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) residues, cookie, sensory acceptance, characterization.

INTRODUÇÃO

A acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) é uma fruta que se destaca pelo seu elevado teor de ácido ascórbico, e tem sido objeto de estudos visando aproveitar ao máximo esse constituinte, face à precibilidade da fruta *in natura* e ao baixo índice de processamento¹.

O Brasil é um dos maiores produtores de frutas do mundo, porém, sofre desperdícios ao redor de 30 a 40% desses produtos². As indústrias de polpas congeladas de frutas se expandiram em todo o Brasil, sendo a polpa utilizada, principalmente, na elaboração de sucos. Como vantagem desse processamento, tem-se a possibilidade de consumo, em todo o país, de frutas provenientes das regiões Norte e Nordeste³.

A crescente preocupação com os impactos ambientais e o elevado índice de desperdício causado pelas indústrias de alimentos tem levado a busca de alternativas viáveis de aproveitamento dos seus resíduos para geração de novos produtos para consumo humano⁴. A quase totalidade desses resíduos é constituída pelas cascas e sementes da fruta e representam um problema tecnológico de grandes proporções para a indústria de alimentos, uma vez que precisam ser descartados.

Visando minimizar as perdas de matéria-prima e custos de produção através do aproveitamento de resíduos, surgiu a necessidade do desenvolvimento de novas alternativas para a industrialização deste tipo de produto. Os resíduos de frutas não fazem parte dos hábitos alimentares da maioria das populações, porém podem ser importante fonte de nutrientes. Quando adicionados em alimentos, podem representar ao consumidor um produto saudável, como por exemplo, em biscoitos, capaz de modificar/incrementar o sabor, a textura, o aroma, a cor e o valor nutricional dos mesmos. Contudo, é importante que tais produtos sejam aceitos sensorialmente para que seja viabilizada sua utilização⁵.

Os biscoitos tipo *cookie* possuem vários atrativos como: grande consumo, vida útil relativamente longa e boa aceitação, particularmente entre crianças⁶. Recentemente, os biscoitos tipo *cookie* têm sido formulados com a intenção de implementar sua fortificação com fibra ou proteína, devido ao forte apelo nutricional que existe hoje em dia com relação aos alimentos consumidos⁷.

Diante da existência de poucos trabalhos sobre farinha de resíduos de acerola para o consumo humano, o objetivo deste trabalho foi obter e caracterizar a farinha de resíduos do processamento de polpa de acerola e avaliar o potencial da sua utilização na elaboração de biscoitos tipo *cookies*.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção da farinha de resíduos de acerola

Os frutos de acerola foram adquiridos em maio de 2009 junto ao CEASA da cidade de Aracaju, Sergipe. Foram utilizados frutos classificados quanto aos estágios de maturação em semimaduros (mais que 75% da casca com coloração alaranjada) e maduros (mais que 75% da casca com coloração vermelha)⁸.

Os frutos de acerola, ao serem recebidos no laboratório, foram inicialmente selecionados manualmente com a finalidade de retirar pedaços de galhos de plantas, folhas, frutos estragados e em estágio de maturação inadequado. Depois da seleção, os frutos passaram por uma pré-lavagem com água potável em abundância para retirada das impurezas macroscópicas. E, em seguida, as acerolas foram sanitizadas por imersão em uma solução de hipoclorito de sódio a 30 ppm por 20 minutos e, então, novamente lavadas com água potável para retirada do cloro. Os equipamentos e utensílios foram previamente lavados com água e detergente, sanitizados com solução de hipoclorito de sódio a 200 ppm por 30 minutos e novamente lavados com água para retirada do cloro.

Os frutos foram, em seguida, submetidos ao processo de despulpamento em despulpadeira marca Itametal, modelo compacto, utilizando-se uma tela de 1,5 mm de diâmetro. Os resíduos obtidos, cascas e sementes, foram congelados a -22,1°C para posterior secagem.

Para o processo de secagem, os mesmos foram descongelados à temperatura ambiente e colocados em bandejas de aço inox, dispostas em secador elétrico tipo cabine com recirculação de ar forçado a 60°C (nesta temperatura a redução de carotenoides não é tão intensa como em temperaturas superiores, e o tempo de secagem é menor que a 50-55°C) até peso constante (6,5 horas), sendo os valores finais de atividade de água e umidade, respectivamente, 0,40 e 6,20%.

Os resíduos desidratados foram resfriados em temperatura ambiente e triturados em moinho analítico tipo Willye TE-650. Em seguida, a farinha obtida foi armazenada na embalagem (saco de nylon poli 5 camadas) e selada para posterior utilização.

Processamento dos biscoitos tipo *cookies*

Foi utilizada a formulação padrão de *cookies* descrita no método 10-50D da AACC - *American Association of Cereal Chemists*⁹. À formulação padrão foram acrescentados 10% (Tipo I) e 20% (Tipo II) da farinha de resíduos de acerola, em substituição parcial da farinha de trigo, conforme Tabela 1.

Tabela 1. Formulações de biscoitos tipo *cookies* com incorporação de farinha de resíduos de acerola

INGREDIENTES	PADRÃO	TIPO I	TIPO II
	0%	10%	20%
Farinha de trigo (g)	223,20	200,88	178,50
Farinha de resíduo de acerola (g)	0,00	22,30	44,60
Açúcar refinado (g)	100,00	100,00	100,00
Margarina (g)	67,50	67,50	67,50
Água destilada (mL)	25,00	30,00	35,00
Fermento químico (g)	5,00	5,00	5,00
Sal (g)	2,10	2,10	2,10

A quantidade de água inicial adicionada à massa foi calculada a partir da umidade e das massas das farinhas de trigo e de resíduos de acerola em cada mistura, conforme Tabela da AACCS⁹, método 10-50D. Inicialmente misturou-se a margarina, açúcar e sal, com o auxílio de uma batedeira doméstica, por 5 minutos, em velocidade máxima, de modo que sua consistência se apresentasse espumosa, leve, não sendo notados os grânulos de açúcar. A essa mistura foram acrescentados 25 mL de água destilada, batendo por mais 3 minutos em velocidade média. Adicionaram-se, aos poucos, as farinhas e o fermento, misturando em velocidade média até a formação de uma massa lisa, brilhante e não-quebradiça. Para as formulações de biscoito tipo I e tipo II, foi necessário acrescentar mais água destilada, para que apresentassem a firmeza e a maciez adequadas. Neste ponto, a massa foi levada para descansar por 15 minutos e, em seguida, aberta com o auxílio de um rolo de acrílico, sobre uma superfície com farinha de trigo comum, até a espessura de 5 mm. Um molde redondo (diâmetro igual a 25 mm) foi utilizado para cortar a massa no formato dos *cookies*, os quais foram levados para assar em forno pré-aquecido por 15 minutos a 200°C, resfriados à temperatura ambiente e armazenados em potes de vidro bem vedados até o momento das análises físico-químicas e sensorial.

Aceitação sensorial dos *cookies*

Foi realizada no dia seguinte, após a elaboração dos *cookies*, empregando-se o teste de aceitação com escala hedônica estruturada de nove pontos, sendo os extremos valor 1 equivalente ao termo hedônico “desgostei muitíssimo” e o valor 9 atribuído ao termo “gostei muitíssimo”, para a

avaliação dos atributos aparência, aroma, sabor, consistência e impressão global¹⁰. Também foi avaliada a intenção de compra do consumidor com escala de 5 pontos, com variação entre “1 - certamente não compraria” e “5 - certamente compraria”^{11,12}.

Os testes foram realizados com 50 provadores não treinados, consumidores de biscoitos, recrutados dentre alunos e professores da Universidade Federal de Sergipe.

As amostras foram apresentadas em cabines individuais, de forma monádica e casualizada, juntamente com água (para evitar a interferência do sabor de uma amostra no julgamento de outra) e em pratos plásticos descartáveis, codificados com algarismos de três dígitos.

Análises físico-químicas

Na caracterização físico-química da farinha de resíduos de acerola e dos *cookies* (padrão e Tipo I – formulação mais aceita com a substituição parcial da farinha de resíduos de acerola), as análises foram realizadas em triplicata e o resultado expresso pela média dos valores incluindo o desvio padrão.

A umidade foi realizada pelo método gravimétrico de volatilização, por secagem direta em estufa a 105°C pelo método 012/IV¹³. A proteína bruta foi determinada pela técnica de Kjeldahl, segundo método 036/IV¹³, usando 6,25 como o fator para o nitrogênio proteico. Para a determinação dos lipídeos totais, foi utilizado o método 032/IV¹³, e para cinzas, o método de gravimetria, mediante incineração da amostra em mufla a 550°C até obtenção de cinzas clara, de acordo com o método n°018/IV¹³.

Os teores de carotenoides totais foram avaliados pelo método proposto por Lichtenthaler¹⁴, e o ácido ascórbico foi determinado pelo método padrão, n° 43.065, da AOAC¹⁵, modificado por Benassi e Antunes¹⁶, no qual se substituiu o solvente extrator ácido metafosfórico por ácido oxálico.

Os açúcares redutores totais foram analisados pelo método 038/IV¹³. O pH foi determinado segundo o método n°017/IV¹³ medido em potenciômetro modelo MPA-210 da marca TecnoPON. Para os sólidos solúveis totais, expressos em °Brix, foi utilizado refratômetro Abbe, modelo 2WAJ, marca Biobrix.

A acidez total titulável (ATT) foi determinada segundo método n° 312/IV¹³. A atividade de água foi determinada utilizando higrômetro AQUALAB, modelo Series 3 TE, fabricado pela Decagon Devices Inc.

Análise estatística

Os resultados das caracterizações físico-químicas e dos testes sensoriais foram avaliados

estatisticamente empregando-se o programa ASSISTAT, versão 7.4 beta, por Análise de Variância (ANOVA) e teste de médias de Tukey ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises físico-químicas da farinha de resíduos de acerola estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Caracterização físico-química da farinha de resíduos de acerola

PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS	VALORES*
Umidade (g.100g ⁻¹)	8,60 ± 0,14
Proteína Bruta (g.100g ⁻¹)	8,88 ± 0,82
Lipídeos (g.100g ⁻¹)	0,52 ± 0,73
Cinzas (g.100g ⁻¹)	3,03 ± 0,09
Açúcares Redutores (g de glicose.100g ⁻¹)	24,33 ± 0,13
pH	3,32 ± 0,01
ATT (g de ácido málico.100g ⁻¹)	8,51 ± 0,04
ATT (g de ácido cítrico.100g ⁻¹)	8,13 ± 0,04
Carotenoides totais (µg.g ⁻¹)	8,09 ± 1,02
Sólidos Solúveis (°Brix)	47,50 ± 0,50
Vitamina C (mg ácido ascórbico.100g ⁻¹)	9549,61 ± 81,42

*Em base úmida. Média de triplicata ± desvio padrão
ATT: Acidez total titulável

Poucos dados referentes à caracterização de farinha proveniente da secagem de resíduos do processamento industrial da acerola para consumo humano foram encontrados na literatura. Caracterizando resíduos das indústrias potiguares de beneficiamento de polpas de frutas, Jerônimo et al¹⁷ apresentaram como valor de umidade 8,18 g.100g⁻¹ para os resíduos desidratados de acerola, sendo esse resultado coerente ao obtido para a farinha deste estudo (8,60 g.100g⁻¹).

O valor médio encontrado do pH foi de 3,32, equivalente ao valor obtido para o pó da polpa de acerola 3,31¹⁸. Sendo o valor de pH abaixo de 4,5 (valor que delimita o desenvolvimento de microorganismos), considera-se a farinha de resíduos de acerola ácida e, assim, de difícil proliferação microbiana.

Ao caracterizar a polpa de acerola em pó, Soares et al¹⁸ encontraram um valor de ATT de 10,24 g de ácido

cítrico.100g⁻¹, sendo este maior do que o obtido para a farinha de resíduos de acerola (8,13 g de ácido cítrico.100g⁻¹). Isso se deve ao fato de que os ácidos orgânicos estão mais presentes nas polpas dos frutos. Alguns trabalhos caracterizaram os frutos de acerola *in natura* e encontraram valores médios de ATT em % de ácido málico entre 0,50 e 1,65^{19,20}, sendo estes bastante inferiores ao obtido para a farinha em estudo (8,51% de ácido málico), pois o processo de secagem pelo qual os resíduos foram submetidos resulta na concentração dos ácidos orgânicos.

A análise de sólidos solúveis totais da farinha indicou um teor médio de 47,5 °Brix, enquanto Soares et al¹⁸ apresentaram um valor para sólidos solúveis totais igual a 62,30°Brix para a polpa de acerola em pó.

O percentual de açúcares redutores totais encontrado, referente ao conteúdo especificamente expresso em glicose, ficou em torno de 24,33%, bem abaixo do valor expresso por Soares et al¹⁸ (43,22%) em seu estudo sobre a polpa de acerola em pó, já que a maior concentração de açúcares está presente nas polpas dos frutos.

A determinação do teor proteico da farinha de resíduos de acerola resultou no valor médio de 8,88 g.100g⁻¹. Lousada et al²¹, ao caracterizar o farelo de acerola desidratada, encontraram um teor proteico equivalente a 10,54 g.100g⁻¹. Por sua vez, Soares et al¹⁸ obtiveram valores de 1,27 g.100g⁻¹ para a polpa de acerola e 7,77 g.100g⁻¹ para a polpa de acerola em pó.

A análise de lipídeos totais da farinha em estudo indicou valor de 0,52 g.100g⁻¹, sendo este considerado muito baixo e, de acordo com estudos semelhantes com outros frutos, como o de Fasolin et al²², que apresentaram valor médio de 1,89% de lipídios para a farinha de banana verde, e Santana e Silva²³, que encontraram teor lipídico em torno de 0,67% para a farinha proveniente da casca do maracujá.

A farinha de resíduos de acerola apresentou 8,09 µg.g⁻¹ de carotenoides totais, valor superior ao apresentado para a fruta *in natura* por De Rosso e Mercadante²⁴ que, estudando a composição de carotenoides de dois genótipos brasileiros de acerola, obtiveram o valor médio de 3,71 µg.g⁻¹ de carotenoides totais.

O teor de ácido ascórbico determinado para a farinha de resíduos de acerola foi de 9549,61 mg.100g⁻¹, valor esse superior ao apresentado por De Rosso e Mercadante²⁵ (1921,00 mg.100g⁻¹), Batista et al²⁶ (1650,56 mg.100g⁻¹) e Yamashita et al²⁷ (1511,00 mg.100g⁻¹) para a polpa de acerola. Devido a essa característica, a farinha de resíduos de acerola pode se tornar de grande interesse nutricional. O ácido ascórbico desempenha várias funções biológicas

relacionadas ao sistema imune, formação de colágeno, absorção de ferro, inibição da formação de nitrosaminas e atividade antioxidante²⁸. No Brasil, a ingestão diária recomendada (IDR) de vitamina C para crianças de 4 a 10 anos é de 45 mg e para adultos é de 60 mg²⁹.

Pesquisas vêm comprovando os benefícios da acerola para a saúde humana, através da observação de que o consumo de suco de acerola (500 mg de vitamina C), durante 20 dias, foi satisfatório para a normalização dos níveis séricos de vitamina C em idosos³⁰, aumento significativo nos níveis séricos médios de vitamina C e de hemoglobina em crianças com anemia, suplementadas com suco de acerola, sugerindo-se, assim, a inclusão da acerola em programas de alimentação para populações de alto risco para a anemia³¹. Diante dos resultados da sua caracterização, a farinha de resíduos do processamento da polpa de acerola se apresenta como uma ótima alternativa para o enriquecimento de produtos a fim de suplementar a alimentação de comunidades carentes.

Aceitação sensorial dos *cookies*

A avaliação dos escores médios obtidos na análise sensorial (Tabela 3) demonstrou que, em relação aos parâmetros aparência, aroma e sabor, todas as formulações de biscoito diferiram significativamente entre si ($p \leq 0,05$), sendo que o biscoito Tipo II foi o menos apreciado entre os provadores. Em relação ao parâmetro aparência, observa-se que as notas atribuídas foram significativamente menores com o aumento da concentração da farinha de resíduo de acerola, isso pode ter ocorrido pela variação na cor dos *cookies* conforme Figura 1.



Figura 1. Aparência dos *cookies* elaborados com diferentes formulações de farinha e resíduos de acerola: (A) Padrão -0%, (B) Tipo I -10% e (C) Tipo II - 20%

Para o sabor, o caráter ácido da farinha foi indicado como diferencial, embora a maior concentração na formulação Tipo II tenha sido apontada como aspecto negativo. O atributo textura foi o que apresentou as menores notas na escala hedônica de avaliação, indicando que todas as amostras não foram bem aceitas pelos provadores, com notas cujos julgamentos se encontravam na escala de aceitação entre “desgostei ligeiramente” (nota 4) e “nem gostei nem desgostei” (nota 5). Para esse atributo, as amostras Padrão e Tipo II apresentaram diferença significativa entre si ($p \leq 0,05$), não diferindo em relação ao biscoito Tipo I. As notas baixas dadas a esse parâmetro podem ser atribuídas à quantidade insuficiente de água colocada no preparo da massa dos biscoitos, pois o método padrão 10-50D da AACC⁹ é aplicado a qualquer farinha, e não leva em consideração as características físico-químicas da amostra, influenciando diretamente na textura do produto.

Tabela 3. Aceitabilidade dos *cookies* elaborados com diferentes formulações de farinha de resíduos de acerola: (A) Padrão - 0%, (B) Tipo I - 10% e (C) Tipo II - 20%

PARÂMETROS	ESCORES MÉDIOS*			
	PADRÃO	TIPO I	TIPO II	DMS**
Aparência	7,00 ± 1,37 ^a	5,60 ± 1,29 ^b	4,46 ± 1,49 ^c	0,874
Aroma	6,68 ± 1,17 ^a	5,38 ± 1,38 ^b	4,16 ± 1,71 ^c	0,854
Sabor	6,76 ± 1,45 ^a	5,28 ± 1,57 ^b	3,56 ± 1,66 ^c	0,894
Textura	5,20 ± 1,53 ^a	4,92 ± 1,56 ^{ab}	4,18 ± 1,82 ^b	1,014
Impressão global	6,62 ± 1,28 ^a	5,34 ± 1,75 ^b	4,14 ± 1,72 ^c	0,826

*Média ± Desvio Padrão. Escores: 1 = desgostei muitíssimo, ...5 = nem gostei, nem desgostei, ...9 = gostei muitíssimo. Médias seguidas da mesma letra em cada linha não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; **Diferença mínima significativa

A incorporação de farinha de resíduos de acerola promoveu uma menor aceitação dos biscoitos em comparação a formulação padrão, principalmente pela mudança de cor e presença de grânulos verificadas pelos provadores. No entanto, os resultados demonstraram que o *cookie* formulado com 10% de farinha de resíduos de acerola foi o mais aceito entre as duas formulações propostas com incorporação dessa farinha, pois obteve escores médios acima de 5,0 (“nem gostei, nem desgostei”).

De acordo com Santucci et al³², a mistura de farinhas de produtos não convencionais com a farinha de trigo melhora a qualidade nutricional de biscoitos e pode até melhorar sua palatabilidade tornando-o mais aceito pelos consumidores. E por ser um produto de baixo custo, pode facilmente ser consumido pelas classes sociais menos privilegiadas.

Em relação à intenção de compra para o biscoito Tipo I, 4% dos provadores indicaram interesse em comprar o produto, enquanto 16% demonstraram rejeição ao mesmo e 32% dos provadores apresentaram dúvida entre comprar ou não o *cookie* formulado com 10% de farinha de resíduos de acerola.

O *cookie* Tipo II, por sua vez, foi o que apresentou a maior rejeição entre as três formulações, pois 44% dos provadores indicaram certeza em não comprar, em decorrência da alta acidez e da cor escura que apresentava o produto.

Caracterização físico-química dos *cookies*

A caracterização físico-química dos *cookies* foi realizada para as formulações padrão e Tipo I (formulação mais aceita com substituição parcial de farinha de resíduos de acerola). Os resultados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 . Caracterização físico-química dos biscoitos tipo *cookie* padrão e Tipo I

PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS	VALORES*	
	PADRÃO	TIPO I
Umidade (g.100g ⁻¹)	2,82 ± 0,16 ^a	3,07 ± 0,03 ^a
Proteína Bruta (g.100g ⁻¹)	7,21 ± 0,47 ^a	6,78 ± 0,42 ^a
Lipídeos (g.100g ⁻¹)	11,68 ± 0,68 ^a	10,40 ± 0,75 ^a
Cinzas (g.100g ⁻¹)	1,43 ± 0,21 ^a	1,88 ± 0,28 ^b
Açúcares Redutores (g de glicose.100g ⁻¹)	1,27 ± 0,03 ^a	6,10 ± 0,82 ^b
pH	7,74 ± 0,01 ^b	4,93 ± 0,03 ^a
ATT (g de ácido málico.100g ⁻¹)	0,04 ± 0,14 ^a	0,52 ± 0,20 ^b
ATT (g de ácido cítrico.100g ⁻¹)	0,03 ± 0,12 ^a	0,50 ± 0,19 ^b
Carotenoides totais (µg.g ⁻¹)	n.d.	1,51 ± 0,07
Vitamina C (mg ácido ascórbico.100g ⁻¹)	n.d.	2172,60 ± 19,47

n.d. = não detectado

*Em base úmida. Média de triplicata ± desvio padrão. Médias seguidas da mesma letra em cada linha não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Os resultados de umidade, lipídeos e proteínas, quando analisados estatisticamente, não diferiram significativamente entre si ($p > 0,05$) para os biscoitos padrão e Tipo I. No entanto, o teor de cinzas do biscoito Tipo I foi significativamente ($p \leq 0,05$) superior ao da formulação padrão, o que demonstra uma maior concentração de minerais na amostra com 10% de farinha de resíduos de acerola.

Diversos estudos foram realizados com a finalidade de incorporar farinhas de resíduos de frutas na elaboração de biscoitos tipo *cookies* e caracterizar físico-quimicamente os produtos obtidos. Santana e Silva²³ determinaram 1,1 g.100g⁻¹ de umidade e 1,2 g.100g⁻¹ de cinzas para o biscoito elaborado com a farinha de albedo de maracujá. Em geral, os biscoitos produzidos na indústria apresentam umidade residual na faixa de 3 a 4%³³. Os teores de cinzas encontrados para os *cookies* em estudo estavam ainda de acordo com a legislação brasileira de alimentos e bebidas, cujo teor máximo de cinzas permitido em biscoitos é 4,0%³⁴.

O biscoito padrão apresentou um teor de proteínas semelhante ao encontrado por Fasolin et al²² (7,61 g.100g⁻¹), que utilizou a mesma formulação proposta pela AACCC. O teor proteico de 6,78 g.100g⁻¹ encontrado para o *cookie* Tipo I é superior ao valor encontrado por Santana e Silva²³ para o biscoito com farinha de albedo de maracujá, 4,97 g.100g⁻¹.

O caráter ácido da farinha de resíduos de acerola (pH 3,32) agregou essa mesma característica aos biscoitos com formulação Tipo I (pH 4,93), enquanto que para os biscoitos formulados sem incorporação da farinha de resíduos de acerola, foi verificado pH de 7,74.

A quantidade de açúcares redutores do *cookie* elaborado com farinha de resíduos de acerola, 6,10%, é 4 vezes maior que o obtido por Fasolin et al²² para todas as formulações de incorporação de biscoitos com farinha de banana verde, que apresentaram entre 1,28 e 1,48% desse tipo de açúcar.

Considerando-se as análises de acidez dos biscoitos Tipo I, para os teores de ATT em ácido málico e ácido cítrico, percebe-se que há grande redução em seus valores comparando-os aos resultados obtidos para a farinha de resíduos de acerola (8,51g de ácido málico.100g⁻¹ e 8,13g de ácido cítrico.100g⁻¹).

O teor de carotenoides totais no biscoito Tipo I foi igual a 1,51µg.g⁻¹, enquanto que na formulação padrão esses não foram detectados. Na formulação padrão também não foi detectado ácido ascórbico e observando o teor médio desse componente no biscoito Tipo I (2172,60 mg.100g⁻¹), verifica-se que a incorporação de 10% da farinha de resíduos de acerola proporcionou um

enriquecimento no valor nutritivo do produto, sendo ainda esse valor relativamente alto quando comparado a outros subprodutos da acerola, como polpa e suco.

A substituição de 10% da farinha de trigo pela farinha de resíduos de acerola na elaboração dos biscoitos tipo *cookies*, mesmo sendo baixa, agregou valor ao produto final, considerando suas características físico-químicas, quando comparadas à formulação padrão, principalmente em relação ao teor de ácido ascórbico.

CONCLUSÃO

Considerando-se a elevada produção de resíduos provenientes do processamento de polpa de acerola e sua qualidade nutricional, principalmente seu elevado teor de ácido ascórbico, a farinha desses resíduos se apresenta como uma ótima alternativa de baixo custo para o enriquecimento de produtos alimentícios.

Diante dos resultados, torna-se possível a substituição parcial da farinha de trigo pela farinha de resíduos de acerola na formulação de *cookies*, viabilizando a agregação de valor nutricional. No entanto, sugere-se estudos para melhoramento das formulações, como o ajuste da umidade, a fim de obter produtos com maior aceitação.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Instituto Tecnológico e de Pesquisas do Estado de Sergipe (ITPS-SE) pela colaboração para execução desse trabalho.

REFERÊNCIAS

- Gomes PMA, Figueiredo RMF, Queiroz AJM. Caracterização e isotermas de adsorção de umidade da polpa de acerola em pó. *Rev Bras Prod Agroind*. 2002;4(2):157-65.
- Costa JMC, Felipe EMF, Maia GA, Brasil IM, Hernandez FFH. Comparação dos parâmetros físico-químicos de pós alimentícios obtidos de resíduos de abacaxi. *RCA*. 2007; 38(2): 228-32.
- Salgado SM, Guerra NB, Filho ABM. Polpa de Fruta Congelada: Efeito do Processamento sobre o conteúdo de Fibra Alimentar. *Rev Nutr*. 1999; 12(3): 303-8.
- Garmus TT, Bezerra JRMV, Rigo M, Córdova KRV. Elaboração de biscoitos com adição de farinha de casca de batata (*Solanum tuberosum* L.). *RBTA*. 2009; 3(2): 56-65.
- Santos VS, Machado AR, Araújo PF, Rodrigues, RS. Avaliação sensorial de biscoitos elaborados com resíduo de polpa de amora-preta (*Rubus* spp.). In: Anais do XVII Congresso de Iniciação Científico da UFPEL. Pelotas, RS, 2008.
- Tsen CC. Regular and protein fortified cookies from composite flours. *CFW*. 1976;21(12):634-37.
- James C, Courtney DLD, Lorenz K. Rice bran-soy blends as protein supplements in cookies. *Int J Food Sci Technol*. 1989;24(5):495-502.
- Carvalho RIN, Manica I. Influência de estádios de maturação e condições de armazenamento na conservação da acerola (*Malpighia glabra* L.). *Pesq Agropec Bras*. 1994;29(5):681-8.
- American Association of Cereal Chemists (AACC). *Approved Methods of American Association of Cereal Chemists*. 9th ed. Saint Paul: 1995.
- Peryam DR, Girardot N. Advanced taste - method. *Food Eng*. 1952;24:58-61.
- Meilgaard M, Civille GV, Carr BT. *Sensory evaluation techniques*. 2th ed. Flórida: CRC Press, 1991. 354 p.
- Stone H, Sidel JL. *Sensory evaluation practices*. Flórida: Academic Press, Inc. 1985. 311 p.
- Instituto Adolfo Lutz (São Paulo - Brasil). *Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. 4ª ed. Brasília (DF): ANVISA; 2005.
- Lichtenthaler HK. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in enzymology*. London: Academic Press, 1987:350-81.
- AOAC. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 14th ed. Arlington; 1984.
- Benassi MT, Antunes AJ. A comparison of metaphosphoric and oxalic acids as extractants solutions for the determination of vitamin C in selected vegetables. *Arq Biol Tecnol*. 1988;31(4):507-13.
- Jerônimo CEM, Cezar GM, Júnior AFS, Oliveira VG, Melo HNS. Caracterização dos resíduos das indústrias potiguares de beneficiamento de polpas de frutas. In Anais do VI Simpósio Ítalo Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. Vitória, ES, 2002.
- Soares EC, Oliveira GSF, Maia GAM, Monteiro JCS, Silva Junior A, Filho MSS. Desidratação da polpa de acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) pelo processo "foam-mat". *Ciênc Tecnol Aliment*. 2001;21(2):164-70.
- Matsuura FCAU, Cardoso RL, Folegatti MIS, Oliveira JRP, Oliveira JAB, Santos DB. Avaliações físico-químicas em frutos de diferentes genótipos de acerola (*Malpighia puniceifolia* L.). *Rev Bras Frutic*. 2001;23(3):602-6.
- Brunini MA, Macedo NB, Coelho CV, Siqueira GF. Caracterização física e química de acerolas provenientes de diferentes regiões de cultivo. *Rev Bras Frutic*. 2004;26(3):486-9.
- Lousada Junior JE, Costa JMC, Neiva JNM, Rodriguez NM. Caracterização físico-química de subprodutos obtidos do processamento de frutas tropicais visando seu aproveitamento na alimentação animal. *RCA*. 2006;37(1):70-6.
- Fasolin LH, Almeida GC, Castanho PS, Netto-Oliveira ER. Biscoitos produzidos com farinha de banana: avaliações química, física e sensorial. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2007;27(3):524-9.
- Santana MFS, Silva, EFL. Elaboração de biscoitos com farinha de albedo de maracujá. Comunicado Técnico. 2007; Embrapa.

24. De Rosso VV, Mercadante AZ. Carotenoid composition of two Brazilian genotypes of acerola (*Malpighia punicifolia* L.) from two harvests. *Food Res Int*. 2005;38:1073-7.
25. De Rosso VV, Mercadante AZ. The high ascorbic acid content is the main cause of the low stability of anthocyanin extracts from acerola. *Food Chem*. 2007;103:935-43.
26. Batista MS, Figueirêdo, RME, Queiroz AM. Parâmetros físicos e químicos da acerola (*Malpighia punicifolia* L.) em diferentes fases de maturação. *Rev Bras Prod Agroind*. 2000;2(2):19-24.
27. Yamashita F, Benassi MT, Tonzar AC, Moriya S, Fernandes JG. Produtos de acerola: estudo da estabilidade de vitamina C. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2003;23(1):92-4.
28. Vannuchi H, Jordão Jr. AA. Vitaminas hidrossolúveis. *Ciências nutricionais*. São Paulo: Sarvier, 1998. p.191-208.
29. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria SVS/MS nº 33, de 13 de janeiro de 1998. Tabelas de Ingestão Diária Recomendada IDR. Diário Oficial [da] União. Brasília, DF, 16 jan. 1998. Seção 1, nº11-E, p.5.
30. Aranha FQ, Moura LSA, Simões MOS, Barros ZF, Quirino IVL, Metri JC et al. Normalização dos níveis séricos de ácido ascórbico por suplementação com suco de acerola (*Malpighia glabra* L.) ou farmacológica em idosos institucionalizados. *Rev Nutr*. 2004;17(3):309-17.
31. Costa MJC, Terto ALQ, Santos LMP, Rivera MAA, Moura LSA. Efeito da Suplementação com acerola nos níveis sanguíneos de vitamina C e de hemoglobina em crianças pré-escolares. *Rev Nutr*. 2001;14(1):13-20.
32. Santucci MCC, Alvim ID, Faria EV, Sgarbieri VC. Efeito do enriquecimento de biscoitos tipo água e sal com extrato de levedura (*Saccharomyces* sp.). *Ciênc Tecnol Aliment*. 2003;23(3):441-6.
33. Vitti P, Garcia EEC, Oliveira LM. Tecnologia de biscoito - Manual Técnico. Campinas (SP); ITAL: 1988.
34. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução CNNPA nº12, de março de 1978. Aprova o regulamento técnico para biscoitos e bolachas. Diário Oficial [da] União, Brasília, DF, 24 jul. 1978. Seção 1, p.11499.

Polpa de açaí congelada: características nutricionais, físico-químicas, microscópicas e avaliação da rotulagem

Frozen açai pulp. Study on the nutritional and physical-chemical characteristics, and microscopic and product labelling analyses

RIALA6/1304

Brisa Maria FREGONESI^{1*}, Cristina Eico YOKOSAWA¹, Isaura Akemi OKADA¹, Gisele MASSAFERA², Telma Maria BRAGA COSTA², Sonia de Paula Toledo PRADO¹

¹Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas/Centro de Laboratório Regional do Instituto Adolfo Lutz – CLR-IAL de Ribeirão Preto – VI, Rua Minas, 877 - CEP 14085-410 - Ribeirão Preto/SP

²Laboratório de Análise e Tecnologia de Alimentos – Universidade de Ribeirão Preto-UNAERP - Avenida Costabile Romano, 2.201, Ribeirânia - CEP 14.096.900 - Ribeirão Preto/SP

*Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz – CLR-IAL de Ribeirão Preto - VI - Rua Minas, 877 - Campos Elíseos - CEP 14.085-410, Ribeirão Preto/SP, Brasil, Fax: (16) 3635-7994, Fone: (16) 3625-5046, Ramal 214, e-mail: brisa_fregonesi@yahoo.com.br

Recebido: 22.04.2010 – Aceito para publicação: 10.08.2010

RESUMO

As polpas de açaí congeladas comercializadas no município de Ribeirão Preto/SP foram avaliadas quanto às características nutricionais, físico-químicas, microscópicas e a rotulagem do produto. Os parâmetros físico-químicos como umidade, sólidos totais, cinzas, acidez, proteínas, lipídios, carboidratos, calorias e fibras foram analisados em 30 amostras de polpa de açaí integral, açaí tipo B e açaí tipo C. Os valores obtidos foram comparados com os da legislação e analisados pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). A pesquisa de sujidades leves foi realizada seguindo-se a metodologia da AOAC. A informação nutricional descrita no rótulo do produto foi avaliada baseando-se nas legislações em vigor. Os três tipos de polpas analisados não apresentaram diferenças estatisticamente significantes em todos os parâmetros físico-químicos. Na análise microscópica, 50% das amostras apresentaram sujidades como fragmentos de insetos, ácaros, cristais de areia e pelo humano, que indicam a existência de falhas na adoção e/ou manutenção das Boas Práticas de Fabricação. Além disso, 3,33% das amostras foram consideradas impróprias para consumo pela presença de pelo de roedor, matéria estranha prejudicial à saúde humana. Irregularidades nas informações contidas nos rótulos dos produtos indicam a necessidade de melhor adequação quanto às normas gerais de rotulagem por parte dos fabricantes. **Palavras-chave.** polpa de açaí, qualidade, rotulagem, legislação.

ABSTRACT

The nutritional, physical-chemical, microscopic characteristics and product description on package label of frozen açai (*Euterpe oleracea* Mart) pulp were assessed. Thirty samples of the whole açai pulp, açai type B and açai type C marketed in the municipality of Ribeirão Preto/SP were analyzed on physical-chemical parameters as moisture, total solids, ash, acidity, proteins, lipids, carbohydrates, calories and fibers. The found contents were compared with the legislation and analyzed by the Kruskal-Wallis test ($p < 0.05$). Light filth presence was investigated following the methodology recommended by AOAC. The nutrients described on the product labels were evaluated based on the legislations in force. No statistically significant differences among the three types of açai pulp were found on all of the analyzed physical-chemical parameters. By microscopic analysis filth as insect fragments, mites, sand crystals and human hair were found in 50% of the samples, which indicated a failure in performing the Good Manufacturing Practices; and 3.33% of samples were found to be unsuitable for consumption due to the presence of rodent hair, extraneous material harmful to human health. Some label information on the products were at variance with the food labeling regulations.

Key words. açai pulp, quality, label information, legislation.

INTRODUÇÃO

O açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) é uma palmeira típica da região Norte do Brasil, situando-se no estado do Pará as maiores reservas. Adaptada às condições elevadas de temperatura, precipitação pluviométrica e umidade relativa do ar, vegeta em terrenos de várzeas, igapós e terra firme¹.

Os nativos extraem a polpa dos frutos que são consumidas pura ou acompanhada com farinha de mandioca, tapioca, peixe frito ou camarão. São ainda utilizadas na fabricação de sucos, sorvetes, doces, geleias, vinho de açaí, entre outros, podendo ser aproveitadas, também, para a extração de corantes e antocianina². Nas regiões produtoras, a polpa normalmente é consumida imediatamente após extração, por ser um produto altamente perecível e de fácil deterioração à temperatura ambiente. Quando se destina aos comércios distantes, a polpa de açaí é congelada, podendo também ser pasteurizada³, o que provoca perdas nutricionais importantes⁴.

O consumo da polpa do fruto encontra-se em franca expansão não somente na região Norte, mas também na região Nordeste e vários outros estados como São Paulo, Rio de Janeiro, Goiás e Brasília, além do mercado externo através das exportações. O mercado consumidor busca cada vez mais produtos naturais tendo em vista suas características organolépticas e nutritivas, como fonte de substâncias benéficas ao organismo, reduzindo riscos de doenças cardíacas e preocupações com níveis elevados de colesterol. A polpa concentrada de açaí é um alimento altamente energético e saudável, sendo fonte de fibras, proteínas, vitamina E, minerais e ácidos graxos essenciais como Ômega-6 e Ômega-9, além de possuírem um alto teor de antocianinas presentes em sua composição. Antocianinas são flavonoides responsáveis pela coloração característica do fruto, que apresenta um elevado poder antioxidante^{1,5,6}, além de diversas propriedades, incluindo efeitos antibacteriano, antiviral, anti-inflamatório, antialérgico, antitrombótico, vasodilatador, e ainda agem como antimutagênico e anticarcinogênico⁷.

Existem dois períodos de produção de açaí que se caracterizam por produzirem frutos de qualidades diferentes. A safra de inverno é aquela cujo período é o primeiro semestre do ano (estação das chuvas), época em que os cachos apresentam frutos de maturação não uniforme, além de produzir um açaí com paladar diferente do normal⁸. Já a safra de verão (estação mais seca) é aquela cuja produção gira em torno do segundo semestre e se

caracteriza por apresentar frutos com maturação uniforme e de melhor paladar. É quando a bebida se apresenta com melhor qualidade e rendimento^{8,9}.

A Instrução Normativa nº 01, de 07 de janeiro de 2000, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)¹⁰, estabelece os padrões de identidade e qualidade para polpas de frutas. A polpa de açaí processada é classificada de acordo com o teor de sólidos totais e a adição ou não de água. Segundo a legislação vigente, a polpa de açaí integral é a polpa extraída sem adição de água e deve apresentar de 40 a 60% de sólidos totais. Os açaís tipo A (especial), B (médio) e C (popular) devem ser extraídos com adição de água e filtração e apresentar, respectivamente, acima de 14%, de 11 a 14% e de 8 a 11% de sólidos totais.

Assim como outras espécies vegetais, o açazeiro pode ser atacado por pragas desde a fase de sementeira até o plantio adulto, o que vem causando muitos prejuízos às plantações. Além das pragas no campo, as polpas de açaí também estão sujeitas às contaminações por matérias estranhas durante as etapas do processamento do fruto. A presença de insetos e seus fragmentos, ácaros, ovos e larvas, como também areia, terra, partículas carbonizadas, entre outras, no produto final indicam falhas na adoção e/ou manutenção das Boas Práticas de Fabricação¹¹. Ainda, de acordo com a Resolução RDC nº 175/2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)/MS¹², os produtos que apresentam matéria prejudicial à saúde humana são considerados impróprios para o consumo por causarem agravos à saúde do consumidor.

Outro aspecto importante a ser considerado e que merece grande atenção das autoridades sanitárias e órgãos fiscalizadores é o fato do açaí ser uma das possíveis causas de contaminação por via oral da Doença de Chagas Aguda (DCA). No ano de 2006, a forma oral foi identificada como de potencial risco para a Saúde Pública, houve a confirmação de 115 casos de DCA, na região Norte e Nordeste, sendo 94 casos de transmissão via oral, devido ao consumo na maioria dos casos de açaí contaminado. De janeiro a outubro de 2007, foram notificados 100 casos de DCA, com 4 óbitos relacionados a surtos ocorridos em 11 municípios da região norte e 12 casos isolados, sendo que o açaí foi o alimento mais frequentemente envolvido¹³.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivos verificar a características nutricionais, físico-químicas e microscópicas, bem como avaliar os dizeres de rotulagem de polpas de açaí congeladas comercializadas no município de Ribeirão Preto/SP, principalmente

devido à escassez de estudos relacionados ao tema, além de poder contribuir para a implementação de medidas de vigilância sanitária, auxiliando na prevenção de doenças e na padronização da qualidade desses produtos.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Foram analisadas 30 amostras congeladas de polpa de açaí de diferentes tipos, sendo 10 integrais (polpa de açaí), 17 açaí médio (Tipo B) e 3 açaí fino (Tipo C), de diferentes marcas existentes no mercado, sendo que para amostras da mesma marca, os lotes e prazos de validade foram distintos. Amostras de açaí tipo A não foram utilizadas no presente estudo, uma vez que não foram encontradas no comércio. As amostras foram adquiridas aleatoriamente no período de fevereiro a outubro de 2009, em supermercados e lanchonetes de Ribeirão Preto, e transportadas ao laboratório em caixas isotérmicas e mantidas sob refrigeração até o início das análises. Considerou-se como unidade amostral 100 gramas de cada polpa. Os procedimentos analíticos foram realizados nos Laboratórios de Análises Físico-Químicas e Microscopia de Alimentos do Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto e no Laboratório de Análises e Tecnologia de Alimentos do Curso de Nutrição da UNAERP – Universidade de Ribeirão Preto. As análises foram realizadas em duplicata.

Métodos

Análises físico-químicas

As determinações de proteínas, carboidratos totais, lipídeos, acidez total, umidade, sólidos totais e cinzas foram realizadas segundo Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos¹⁴. A determinação de calorias totais foi efetivada através de um calorímetro da marca IKA[®] Werke, segundo recomendações do manual do aparelho. A determinação de fibras foi feita utilizando o método descrito por Carvalho et al¹⁵.

Os valores encontrados foram comparados com os parâmetros existentes descritos na Instrução Normativa nº 01, de 07 de janeiro de 2000, do MAPA¹⁰. Foram ainda avaliados os dizeres da rotulagem em comparação com o valor real, adotando como base a RDC nº 360/03¹⁶, que determina os limites de tolerância de 20% acima ou abaixo do declarado no rótulo.

Análise microscópica

Foram pesquisadas as sujidades leves pelo método nº 950.89 a, 18^a ed., descrito pela *Association of*

*Official Analytical Chemists (AOAC)*¹⁷. As análises foram realizadas em duplicata e os resultados expressos como a média aritmética das duas determinações.

Avaliação dos dizeres da rotulagem

Foram determinadas as proporções de não conformidade com as legislações pertinentes para rotulagem utilizando as Resoluções RDC nº 259/02¹⁸, RDC nº 359/03¹⁹ e 360/03¹⁶ da ANVISA/MS, Lei Federal nº 10.674/03²⁰ e Portaria nº 157/02 do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO)²¹.

Análise estatística

Para cada variável físico-química, determinou-se a mediana, valor mínimo e máximo. A comparação dos três tipos de polpa (polpa de açaí integral, açaí tipo B e açaí tipo C) foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis²². Adotou-se o nível de significância de $\alpha = 0,05$. Foram determinadas as proporções de não conformidade com a legislação em vigor para os parâmetros físico-químicos existentes e para a análise microscópica com os correspondentes intervalos de 95% de confiança.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análises físico-químicas

Umidade e sólidos totais

Do total de amostras analisadas, 63,33% estavam em desacordo com a legislação em vigor, quanto ao teor de sólidos totais e umidade, cujos limites de confiança de 95% foram iguais a 46,10% e 80,50%.

Sabe-se que a legislação se baseia no teor de sólidos totais para diferenciação dos tipos de polpas de açaí. Das polpas de açaí (integral) analisadas, todas se encontraram fora dos parâmetros estabelecidos e seus valores variaram de 5,92% a 17,80% de sólidos. Estes valores são semelhantes aos encontrados em polpas de açaí (integral) congeladas comercializadas na região de São Carlos – SP avaliadas por Eto et al²³. Para açaí tipo B, 52,94% das amostras se apresentaram em desacordo com a legislação e seus valores variaram de 7,11% a 13,40% de sólidos. Já para o açaí tipo C, todas as amostras estavam em conformidade com a legislação e seus valores variaram de 9,70% a 10,70%. A oscilação no teor de sólidos ocorrida nesse estudo pode ter sido ocasionada pela variação na quantidade de água utilizada na extração na polpa.

De acordo com os resultados de significância expostos na Tabela 1 ($p=0,98$), nota-se que não houve

diferenças estatisticamente significantes nos valores de sólidos totais e umidade entre os três tipos de polpas analisadas (polpa de açaí integral, açaí tipo B e açaí tipo C), o que sugere que o produto não está sendo produzido de modo a atender os requisitos estabelecidos na legislação.

Cinzas

Não há parâmetros na legislação para as cinzas, porém sua análise é relevante, uma vez que expressa o teor de substâncias inorgânicas (minerais) presentes na amostra. Para a polpa de açaí (integral), os valores de cinzas variaram de 0,15% a 0,43%. Para o açaí tipo B, os valores encontrados foram de 0,16% a 0,39% e para o tipo C, a variação foi de 0,17% a 0,30%. Nascimento et al²⁴ avaliaram a composição de açaí médio (tipo B) e verificaram valores de 0,41% de cinzas, caracterizando um valor mais alto do que o encontrado no presente estudo.

Como pode ser observado na Tabela 1, o valor de significância para este parâmetro foi de 0,42, o que revela que não houve diferença estatisticamente significativa entre os três tipos de polpas de açaí (integral, açaí tipo B e açaí tipo C).

Acidez titulável em ácido orgânico

A acidez é expressa em gramas de ácido cítrico para cada 100g de amostra (%). A polpa de açaí (integral) não possui parâmetro na legislação em vigor no que se refere à acidez. O açaí tipo B e o açaí tipo C possuem valores máximos de referência que são de 0,4 e 0,27, respectivamente. Dentre as amostras analisadas destas categorias, 25% estavam em desacordo, ultrapassando os limites estabelecidos. Na população, pode-se afirmar com 95% de confiança que a porcentagem de não conformidade está entre 6% e 44%. Ao observar a Tabela 1, nota-se que para acidez não houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,11$) entre os três tipos de polpas de açaí.

Proteínas

Os valores de proteínas encontrados nas 30 amostras apresentaram 100% de conformidade com a legislação em vigor, que estabelece um valor mínimo de 5g.100gms⁻¹ para polpas de açaí (integral) e de 6g.100gms⁻¹ para açaí tipo B e tipo C. Os resultados variaram de 6,21g.100gms⁻¹ a 9,98g.100gms⁻¹ para polpa de açaí (integral); de 8,01g.100gms⁻¹ a 10,67g.100gms⁻¹ para açaí tipo B e de 8,81g.100gms⁻¹ a 8,89 g.100gms⁻¹ para açaí tipo C.

De acordo com o resultado de significância expresso na Tabela 1 ($p = 0,58$), não houve diferenças

estatisticamente significantes nos valores de proteínas entre os três tipos de polpas de açaí analisadas o que mostra que o produto não está sendo produzido de modo a atender os requisitos estabelecidos na legislação. Vaz²⁵ analisou polpas de açaí congeladas comercializadas na região metropolitana de Recife - PE e encontrou valores de proteínas variando de 6,06g.100gms⁻¹ a 10,91g.100gms⁻¹, observando que são semelhantes aos encontrados no presente estudo.

A quantidade de proteína expressa no rótulo do produto é dada em gramas para cada 100 gramas da amostra. Das 30 amostras analisadas, 70% estavam em desacordo com a RDC nº 360/03¹⁶. Das polpas de açaí (integral) todas estavam em desacordo com seu rótulo, enquanto que para açaí tipo B esta não conformidade foi de 47% e para açaí tipo C foi de 100%.

Lipídios

Os teores de lipídios encontrados nas amostras foram de 24,75g.100gms⁻¹ a 85,38g.100gms⁻¹ para polpas de açaí (integral), de 27,47g.100gms⁻¹ a 58,54g.100gms⁻¹ para açaí tipo B e de 35,19 g.100gms⁻¹ a 56,60 g.100gms⁻¹ para açaí tipo C. Houve uma ampla variação dos teores de lipídios, fato que pode ter sido influenciado pelas diferentes épocas de colheita do fruto que comprovadamente interfere na composição centesimal do produto⁹. Cabe inferir que as polpas analisadas neste trabalho podem também ter sido advindas de frutos com diferentes estágios de maturação, bem como ter sido realizada a adição de diferentes volumes de água no processo de extração da polpa, fatores que podem influenciar na composição centesimal do produto.

Os valores de lipídios estão em 100% de conformidade com a legislação em vigor, que estabelece um valor mínimo de 20 g.100gms⁻¹ para polpas de açaí (integral) e limites de 20 a 60g.100gms⁻¹ para açaí tipo B e tipo C. Nota-se, ainda, que não houve diferenças estatisticamente significantes entre os resultados de lipídios dos diferentes tipos de polpas de açaí, o que reforça que o produto não está sendo produzido de modo a atender os requisitos estabelecidos na legislação.

Ao verificar os valores encontrados de lipídios com os declarados no rótulo, adotando como base a RDC nº 360/03¹⁶, para cada 100g da amostra, 83,33% do total de amostras estavam em desacordo com seu rótulo, ultrapassando os limites de tolerância de 20% acima ou 20% abaixo do valor declarado. Das polpas de açaí integral, todas estavam em desacordo com o declarado

pelo fabricante, enquanto que para açaí tipo B esta não conformidade foi de 70,58% e para açaí tipo C de 100%.

Fibras

Os valores encontrados referentes às fibras foram dados para cada 100g de amostra e foram comparados com os valores que estavam descritos nos rótulos levando em conta a RDC nº 360/03¹⁶. Do total de amostras analisadas, 83,33% apresentaram valores divergentes daqueles declarados e fora dos limites de tolerância. Todas as polpas de açaí (integral) estavam em desacordo com seu rótulo, enquanto que, para açaí tipo B, esta não conformidade foi de 76,47% e, para açaí tipo C, de 66,67%.

A polpa do fruto açaí possui valores elevados de fibras se comparado com as polpas de outros frutos, como o maracujá (0,5g. 100⁻¹), caju (0,8g.100⁻¹), manga (1,1g. 100⁻¹), graviola (1,2g.100⁻¹) e cupuaçu (1,6g. 100⁻¹)²⁶. Embora os resultados encontrados no presente estudo tenham sido variados, 70% das amostras apresentaram teores de fibras maiores que o valor dado para polpa de cupuaçu. A fibra é considerada um alimento funcional, uma vez que apresenta funções importantes no organismo auxiliando no funcionamento do intestino, além de intervir no metabolismo de lipídios, influenciando na redução do colesterol, ajudando a retardar a absorção de nutrientes como os açúcares e promover a sensação de saciedade²⁷.

Para os valores de fibras, não houve diferenças estatisticamente significantes ($p=0,37$) entre os tipos de polpas de açaí.

Carboidratos

A legislação estabelece um valor mínimo de 51g.100gms⁻¹ de carboidratos somente para polpa de açaí (integral). Das 10 amostras analisadas deste tipo, todas estavam em desacordo com a legislação em vigor. No que diz respeito à análise comparativa entre o valor real e o declarado na rotulagem, 96,67% das amostras estavam em desacordo, segundo a RDC nº 360/03¹⁶. Todas as polpas de açaí (integral) e 94,11% das amostras de açaí tipo B estavam em desacordo com seu rótulo. Com relação às amostras de açaí tipo C, todas se encontraram fora do limite de tolerância de 20%.

Os resultados apresentaram grandes oscilações de valores, o que pode ser devido à variação na quantidade de água utilizada no processo de extração, ao estágio de maturação dos frutos utilizados na produção da polpa congelada⁶ e/ou à época de colheita do fruto que pode alterar a sua composição centesimal. Sanabria e Sangronis⁹ realizaram um trabalho com açaí em

diferentes épocas de colheitas e encontraram variações significativas de valores da composição centesimal do produto. Os resultados para a primeira e segunda colheita foram respectivamente de 49,4 g.100gms⁻¹ e 33,1 g.100gms⁻¹ de lipídios; 13,8 g.100gms⁻¹ e 15,9 g.100gms⁻¹ de proteínas; 5,2 g.100gms⁻¹ e 2,2 g.100gms⁻¹ de cinzas e 30,9 g.100gms⁻¹ e 20,0 g.100gms⁻¹ de fibra. Desta forma, mostrou que a sazonalidade é uma grande fonte de variação na composição centesimal do açaí.

Não houve diferenças estatisticamente significantes nos resultados de carboidratos ($p=0,69$) entre os três tipos de polpas de açaí.

Calorias

Para análise de calorias, foi comparado o valor obtido nas análises com aqueles expressos nos rótulos, de acordo com a RDC nº 360/03¹⁶. Do total de amostras analisadas, 86,67% mostraram valores que não condiziam com o declarado pelo fabricante e fora do limite de tolerância de 20%, como exige a legislação. Para polpa de açaí (integral) todas as amostras encontraram valores abaixo do limite de 20% de tolerância do declarado no rótulo. Para açaí tipo B, 76,47% das amostras estavam em desacordo com seu rótulo. Para amostras de açaí tipo C, todas apresentaram resultados que estavam abaixo do limite de tolerância.

Os valores de calorias encontrados para cada 100g de polpa comercializada foram de 37,8Kcal a 93,8Kcal para polpa de açaí (integral); de 34Kcal a 77,9Kcal para açaí tipo B; de 56,9Kcal a 58,6Kcal para açaí tipo C. Os valores encontrados na literatura são muito diversificados. Os resultados do presente estudo foram semelhantes aos encontrados por Yuyama et al apud Vaz²⁵, que obtiveram de 31Kcal a 83 kcal em frutos de açaí de diferentes ecossistemas amazônicos. Diferentemente do valor encontrado por Franco apud Vaz²⁵, que foi de 182,4Kcal. Os teores de calorias foram discrepantes de uma amostra em relação à outra. Este fato pode ter sido ocasionado tanto pela variabilidade genética dos frutos²⁸ quanto pela quantidade de água adicionada no processo de extração da polpa.

Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os resultados de calorias ($p=0,94$) entre os tipos de polpas de açaí estudados, sugerindo a ocorrência de adição de água. No entanto, existem outros fatores que podem interferir na composição centesimal do produto, como a época de colheita e o estágio de maturação dos frutos utilizados para fabricação da polpa.

Tabela 1. Valores da mediana, mínimo e máximo dos parâmetros físico-químicos para os diferentes tipos de polpa de açaí (integral, açaí tipo B e açaí tipo C)

Variável	Tipo	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor de p*
Umidade (%)					0,98
	Açaí tipo B	89,90	86,60	92,89	
	Integral	89,50	82,20	94,08	
	Açaí tipo C	90,01	89,30	90,30	
Sólidos Totais (%)					0,98
	Açaí tipo B	10,10	7,11	13,40	
	Integral	10,51	5,92	17,80	
	Açaí tipo C	9,98	9,70	10,70	
Cinzas (%)					0,42
	Açaí tipo B	0,28	0,16	0,39	
	Integral	0,24	0,15	0,43	
	Açaí tipo C	0,30	0,17	0,30	
Acidez					0,11
	Açaí tipo B	0,22	0,11	0,52	
	Integral	0,14	0,09	0,32	
	Açaí tipo C	0,18	0,16	0,21	
Lipídios (g.100gms ⁻¹)					0,17
	Açaí tipo B	45,70	27,47	58,54	
	Integral	50,77	24,75	85,38	
	Açaí tipo C	36,47	35,19	56,60	
Proteínas (g.100gms ⁻¹)					0,58
	Açaí tipo B	8,58	8,01	10,67	
	Integral	8,48	6,21	9,98	
	Açaí tipo C	8,84	8,81	8,89	
Fibras (g.100g ⁻¹)					0,37
	Açaí tipo B	2,09	0,69	4,57	
	Integral	1,75	0,28	3,41	
	Açaí tipo C	1,68	1,33	2,03	
Carboidratos(g.100gms ⁻¹)					0,69
	Açaí tipo B	2,43	0,70	4,65	
	Integral	2,35	0,27	5,64	
	Açaí tipo C	3,61	1,91	3,66	
Calorias (Kcal. 100g ⁻¹)					0,94
	Açaí tipo B	62,34	34,06	77,89	
	Integral	61,07	37,84	93,83	
	Açaí tipo C	58,36	56,93	58,63	

*Valor de p do teste de Kruskal-Wallis

Análises Microscópicas

Do total de amostras analisadas, 53,33% estavam em desacordo quanto aos parâmetros microscópicos, cujos limites de confiança de 95% foram de 35,4% e 71,2%.

Apenas uma amostra (3,33%) foi considerada imprópria para o consumo por apresentar pelo de roedor, matéria estranha prejudicial à saúde humana, de acordo com a Resolução RDC nº 175/2003, da ANVISA/MS¹². As demais amostras (50%) estavam em desacordo com a Portaria nº 326/1997 da SVS/MS¹¹ por apresentarem

matérias estranhas, como fragmentos de insetos, ácaros, cristais de areia e pelo humano, demonstrando a existência de falhas na produção dos frutos, processamento, manipulação e comercialização das polpas, ou seja, na adoção e/ou manutenção das Boas Práticas de Fabricação.

De acordo com Pereira et al²⁹, algumas amostras de polpas de frutas congeladas comercializadas em Viçosa/MG foram classificadas como inaceitáveis para o consumo por terem sido detectados insetos, fragmentos de insetos/larvas ou tecido vegetal. Os resultados do

presente estudo mostraram que grande parte das amostras em desacordo continha fragmentos de insetos. Tais fragmentos comumente não são identificados em virtude do diminuto tamanho, porém essa constatação corrobora ainda mais com a possibilidade do açaí ser contaminado com insetos diversos como, por exemplo, barbeiros que podem estar eventualmente contaminados com o protozoário *Trypanossoma cruzi*, tornando o produto um veículo da transmissão oral da Doença de Chagas Aguda. A contaminação dos alimentos à base de vegetais *in natura* com *Trypanossoma cruzi* é acidental e pode ocorrer durante a colheita, armazenamento, transporte ou até mesmo na etapa de preparação.

Avaliação dos dizeres de rotulagem

No presente estudo, 33,33% das amostras apresentaram não conformidade com a RDC nº 259/02¹⁸ no que se refere à denominação de venda, uma vez que foram declarados como “polpa de açaí médio”, sendo corretos os termos “açaí médio” ou “açaí regular tipo B”. Com relação à lista de ingredientes, 30% das amostras estavam em desacordo com a legislação em vigor por estar escrito na composição apenas “polpa de açaí”, sendo que deveriam apresentar “polpa de açaí + água” por tratar-se de açaí tipo B (médio). As três amostras de açaí tipo C avaliadas declararam a adição de água. No que diz respeito ao prazo de validade, 40% das amostras apresentaram não conformidade com a legislação, uma vez que deve constar pelo menos mês e ano para produtos com validade superior a três meses, estando incorreto, portanto, a apresentação do prazo de validade por período. O lote apareceu com apenas 6,67% de não conformidade por não se apresentar visível na embalagem do produto. As amostras apresentaram 100% de conformidade com a legislação no que se refere ao modo de conservação do produto e identificação de origem. As informações úteis ao consumidor (telefone, site/e-mail ou fax) estavam presentes em todos os rótulos avaliados.

Ainda como informação obrigatória, o conteúdo líquido foi avaliado de acordo com a Portaria nº157 do INMETRO²¹. Das amostras avaliadas, 13,33% estavam em desacordo por apresentar a expressão de forma incorreta.

Em relação à RDC nº 359/03¹⁹, 40% dos rótulos encontraram-se em desacordo, por não apresentarem nenhuma indicação de medida caseira.

A RDC nº 360/03¹⁶ estabelece, dentre outras especificações, a declaração obrigatória nos rótulos das informações nutricionais. De acordo com os rótulos avaliados, 33,33% estavam em desacordo com a legislação

em pelo menos um desses itens: 33,33% apresentavam o termo “valor calórico”, ao invés do termo correto “valor energético”; 13,33% apresentavam erros em relação aos valores diários (VD) por apresentar baseados em uma dieta de 2500 kcal, sendo que o correto seria de 2000 kcal (referência para adultos saudáveis) ou ainda por expressar valores incoerentes na tabela; 13,33% não apresentavam o item “gordura trans”; 3,33% apresentavam as informações nutricionais em forma linear e inserida em um quadro, porém, segundo a legislação a forma linear só pode ser possível nos casos em que não haja espaço suficiente no rótulo para inserção da tabela. As informações apresentadas de forma linear não necessitam estar inseridas em um quadro.

Considerando a Lei nº 10.674/03²⁰, 33,33% dos rótulos estavam em desacordo, sendo que 20% deles não apresentavam a advertência obrigatória “Não Contém Glúten” e os outros 80% apresentavam a expressão sem destaque, como é exigido pela legislação.

Com a publicação das normas que tornam obrigatória a rotulagem nutricional, as informações contidas nos rótulos passam a ser ainda mais complexas, exigindo maior habilidade do consumidor para interpretá-las e entendê-las. Informações adequadas e claras sobre os diferentes produtos e serviços, com especificações corretas de quantidade, características, composição, qualidade e preço, bem como sobre os riscos que apresentem estão asseguradas pelo Código de Defesa do Consumidor³⁰. Desta forma, torna-se relevante a existência de rótulos fiéis à legislação por se tratar de fator de segurança e qualidade e por ser a única fonte de comunicação entre o produto e os consumidores. Segundo dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária³¹, 70% dos consumidores consultam os rótulos dos alimentos no momento da compra, sendo que mais da metade não compreende adequadamente o que significa as informações. Portanto, ressalta-se a importância de rótulos com uma linguagem clara, correta e precisa, visando a orientação na escolha adequada de alimentos e garantindo a qualidade do produto.

CONCLUSÃO

- De acordo com as análises físico-químicas, não houve diferenças estatisticamente significantes entre os três tipos de polpa estudados, o que nos mostra que o produto não está sendo produzido de modo a atender os requisitos estabelecidos na legislação;

- A análise microscópica nos alerta para a necessidade da implantação e fiscalização mais efetiva

das Boas Práticas de Fabricação (BPF) e/ou Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) na cadeia produtiva das polpas de açaí;

- Os dizeres de rotulagem apresentaram não conformidades quanto à legislação em vigor, demonstrando tanto a deficiência da fiscalização quanto a existência de falhas no processo de adequação por parte dos fabricantes;

- Ressalta-se a importância de uma melhoria contínua no controle de qualidade das polpas envolvendo os aspectos nutricionais, físico-químicos, microscópicos e da rotulagem, uma vez que o consumo do produto encontra-se em larga expansão, não só no Brasil, como também no exterior.

- Devido à escassez de estudos relacionados à composição química do fruto de açaí, sugerem-se outros estudos que aprofundem a ação e quantificação das porções solúveis e insolúveis da fibra alimentar da polpa do fruto de açaí, visto sua relevância na proteção, manutenção e promoção da saúde.

- Futuros estudos direcionados para a quantificação de outros flavonoides deverão ser realizados. Dentre as classes de flavonoides, as antocianinas presentes no açaí tem sido o principal alvo de estudo, por serem antioxidantes e controlar os níveis de colesterol.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Prof. Dr. Luiz de Souza, pela colaboração na análise estatística e à Gelsina Cândido Neves, pelo apoio na realização das análises microscópicas.

REFERÊNCIAS

1. Sistemas de produção do Açaí. Embrapa Amazônia Oriental. [acesso em 17 de outubro de 2008]. Disponível em: [http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Acai/SistemaProducaoAcai_2ed/index.htm].
2. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Coordenação-Geral da Política de Alimentação e Nutrição – 1. ed. – Brasília: Ministério da Saúde; 2002.
3. Rogez H. Açaí: Preparo, Composição e Melhoramento da Conservação. Belém (Pará): Ed. Universidade Federal do Pará – EDUPA; 2000.
4. Menezes EMS, Torres AT, Srur AUS. Valor nutricional da polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Mart) liofilizada. *Acta Amaz*. 2008; 38 (2): 311-6.
5. Palácio V, Sampaio E, Fernandes A, Moraes M, Fhal I, Lamp C et al. Valores nutricionais do açaí: uma revisão literária no contexto da nutrição esportiva. *Ciência & Consciência*. 2008; Brasília, DF.
6. Tonon RV, Brabet C, Hubinger MD. Influência da temperatura do ar de secagem e da concentração de agente carreador sobre as propriedades físico-químicas do suco de açaí em pó. *Cienc Tecnol Aliment*. 2009; 29(2): 444-50.
7. Pompeu DR, Barata VCP, Rogez H. Impacto da refrigeração sobre variáveis de qualidade dos frutos do açazeiro (*Euterpe oleracea*). *Alim Nutr*. 2009; 20 (1): 141-8.
8. Meneses EMS. Efeito da alta pressão hidrostática em polpa de açaí pré-congelada (*Euterpe oleracea*, Mart.) [dissertação de mestrado]. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 2005.
9. Sanabria N, Sangronis E. Caracterización del acai o manaca (*Euterpe oleracea* Mart.): Un fruto del Amazonas. *Arch Latinoam Nutr*. 2007; 57(1):1-6.
10. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 01, de 07 de janeiro de 2000. Aprova padrões de identidade e qualidade para polpas de frutas. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 10 jan. 2000, Seção 1. p.54.
11. 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 ago. 1997, Seção 1.
12. 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 jul. 2003, Seção 1.
13. Brasil. Ministério da Saúde. Informe Técnico nº 35, de 19 de jun. 2008: Gerenciamento do Risco Sanitário na Transmissão de Doenças de Chagas Aguda por Alimentos. [acesso 2008 nov 01]. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/35_190608.htm].
14. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo-Brasil). Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 4ª ed. Brasília (DF): ANVISA; 2005.
15. Carvalho HH, Jong EV, Bello RM, Souza RB, Terra MF. Alimentos: Métodos físicos e químicos de análises. Porto Alegre: Universidade UFRGS; 2002. p.55-56; 70-73; 112-4.
16. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 360, de 23 de dez. 2003. Aprova o Regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 26 dez. 2003.
17. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Official Methods of Analysis of AOAC International, 18th ed., Gaithersburg, 2005. cap. 16. (1 CD-Rom).
18. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 259, de 20 de set. 2002. Aprova o regulamento técnico para rotulagem de alimentos embalados. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 23 set. 2002. p.33-4.

19. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 359, de 23 de dez. 2003. Regulamento técnico de porções de alimentos embalados para fins de rotulagem nutricional. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 26 dez. 2003.
20. Brasil. Presidência da República, Casa Civil. Lei Federal nº 10.674, de 16 de maio de 2003. Obriga a que os produtos alimentícios comercializados informem sobre a presença de glúten, como medida preventiva e de controle da doença celíaca. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 19 maio 2003. p.1.
21. Brasil. Portaria INMETRO nº157, de 19 de ago. de 2002. Aprova o regulamento técnico metrológico, estabelecendo a forma de expressar a indicação quantitativa do conteúdo líquido dos produtos pré-medidos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 ago. 2002.
22. Pagano M, Gauvreau K. Principles of Biostatistics. New York: Thomsom; 2000.
23. Eto DK, Kano AM, Borges MTMR, Brugnaro C, Verruma-Bernardi MR. Características físico-químicas de polpa de açaí congeladas. [acesso em 13 de novembro de 2009]. Disponível em: [http://www.jornada2009.nit.ufscar.br/cic].
24. Nascimento RJS, Couri S, Antoniassi R, Freitas S. Composição em ácidos graxos do óleo da polpa de açaí extraído com enzimas e com hexano. *Rev Bras Frutic*. 2008; 30 (2): 498-502.
25. Vaz APL. Caracterização e avaliação da qualidade de polpas de açaí industrializadas e perfil de ácidos graxos do fruto do açaizeiro. [dissertação de mestrado]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco; 2003.
26. Universidade Estadual de Campinas. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. [acesso em 23 de julho de 2010]. Disponível em: [www.unicamp.br/nepa/taco].
27. Uchoa AMA, Costa JMC da, Maia GA, Silva EMC, Carvalho AFFU, Meira TR. Parâmetros Físico-Químicos, Teor de Fibra Bruta e Alimentar de Pós Alimentícios Obtidos de Resíduos de Frutas Tropicais. *Rev Seg Alim e Nutric*. 2008; 15(2): 58-65.
28. Oliveira MSP, Carvalho JEU, Nascimento WM. Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). Jaboticabal: FUNEP, 2000. 52p.
29. Pereira JMATK, Oliveira KAM, Soares NFF, Gonçalves MPJC, Pinto CLO, Fontes EAF. Avaliação da qualidade físico-química, microbiológica e microscópica de polpas de frutas comercializadas na cidade de Viçosa - MG. *Alim Nutr*. 2006; 17(4): 437-42.
30. 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, n.176, 12 set. 1990. Suplemento, p.1-12.
31. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). [acesso 2010 jul 23]. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/alimentos/rotulos/manual_consumidor.pdf].

Composição química de misturas de farinhas de banana verde com castanha-do-brasil

Chemical composition of mixtures with green banana and nut Brazil flours

RIALA6/1305

Marlene Jardim MEDEIROS¹, Palmira Antonia Alves Cruz de OLIVEIRA¹, Joana Maria Leite de SOUZA¹, Reginaldo Ferreira da SILVA^{2*}, Maria Luzenira de SOUZA³

*Endereço para correspondência: UFAC/GOV.ACRE-SEAPROF, Cooperação Técnica e Institucional - Campus Universitário, Rodovia BR 364, Km 04, nº 6637, Distrito Industrial, Caixa Postal 500. CEP: 69915-900 - Unidade de Tecnologia de Alimentos - UTAL. Rio Branco-AC, Brasil. E-mail: reginaldo.alimentos@gmail.com

¹Emater-Acre, Av. Nações Unidas, 2.604 Bairro: Estação Experimental, Rio Branco-AC, Brasil. CEP: 69.912-600 - Caixa Postal 462, Fone: (68) 3226-4365 / 8407-3895

¹EMBRAPA-AC, Rodovia Br-364, Km 14, Caixa Postal 321 - CEP 69908-970 - Rio Branco-AC, Brasil.

²UFAC/GOV.ACRE-SEAPROF. Cooperação Técnica e Institucional - Campus Universitário, Rodovia BR 364, Km 04, nº 6637, Distrito Industrial, Caixa Postal 500 - CEP: 69915-900 - Unidade de Tecnologia de Alimentos - UTAL - Rio Branco-AC, Brasil

³UFAC-AC, Rodovia BR 364, Km 04, nº 6637, Distrito Industrial, Caixa Postal 500 - CEP: 69915-900 - Unidade de Tecnologia de Alimentos - UTAL - Rio Branco-AC, Brasil

Recebido: 22.02.2010 - Aceito para publicação: 22.07.2010

RESUMO

No presente estudo foram preparadas misturas de farinhas de banana verde e de castanha-do-brasil e analisadas suas características e os valores aditivos nutricionais. Diferentes percentuais de farinha de castanha-do-brasil (5%, 10% e 15%) foram misturadas à farinha de banana verde. Determinou-se a composição centesimal da mistura por meio de análises químicas das matérias-primas individuais e das farinhas mistas. Por se tratar de matérias-primas distintas, a composição centesimal da farinha de banana verde e de castanha-do-brasil apresentou diferença significativa para todos os constituintes químicos analisados. As farinhas mistas apresentaram aumento nos teores médios de proteínas, lipídeos, cinzas e decréscimo de carboidratos totais. A mistura de farinha de castanha-do-brasil, em até 15%, na farinha de banana verde, apresentou melhor valor nutricional quando comparada com suas matérias-primas individuais. Sugere-se a realização de mais estudos com as mesmas matérias-primas, com adição de farinhas de castanha-do-brasil, que apresentem baixos teores de lipídeos, com objetivo de aumentar ainda mais a concentração dos teores de fibras totais, proteínas e minerais nas farinhas mistas elaboradas.

Palavras-chave. composição química, misturas, banana verde, castanha-do-brasil.

ABSTRACT

The mixtures of green banana and Brazilian nut flours were prepared and characterized on food nutritional additive value. Varied percentage of Brazilian nut flour (5%, 10% and 15%) were combined with green banana flour. The centesimal composition of the mixture was determined by means of chemical analyses in the individual raw materials and in the mixed flours. For being distinct raw materials, the centesimal composition of both green banana and Brazilian nut flours showed significant differences in all of the analyzed chemical constituents. An increase in the average contents of proteins, lipids, and ashes, and a decrease in total carbohydrates were found in the mixed flours. The mixture of Brazilian nut flour in up to 15% in green banana flour demonstrated the best nutritional value when compared with the respective raw materials. It is suggested to perform further studies on the same raw materials and adding Brazilian nut flours containing low lipid contents, for increasing the concentration of the total fibers, proteins and minerals contents in the prepared flours mixtures.

Key words. chemical composition, mixtures, green banana, Brazilian nuts.

INTRODUÇÃO

Durante o processo de colheita e comercialização da banana, no Brasil, grande parte da produção é perdida em razão da alta perecibilidade da fruta e pelo fato da população ter por hábito consumir apenas a banana madura¹. Em algumas regiões do país, chega-se a perder até 60% da produção. Entretanto, tais perdas podem ser reduzidas por meio do processamento dessas frutas ainda verdes, através da transformação em polpa ou farinha de banana. Segundo Fasolin et al², a farinha de banana verde, quando utilizada como ingrediente na mistura com o trigo, tem a função de incrementar nutricionalmente sopas, mingaus, massas de panquecas, pizzas, pães, dentre outros.

A análise de farinha de banana verde do cultivar prata demonstrou a seguinte composição química em g/100 g para base úmida e base seca³: extrato etéreo, 0,68 e 0,70; proteína bruta, 4,50 e 4,73; fibra bruta, 1,01 e 1,17; cinzas, 2,59 e 2,68; carboidratos, 87,92 e 90,72; amido, 72,72 e 75,20 e valor calórico, 373,00 e 385,30 em kcal/100 g, respectivamente. Entre os principais constituintes químicos da banana verde está o amido resistente⁴, podendo corresponder de 55 a 93% do teor de sólidos totais, além de quantidades de fibras que podem chegar até 14,5%.

Alimentos crus e processados contêm apreciáveis quantidades de amido resistente, dependendo da fonte botânica e do tipo de processamento, como moagem, cozimento e resfriamento⁵. O principal interesse em relação ao amido resistente consiste em seu papel fisiológico. Por não ser digerido no intestino delgado, este tipo de amido se torna disponível como substrato para fermentação pelas bactérias anaeróbicas do cólon. Dessa forma, essa fração compartilha muitas das características e benefícios atribuídos à fibra alimentar no trato gastrointestinal⁶.

Segundo Haralampu⁷, esse amido resistente pode servir de substrato para o crescimento de microrganismos probióticos, atuando como potencial agente prebiótico. A metabolização desse tipo de carboidrato pelos microrganismos, via fermentação, resulta na produção de ácidos graxos de cadeia curta, como acetato, propionato e butirato; gases carbônico e hidrogênio e, em alguns indivíduos, metano; e diminuição do pH do cólon⁸. A maioria destes compostos age na prevenção de doenças inflamatórias do intestino, além de auxiliar na manutenção da integridade do epitélio intestinal. Adicionalmente, o amido resistente contribui para o aumento do volume fecal, modificação da microflora do cólon, aumento da excreção fecal de nitrogênio e, possivelmente, redução do risco de câncer de cólon⁹.

Por outro lado, a região amazônica possui uma das mais ricas oleaginosas, conhecida por castanha-do-brasil. Sua semente é uma amêndoa que apresenta alto valor nutricional devido à sua composição em lipídeos, proteínas e vitaminas, principalmente a B, além de apreciáveis quantidades de minerais¹⁰.

A castanha-do-brasil integral apresenta a seguinte composição físico-química e química em g/100 g de amostra: umidade, 3,13; cinzas, 3,84; lipídeos, 67,30; proteínas, 14,29; carboidratos, 3,42; fibras totais, 8,02 e valor calórico em kcal, 676,56¹¹.

Gonçalves et al¹² citam que a amêndoa da castanha-do-brasil também é rica em minerais. Os autores afirmam que os teores de minerais por ordem de importância são: fósforo, com 564,50; cálcio, 206,75; magnésio, 312,50 e potássio com 514,75, expressos em mg/100 g de matéria seca. Em menores concentrações, estão presentes: ferro, com 9,67; zinco, 7,10; 6,85 de magnésio e 1,17 de cobre.

Entretanto, dentre todos os minerais presentes na amêndoa, o selênio tem se destacado, em virtudes das recentes descobertas que o relacionam com os possíveis benefícios proporcionados à saúde humana. Existem fortes indícios de que este mineral atue na prevenção de várias doenças degenerativas do organismo humano, como a aterosclerose, câncer, artrite, cirrose e enfisema. No entanto, por muitos anos, o selênio foi considerado tóxico para animais, quando ingerido em altas doses. Recentemente descobriu-se que em quantidades muito pequenas ele é necessário na dieta¹³. O selênio retarda o envelhecimento, combate a tensão pré-menstrual, preserva a elasticidade dos tecidos, previne o câncer e neutraliza os radicais livres. Em homens, aumenta a potência e o interesse sexual e supre a carência gerada quando o selênio é perdido com o sêmen¹⁴.

A proteína da amêndoa ou da torta da amêndoa desengordurada de castanha-do-brasil também apresenta uma rica composição em aminoácidos essenciais com elevado teor dos sulfurados (metionina e cisteína), geralmente insuficientes em proteínas vegetais¹¹.

Em função de tantas vantagens quantitativas e qualitativas destas duas matérias-primas, este trabalho teve por objetivo elaborar e caracterizar misturas de farinha de banana verde e castanha-do-brasil para uso na alimentação.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

As matérias-primas utilizadas para a realização do estudo foram: 10 cachos de bananas com casca, no estágio

de maturação (1) verde, da variedade terra, provenientes de cultivos localizados no município de Rio Branco-AC e 50 kg de amêndoas de castanha-do-brasil desidratada, adquiridas na usina de beneficiamento da Cooperativa Agroextrativista de Xapuri - CAEX, localizada no município de Xapuri-AC.

Processo de obtenção da farinha de banana verde

Bananas verdes no estágio de maturação (1) foram submetidas ao processo de sanitização, conforme Borges et al³. Dez cachos de banana verde foram sanitizados em tanques com água clorada a 150 ppm, onde permaneceram por 15 minutos, sendo em seguida, lavadas em água corrente para remoção do cloro residual. As bananas com casca foram fatiadas em rodela com espessura de mais ou menos 0,5 cm, sendo, em seguida, desidratadas em estufa com circulação de ar forçado a uma temperatura constante de 70°C, por 12 horas, trituradas em moinho de facas e martelo, resultando em 40 kg de farinha de banana verde. A farinha obtida foi acondicionada em sacos plásticos de polipropileno com capacidade de 1000 g. Finalmente, foram retiradas amostras para análises químicas com 3 repetições, sendo o restante armazenado até o preparo das misturas.

Obtenção da farinha de castanha-do-brasil

Cinquenta quilos de amêndoas de castanha-do-brasil desidratadas, com teor de umidade de 2,5%, foram obtidas na Cooperativa Agroextrativista - CAEX, localizada no município de Xapuri-AC. Para a retirada da película marrom, que recobre o endosperma da semente de castanha, as mesmas foram submetidas a tratamentos químicos, conforme Souza et al¹⁵.

As amêndoas foram imersas em solução de hidróxido de sódio a 1%, durante um minuto, à temperatura de 100°C para remoção da película marrom, que recobre o endosperma. Após esse tempo, as amêndoas foram mergulhadas em solução de ácido cítrico a 1%, durante 5 minutos, para neutralização do hidróxido de sódio, usando como solução indicadora a fenolftaleína. Amêndoas que apresentavam coloração rósea foram novamente lavadas em água corrente abundante e, em seguida, mergulhadas em solução de ácido cítrico, até que não apresentassem mais resíduos de hidróxido de sódio.

As amêndoas despeliculadas foram trituradas em liquidificador industrial em uma quantidade de 100 mL de água para cada quilograma de sementes. A torta obtida foi submetida ao processo de desidratação em estufa com renovação e circulação forçada de ar por um tempo de quatro horas, em

temperatura de 80°C, até atingir a umidade inicial, 2,7% ou peso constante. A massa obtida foi resfriada à temperatura ambiente, pesada, retirada amostras para análises químicas com 3 repetições, embalada a vácuo em sacos de polietileno aluminizado, e armazenada até o preparo das misturas.

Preparo das farinhas mista de banana verde com castanha-do-brasil

As formulações foram elaboradas calculando-se um peso total de 1 quilograma para cada percentual. Assim, para obtenção da farinha de banana com 5% de farinha de castanha, pesaram-se 950 g de farinha de banana e 50 g de farinha de castanha; para a farinha de banana com 10% de farinha de castanha, pesou-se 900 g de farinha de banana e 100 g de farinha de castanha e, finalmente, para se obter a mistura com 15% de farinha de castanha, pesaram-se 850 g da farinha de banana adicionando-se 150 g de farinha de castanha-do-brasil. Esses percentuais foram definidos considerando o alto teor de gordura presente na farinha de castanha e também a capacidade do sabor desta prevalecer sobre o sabor da farinha de banana verde com casca.

Análises químicas das farinhas de castanha-do-brasil e banana verde e de suas respectivas misturas

As análises de composição química das matérias-primas e de suas respectivas misturas foram realizadas nos Laboratórios de Análises Física e Química da Embrapa-Acre e da Universidade Federal do Acre, segundo as normas oficiais. As seguintes análises foram feitas:

Lipídeos

O extrato etéreo foi determinado utilizando-se o extrator Soxhlet, segundo a metodologia da *Association of Official Analytical Chemists - AOAC*¹⁶, método 945.38. Por esse método, o teor de lipídeo foi obtido por meio da extração com solvente orgânico, éter de petróleo, seguido da remoção, por evaporação, do solvente.

Proteínas

O teor de nitrogênio total da amostra foi determinado pelo procedimento do Kjeldahl tradicional, segundo a metodologia da AACC¹⁷, método 46-13. Para o cálculo da proteína bruta, multiplicou-se o fator nitrogênio (N) por 6,25 para as farinhas de banana, castanha-do-brasil e suas misturas.

Cinzas

As cinzas foram determinadas por incineração do material em mufla a 550°C, segundo a metodologia

da AOAC¹⁶, método 923.03, e representam o teor total de substâncias inorgânicas presentes na amostra.

Fibras

O teor de fibra bruta foi determinado de acordo com o procedimento descrito pela AOAC¹⁶, método 978.10.

Carboidratos

Foram determinados pela diferença entre a massa seca total (100%) e a soma das porcentagens determinadas de umidade, proteína, extrato etéreo, cinzas e fibras.

Valor calórico

O valor calórico foi calculado usando os fatores de conversão de Atwater de 4 kcal/100 g para carboidratos e proteínas e 9 kcal/100 g para lipídeos¹⁸.

Análise Estatística

Para a obtenção de dados da composição químicas das matérias-primas individuais e de suas respectivas misturas, foram feitas análises de variância (ANOVA), com posterior comparação das diferenças entre as médias pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade. Para as análises dos dados obtidos, utilizou-se o programa estatístico SISVAR¹⁹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Composição química da farinha de banana verde e castanha-do-brasil

A Tabela 1 apresenta a composição química da farinha de banana verde (FBV) e farinha de amêndoa de castanha-do-brasil integral (FACI), e suas comparações com valores médios nutricionais reportados na literatura para as mesmas espécies vegetais, além da farinha de trigo²⁰, por ser esta a mais utilizada na elaboração de massas, mingaus, pães, bolos, biscoitos, macarrões, dentre outros.

Comparando-se os teores médios de composição química da farinha de amêndoa de castanha-do-brasil integral (FACI) obtida neste estudo com dados citados na literatura¹¹ (Tabela 1), observa-se que os valores médios destes constituintes químicos encontram-se próximos, para proteínas e lipídeos; superiores para carboidratos e valor calórico; inferiores para cinzas e fibras. A Tabela 1 também mostra que, com exceção dos carboidratos, a farinha de castanha-do-brasil integral apresentou teores de proteínas, lipídeos, cinzas, fibra bruta e valor calórico superior em relação aos da farinha de trigo²⁰.

Tabela 1. Composição centesimal da farinha de banana verde e castanha-do-brasil e suas comparações com dados citados na literatura

Composição química em (g/100 g) ¹	Matérias-primas					
	Nossos dados (g/100 g) ¹		*Dados citados na literatura (g/100 g) ¹			
	FACI	FBV	Borges et al ²	Souza e Menezes ¹¹	Freitas et al ²⁰	
	FACI	FBV	FBV	FACI	FACPD	FT
Proteína	14,97	3,87	4,50	14,29	40,23	10,00
Lipídeos	68,6	0,88	0,68	67,30	25,13	0,28
Cinzas	2,10	2,27	2,59	3,84	8,85	1,38
Carboidratos totais ²	9,43	83,31	87,92	3,42	40,23	74,2
Fibra bruta	5,50	0,54	1,01	8,02	15,72	0,32
Valor calórico (kcal) ³	715,00	356,64	373,00	676,56	400,00	339,68

¹Média de 3 determinações. **FBV**= Farinha de banana verde; **FACI**= Farinha de amêndoa de castanha-do-brasil integral; **FACPD**= Farinha de amêndoas de castanha-do-brasil parcialmente desengordurada; **FT**= Farinha do trigo. *Valores citados na literatura para fins comparativos; ²Obtidos por diferença (100-proteína-lipídeos-cinzas-fibra bruta); ³Valor calórico em Cal/100 g

Segundo Souza e Menezes¹¹ e Felberg et al²¹, a presença da película marrom no endosperma da amêndoa eleva o teor de fibras totais e cinzas, reduzindo os de aminoácidos. Sendo assim, a diferença em relação ao teor de cinzas e fibra bruta encontrada na farinha de amêndoa de castanha integral do presente estudo e a dos referidos autores, provavelmente, ocorra em função das amêndoas terem sido submetidas ao processo de despelículação.

O elevado valor calórico encontrado para a farinha de castanha integral, analisada neste estudo, deve-se ao fato da mesma não ter sido desengordurada e processada com 100% do seu teor lipídico (68,6 g/100 g). O fato da energia oxidada em 1 grama de gordura liberar 9 calorias e de carboidratos e proteínas somente 4 calorias, explica o elevado valor calórico, citado na literatura¹¹, entre a farinha de castanha integral e a parcialmente desengordurada. Sendo assim, o processo de extração de lipídeos em amêndoas de castanha-do-brasil, é fator determinante na melhoria do valor nutricional, haja vista que reduz o valor calórico e concentra outros componentes químicos considerados de grande importância, como proteínas, carboidratos, fibras, cinzas e alguns minerais, principalmente o selênio, por apresentar propriedades funcionais que atuam no combate à prevenção de doenças crônicas degenerativas⁸.

Gloria e Regitano D'arce²² também observaram este comportamento. Os autores encontraram teores médios de

proteínas na faixa de 47,6, 59,3 e 81,6; carboidratos, 32,7, 27,0 e 13,3; cinzas, 13,1, 4,5 e 4,3; e fibras, 5,5, 9,1 e 0,7 expressos em g/100 g, na torta, no concentrado e isolado proteico de castanha-do-brasil, respectivamente. Vale ressaltar que a amêndoa desengordurada pelos autores apresentou teor de lipídeo residual, de apenas, 1,2% na torta; 1,4% no concentrado proteico e 0,2% no isolado proteico. Para a extração da gordura, os autores combinaram os métodos de prensagem das amêndoas em prensa hidráulica seguida de solvente orgânico (hexano).

A banana é fonte de potássio e outros minerais, além de ser rica em amido e carboidratos. Entretanto, apresenta baixo teor de gorduras e proteínas. Travaglini et al²³ citam que o teor de proteína da casca de banana é cerca de 8% no produto seco, porém apresenta valor biológico baixo quando comparado com as proteínas dos cereais. Os mesmos autores citam percentuais de 3,2% de proteínas em polpa de banana verde, valor esse próximo aos observados no presente trabalho com 3,87 g/100 g. Entretanto, se comparado com valor proteico da farinha de trigo citado na literatura²⁰, 10 g/100 g, e o valor mínimo de 7,5 g/100 g, estabelecido pela ANVISA²⁴ para a mesma farinha, observa-se que o teor proteico encontrado na farinha de banana verde é quase três vezes inferior, quando comparado a outros estudos, e duas vezes menor para o teor mínimo estabelecido pela legislação para a farinha de trigo.

Borges et al³, analisando farinha de banana verde da variedade prata, citam os seguintes valores médios de composição química³ em g/100 g para, proteína: 4,5; lipídeos: 0,68; fibra bruta: 1,01; cinzas: 2,59; carboidratos: 87,92 e o valor calórico de 373 kcal/100g. Comparando os dados de composição química encontrados neste estudo com os citados pelos autores observa-se que, com exceção dos teores de proteínas, carboidratos e valor calórico, os teores dos demais componentes químicos encontram-se próximos ao da literatura.

Por ser rica fonte de amido, a banana verde, quando submetida ao processo de aquecimento, pode resultar em porcentagens de amido modificado que propiciam benefícios à saúde do ser humano. Por tal motivo, a banana verde se apresenta não somente como fonte de carboidratos e minerais, mas, na atualidade, também como fonte de alimento funcional.

Composição química de misturas de farinhas de banana verde com castanha-do-brasil

A Tabela 2 mostra a composição química das misturas das farinhas de banana verde com castanha-do-brasil em diferentes percentuais.

A farinha mista elaborada neste estudo mostrou que o teor de nitrogênio total nas misturas de banana com 5, 10

e 15% de castanha foi de 4,5, 5,0 e 6,25 g/100 g de amostra, respectivamente. Estes resultados indicam que o conteúdo proteico na farinha mista apresentou um incremento na sua concentração, após as inclusões da farinha de castanha-do-brasil. Além disso, foi constatado um acréscimo no teor de lipídeos e decréscimo de carboidratos contribuindo assim para um melhor balanceamento dos constituintes químicos presentes na farinha mista.

Tabela 2. Composição centesimal (g/100 g) das misturas formuladas à base de farinha de banana verde e castanha-do-brasil em diferentes proporções

Composição (g/100 g) ¹	Fórmula		
	(% de farinha de castanha na farinha de banana verde)		
	5	10	15
Proteína bruta	4,50b	5,00ab	6,25a
Lipídeos	4,31c	7,65b	11,03a
Cinzas	2,36b	2,28c	2,56a
Carboidratos totais ²	78,73a	75,32b	70,51c
Fibra bruta	0,78b	1,03a	1,27a
Calorias (Kcal/100g) ³	318c	394b	408a

¹Media de 3 determinações. ²Obtidos por diferença (100-proteína-lipídeos-cinzas-fibra bruta); ³Valor calórico em Cal/100g (não inclui a fibra). Letras minúsculas iguais na linha não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

Estudo realizado com misturas de farinha de castanha-do-brasil adicionada na mistura com mandioca em percentuais de 2,5, 5,0 e 7,5%, mostrou um aumento na concentração de proteínas na ordem de 2,35, 4,76 e 6,19%; lipídeos, 1,02, 3,17, 4,63%; cinzas, 0,70, 1,17, 1,51%, respectivamente²⁵. Carboidratos, fibras e calorias, não foram determinados pelos autores.

O teor de proteínas citados pelos autores 6,19 g/100 g situa-se próximo ao encontrado no presente estudo com 6,25 g/100 g. Esse fato chamou a atenção, devido aos autores terem utilizado, na mistura com o trigo, um percentual máximo menor de farinha de castanha (7,5%) do que o percentual utilizado no presente estudo para a mistura com a banana (15%). Entretanto, essa diferença é compreensível, já que os autores reduziram o teor de lipídios da amêndoa, que se encontra em torno de 67,30¹¹ a 70,66%¹², para apenas 35,71%. Esse processo concentrou a quantidade de proteína, que na amêndoa *in natura* situa-se em média entre 14,29¹¹ a 15,69%¹², elevando-se para 36,41%. Ou seja, mais de 50% do teor de lipídios foi reduzido, enquanto no presente trabalho, tal processo não foi realizado.

Wang et al²⁶ formularam cinco misturas de soja com arroz nas seguintes proporções: 10:90; 20:80; 30:70; 40:60 e 50:50, respectivamente. Os autores encontraram valores de proteínas variando de 1,97 a 3,79; lipídeos de 0,55 a 1,92; cinzas de 0,12 a 0,26; fibras de 0,22 a 0,54 e carboidratos de 12,27 a 7,77, todos expressos em g/100 g de amostra. Apesar de tratar-se de misturas de matérias-primas distintas, e as quantidades utilizadas nas formulações não terem sido as mesmas, observa-se, que os valores encontrados para composição centesimal das misturas formuladas de banana com castanha estão todas acima dos citados pelos referidos autores, para as cinco formulações resultantes das misturas de arroz e soja. No presente trabalho, não foi elaborado nenhum produto a partir da mistura de banana com castanha para ser submetido ao teste de aceitabilidade, entretanto, espera-se que o sabor da castanha predomine sobre o da banana verde e que, além da melhoria de valor nutricional, obtenha-se excelente aceitabilidade dos seus derivados.

Apesar da farinha de castanha ter mostrado um bom teor de proteínas com 14,97 e fibras com 5,50g/100 g de amostra, quando analisada individualmente, os percentuais adicionados à mistura com banana não resultaram nos acréscimos esperados, sendo, portanto, este aspecto considerado negativo. Segundo a legislação brasileira, a farinha de trigo, que é considerada um dos alimentos mais consumidos e utilizados no preparo de massas alimentícias no mundo, deve apresentar, no mínimo 7,5 g/100 g de proteínas²⁴. O teor proteico da farinha mista elaborada neste estudo está de acordo com dados citados por Cohen et al²⁵ para mistura de farinha de mandioca com castanha-do-brasil. Entretanto, pode-se dizer que apresentou um teor de proteínas inferior ao limite mínimo estabelecido pela legislação vigente no país para a farinha de trigo²⁴, já que não foi feita análise de comparação qualitativa, ou seja, de aminoácidos.

Para teor de fibra alimentar, Dreher²⁷ cita que os alimentos devem apresentar entre 2 a 3% para serem considerados boas fontes deste constituinte químico. Segundo o regulamento técnico referente à informação nutricional complementar (Portaria nº 27), o alimento sólido pode ser considerado como fonte de fibra alimentar quando apresentar 3g/100 g de amostra e, para alimentos líquidos, 1,5g/100 mL; ambos devem ser considerados em base integral. Para Brasil²⁸, alimentos que apresentam o dobro desse conteúdo podem ser considerados de elevado teor de fibras. A exemplo das proteínas, os teores de fibras totais presentes nas farinhas mistas elaboradas

com castanha e banana verde também não alcançaram o percentual mínimo exigido pela legislação (3g/100 g).

Entretanto, sabe-se que a banana e a castanha-do-brasil são alimentos muito apreciados e utilizados pela população da Amazônia na forma in natura ou como ingrediente no preparo de um amplo cardápio alimentar, como mingaus, bolos, biscoitos, tortas, doces, sorvetes, entre outros. Sendo assim, pode-se afirmar que a elaboração de farinhas mistas de castanha-do-brasil desengordurada ou parcialmente desengordurada com outras fontes vegetais ricas em carboidratos, a exemplo da banana, é tecnologicamente e nutricionalmente viável, conforme evidenciado neste trabalho e em outros estudos citados na literatura, contribuindo, assim, para o aumento e enriquecimento do teor proteico, de fibra alimentar, de minerais e, possivelmente, de propriedades funcionais.

CONCLUSÃO

Por meio dos resultados das análises de composição centesimal é possível afirmar que a farinha de banana enriquecida com diferentes percentuais de farinha de castanha apresenta um melhor balanceamento dos teores de proteínas, gorduras, cinzas e carboidratos do que a farinha de banana verde pura.

Os percentuais de farinha de castanha-do-brasil misturadas à farinha de banana verde, não foram o suficiente para se equiparar aos teores mínimos de proteínas e fibras totais previsto na legislação brasileira, mínimo 3g/100 g para fibras e 7,5g/100 g para proteínas.

Sabendo-se que a farinha de castanha-do-brasil parcialmente desengordurada eleva a concentração de outros constituintes químicos, principalmente proteínas, fibras e minerais, sugerem-se novos estudos com as mesmas matérias-primas, com adição de farinha de castanha-do-brasil, que apresente baixos teores de lipídeos e, com isso, possa resultar em um alimento com teores de componentes químicos dentro dos padrões previstos na legislação.

REFERÊNCIAS

1. Izadoro DR, Scheer AP, Sierakowski MR, Haminiuk CWI. Influence of green banana pulp on the rheological behaviour and chemical characteristics of emulsions (mayonnaises) chemical characteristics of emulsions (mayonnaises). *LWT* 2008 41:1018-28.
2. Fasolin LH, Almeida GC, Castanho PS, Netto-Oliveira ER. Biscoitos produzidos com farinha de banana: avaliações química, física e sensorial. *Ciênc Tecnol Alim*. 2007; 27(3):787-92.

3. Borges AM, Pereira J, Lucena EMP. Caracterização da farinha de banana verde. *Ciênc Tecnol Alim*. 2009; 29(2): 333-9.
4. Ovandro-Martinez M, Sáyago-Ayerdi S, Agama-Acevedo E, Goñi I, Bello-Pérez LA. Unripe banana flour as an ingredient to increase the undigestible carbohydrates of pasta. *Food Chem*. 2009; 113:121-6.
5. Muir JG, O'dea K. Validation of an *in vitro* assay for predicting the amount of starch that escapes digestion in the small intestine of humans. *Am J Clin Nutr*. 1993; 57:540-6.
6. Muir JG, O'dea K. Measurement of resistant starch: factors affecting the amount of starch escaping digestion *in vitro*. *Am J Clin Nutr*. 1992; 56:123-7.
7. Haralampu SG. Resistant starch: a review of the physical properties and biological impact of RS3. *Carbohydr Polym*. 2000; 41: 285-92.
8. Camph M, Faisant N. Resistant starch: analytical and physiological aspects. *Bol SBCTA*. 1996; 30(1):37-43.
9. Yue P, Waring S. Resistant starch in food applications. *Cer Food World*. 1998; 43(9):690-5.
10. Gutierrez EMR, Regitano-D'arce MAB, Rauhen-Miguel AMO. Estabilidade oxidativa do óleo bruto da castanha do Pará (*Bertholletia excelsa*). *Ciênc Tecnol Alim*. 1997; 17(1):22-7.
11. Souza ML, Menezes HC. Processamento de amêndoa e torta de castanha-do-brasil e farinha de mandioca: parâmetros de qualidade. *Ciênc Tecnol Alim*. 2004; 24(1):120-8.
12. Gonçalves JFC, Fernandes AV, Oliveira AFM, Rodrigues LF, Marengo RA. Primary metabolism components of seeds from Brazilian Amazon tree species. Short Communication. *Braz J Plant Physiol*. 2002; 14(2):139-42.
13. Castro RV. Efeitos quimioterápicos do selênio no câncer da mama. [acesso 2010 jan 12]. Disponível em: [<http://www.correionet.com.br/~rvcastro>].
14. Alvarenga RM. Palavra de médico. Tudo o que você deve saber sobre as novas Fontes da Juventude. [acesso 2010 jan 26]. Disponível em: [<http://www.palavrademedico.cjb.net/>].
15. Souza JML, Silva RF, Leite FMN, Reis FS. Castanha-do-brasil: despelculada e salgada. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica. (Coleção Agroindústria Familiar). 2009. 37p.
16. Association of Official Agricultural Chemists. Official Methods of Analysis of the Association of Official Agriculture Chemists. 17 ed. Washington. 2002.
17. American Association of Cereal Chemists - AACC. Approved methods of the American Association of Cereal Chemists. 9 ed. St. Paul. 1995. 2v.
18. Anderson LA, Dibble MV, Turkki PR, Mitchell HS, Rynbergen HJ. Nutrição. Rio de Janeiro: Guanabara; 1988.
19. Ferreira DS. Sisvar: Sistema de análises de variância para dados balanceados: Programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos, Versão 4.3. Lavras. UFLA. 2000.
20. Boen TR, Soeiro BT, Filho ERP, Lima-Pallone JA. Avaliação do teor de ferro e zinco e composição centesimal de farinhas de trigo e milho enriquecidas. *Rev Bras Ciênc Farmac*. 2007; 43(2):589-96.
21. Felberg I, Deliza R, Gonçalves EB, Antoniassi R, Freitas SC, Cabral LC. Bebida mista de extrato de soja integral e castanha-do-brasil: caracterização físico-química, nutricional e aceitabilidade do consumidor. *Alim Nutr*. 2004; 15(2): 163-74.
22. Glória MM, Regitano-D'arce MAB. Concentrado e isolado protéico de torta de castanha-do-pará: Obtenção e caracterização química e funcional. *Cienc Tecnol Alim*. 2000; 20(2):240-5.
23. Travaglini DA, Neto MP, Bleinroth EW, Leitão MFF. Banana-passa: princípios de secagem, conservação e produção industrial. Campinas, SP. Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL. (Manual Técnico n.12). 1993. 73p.
24. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 8, de 02 de junho de 2005. Regulamento técnico de identidade e qualidade da farinha de trigo. Diário Oficial [da] União. Brasília, DF, 03 jun. 2005. [acesso 2010 jan 10]. Disponível em: [<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=19023>].
25. Cohen KO, Chisté RC, Mathias EA. Produção de farinha mista de mandioca e castanha-do-brasil. Belém. Embrapa Amazônia Oriental. (Documentos, 227). 2005. 20p.
26. Wang SH, Cabral LC, Maia LH, Araujo FB. Mingau de arroz e soja pronto para consumo. *Pesq Agropec Bras*. 1999; 24(5): 855-60.
27. Dreher ML. Food industry perspective: functional properties and food uses of dietary fiber. In: Kritchevsky D, Bonfield C, editors. Dietary fiber in health & disease. Minnesota: Eagan Press; 1995. p. 467-74.
28. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 27, de 13 de janeiro de 1998. Aprova o Regulamento técnico referente a informação nutricional complementar. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 15 jan 1988. [acesso 2009 set 10]. Disponível em: [<http://e-ligis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=97>].

Atividade antifúngica do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* sobre leveduras isoladas de candidíase bucal de gestantes HIV positivas

Antifungal activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil on yeasts isolated from HIV positive pregnant women with oral candidiasis

RIALA6/1306

Anna Carolina Borges Pereira da COSTA^{1*}, Guilherme Rodrigues TEODORO¹, Tatiane Morais FERREIRA², Fernando de Sá SILVA³, Aguida MARIA⁴, Sônia KHOURI^{2*}

¹Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, Faculdade de Odontologia de São José dos Campos- UNESP- Univ. Estadual Paulista, São Paulo, Brasil. E-mail: carol_biológ@yahoo.com.br

²Laboratório de Microbiologia- Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP) – Av. Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, CEP 12244-00. São José dos Campos, São Paulo, Brasil. Tel: (12) 39471000. E-mail: soniak@univa.br

³Laboratório de Genética, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

⁴Seção de Biologia Médica- Instituto Adolfo Lutz (IAL- Taubaté), São Paulo, Brasil

Recebido: 02.06.2009 – Aceito para publicação: 28.08.2010

RESUMO

A candidíase bucal é a infecção fúngica mais comum em portadores de HIV e, com episódios recorrentes em pacientes com Aids. Com o objetivo de pesquisar novos e eficazes agentes antifúngicos contra cepas resistentes, foi investigada a atividade antifúngica do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, em diferentes concentrações, em leveduras isoladas de candidíase oral. O experimento foi realizado por meio da técnica de difusão em ágar. Foram avaliadas cepas padrão de *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida tropicalis* ATCC 157, *Candida glabrata* ATCC 30070, *Candida krusei* ATCC 6258 e *Candida dubliniensis* ATCC 778157 e os isolados da cavidade bucal de gestantes HIV positivas, sendo sete *C. albicans*, um *C. tropicalis*, um *C. glabrata* e um *C. krusei*. O óleo essencial foi analisado nas quantidades de 20 e 50 µL, nas concentrações de 10 a 100%, variando de 10 em 10%. Todas as cepas analisadas foram suscetíveis ao óleo essencial de *M. alternifolia* nas concentrações de 70% e 50%, respectivamente, nos volumes de 20 µL e 50 µL. O potencial antifúngico do óleo essencial de *M. alternifolia* desperta interesse para o desenvolvimento de novos fármacos. **Palavras-chave.** *Candida* spp, *Melaleuca alternifolia*, atividade antifúngica, óleo essencial.

ABSTRACT

Oral candidiasis is a fungal infection mostly common in people infected with HIV and the recurrent episodes occur in patients with AIDS. Aiming at searching, a new and efficacious drug against resistant strains, the antifungal activity of essential oil from *Melaleuca alternifolia* at different concentrations was assessed on yeasts isolated from oral candidiasis. The experiment was performed by using agar diffusion technique; and the antifungal effect was evaluated on the standard strains of *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida tropicalis* ATCC 157, *Candida glabrata* ATCC 30070, *Candida krusei* ATCC 6258 and *Candida dubliniensis* ATCC 778 157, and on the isolated from the oral cavity of HIV positive pregnant women, being seven *C. albicans*, one *C. tropicalis*, one *C. glabrata* and one *C. krusei*. The essential oil was analyzed in quantities of 20 and 50 µL at 10-100% concentrations, ranging from 10 to 10%. All of the tested strains were susceptible to the *M. alternifolia* essential oil at concentrations of 70% and 50% in volumes of 20 µL and 50 µL, respectively. The antifungal activity of essential oil from *M. alternifolia* holds one's attention in manufacturing new and effective drugs.

Key words. *Candida* spp, *Melaleuca alternifolia*, antifungal activity, essential oil.

INTRODUÇÃO

A candidíase bucal é a infecção fúngica mais comum em pacientes portadores do vírus HIV, podendo ocorrer em mais de 90% dos pacientes com Aids e, muitas vezes, com episódios recorrentes^{1,2}.

A espécie mais isolada é a *Candida albicans*, presente em 90% dos casos, seguida pelas espécies *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* e *Candida krusei*^{3,4}. A espécie *C. dubliniensis* tem sido associada à candidose bucal em portadores do HIV, porém com baixa prevalência^{5,6}.

A resistência do gênero *Candida* ao tratamento com antifúngicos tem sido atribuída a episódios recorrentes da infecção e exposição intermitente e contínua aos antifúngicos, sendo que as espécies não-*albicans* apresentam maior resistência à terapêutica, como observado com *C. krusei*, que apresenta resistência intrínseca ao fluconazol⁴. Em estudo realizado por Wingeter et al³, encontra-se 17% de resistência ou sensibilidade dose dependente aos azóis e à anfotericina B, em isolados de lesão na boca de pacientes HIV positivos, demonstrando que pode haver falha terapêutica no tratamento empírico.

Desta maneira, a qualidade de vida do paciente fica prejudicada, devido à dificuldade de deglutir os alimentos e pela necessidade de tratamento constante com drogas tóxicas. Assim, devido à diminuição da sensibilidade das leveduras aos antifúngicos convencionais, observou-se um aumento no interesse em utilizar produtos de origem natural com vistas a reduzir o tempo de tratamento e os efeitos colaterais.

O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (TTO) tem sido apontado como uma opção para o tratamento de infecções fúngicas causadas pelo gênero *Candida*, apresentando efeito antifúngico significativo^{7,8}. Constituído principalmente por terpenoides, é utilizado na Austrália por tribos aborígenes há mais de 80 anos e tem sido investigado quanto às suas propriedades farmacológicas. Apresenta ação antifúngica em leveduras do gênero *Candida* por alteração da permeabilidade da membrana, ocorrência de acidificação do meio devido à expulsão de prótons, sugerindo provável dano a membrana mitocondrial e comprometimento da produção de energia^{9,10}.

Diante do exposto, este estudo teve como objetivo investigar a ação antifúngica de diferentes concentrações do óleo essencial de *M. alternifolia*, frente a leveduras do gênero *Candida*, isoladas da cavidade bucal de gestantes HIV positivas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram empregadas cepas padrão de *C. albicans* ATCC 10231, *C. krusei* ATCC 6258, *C. tropicalis* ATCC 157, *C. glabrata* ATCC 30070 e *C. dubliniensis* ATCC 778157 e cepas isoladas de 8 gestantes com HIV que apresentavam candidose bucal, sendo 7 *C. albicans*, 1 *C. tropicalis*, 1 *C. glabrata* e 1 *C. krusei*. Estas cepas foram fornecidas pelo Laboratório de Biologia Médica do Instituto Adolfo Lutz de Taubaté-SP.

O óleo essencial de *M. alternifolia* foi obtido comercialmente pela Ferquima Indústria e Comércio Ltda. As concentrações utilizadas foram de 10 a 100%, variando de 10 em 10%, diluídas em óleo vegetal de amêndoas (Amêndoas leclerc- Leclerc Industrial Ltda) e armazenadas em tubos cônicos estéreis.

Como controle negativo, foi utilizado o nitrato de miconazol na concentração de 2% (20mg/mL) (Vodol®).

As leveduras foram semeadas em placas contendo agar Sabouraud-dextrose (Difco, Detroit, EUA) e mantidas a 37°C por 48h. A seguir, foram transferidas para tubos contendo 3 mL de solução fisiológica estéril a 0,9% e a concentração de leveduras ajustada à escala 0,5 de Mac Farland.

Para a técnica de Pour Plate, em placas de antibiograma pipetou-se 1 mL do inóculo homogeneizado pelo Vortex em 70mL de ágar Sabouraud-dextrose (Difco, Detroit, EUA) à 45-50°C na placa. Esta mistura foi homogeneizada e, após a solidificação do meio de cultura, foram perfurados poços de 5 mm de diâmetro, sendo um poço central e outros ao redor em posições equidistantes.

Para as cepas padrão, a ação antifúngica do óleo essencial de *M. alternifolia* e do óleo vegetal de amêndoas foi avaliada somente no volume de 20 µL.

Para as amostras isoladas da mucosa bucal, foram utilizadas placas distintas nas diluições 20µL ou 50µL do óleo essencial de *M. alternifolia* e óleo de amêndoas puro nos orifícios laterais e no orifício central 10µL do controle negativo (nitrato de miconazol a 2%). As placas foram mantidas por aproximadamente 5 horas à temperatura ambiente em cabine de fluxo laminar, para que as diluições do óleo essencial de *M. alternifolia*, óleo de amêndoas e controle negativo difundissem no meio de cultura. Após o período de pré-difusão, as placas foram incubadas a 37°C por 48h. Os ensaios foram realizados em duplicata.

Decorrido o período de incubação, realizou-se a leitura dos halos de inibição em milímetros.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos ensaios realizados com as cepas padrão e cepas isoladas da mucosa bucal no volume de 20 µL são apresentados na Tabela 1. Na Tabela 2, constam os resultados do volume de 50 µL. Não foi observada atividade antifúngica do óleo vegetal de amêndoas e todas as cepas estudadas apresentaram sensibilidade ao nitrato de miconazol, com halos de inibição que variaram de 25 a 44 mm. (Tabela 1)

As cepas avaliadas apresentaram sensibilidade frente às concentrações do óleo essencial de *M. alternifolia*, com destaque para cepa padrão de *C. dubliniensis*, que apresentou halos de inibição (>40 mm), a partir da concentração de 70% (Tabela 1). Esta cepa emergente em lesões bucais em paciente HIV positivos, é capaz de desenvolver resistência ao fluconazol *in vitro* mais rápido que a *C. albicans*¹⁰.

Todas as cepas de *C. albicans* isoladas da mucosa bucal no volume de 20 µL, apresentaram halos de inibição a partir

Tabela 1. Halos de inibição (mm) formados pela ação do óleo essencial de *M. alternifolia* (TTO) (20 µL) e nitrato de miconazol (10 µL) frente às cepas de *Candida* spp isoladas da cavidade bucal de gestantes HIV positivas e cepas padrão

Cepas	Óleo essencial de <i>Melaleuca. alternifolia</i> (%) e nitrato de miconazol (2%)									
	10-20	30	40	50	60	70	80	90	100	NM*
<i>C. albicans</i> ¹	0	0	0	8 ± 0	10 ± 2	12 ± 2	13 ± 2	15 ± 1	16 ± 2	40 ± 2
<i>C. tropicalis</i>	0	0	0	9	9 ± 2	12 ± 1	13	14 ± 1	16 ± 2	31 ± 3
<i>C. glabrata</i>	0	0	0	0	0	15 ± 1	15 ± 2	15	16	37 ± 2
<i>C. krusei</i>	0	0	0	0	11	12 ± 3	13	14 ± 1	16	25 ± 3
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0	0	8 ± 1	9	14 ± 2	15	16 ± 1	17 ± 1	21 ± 1	35 ± 2
<i>C. tropicalis</i> ATCC 157	0	0	0	8 ± 1	10 ± 2	15 ± 1	17	19	23 ± 2	28
<i>C. glabrata</i> ATCC 30070	0	0	0	0	8 ± 1	10 ± 2	11	12	13 ± 2	29 ± 1
<i>C. krusei</i> ATCC6258	0	0	0	0	9	10	11 ± 1	11 ± 1	13 ± 2	23 ± 2
<i>C. dubliniensis</i> ATCC 778157	0	10 ± 1	11 ± 1	18 ± 1	39 ± 2	>40	>40	>40	>40	40 ± 3

¹valores das médias e desvios padrões dos halos de inibição (mm) formados pelas 7 cepas de *C. albicans* isoladas da mucosa bucal

*NM: nitrato de miconazol

Resultados numéricos em mm

Tabela 2. Halos de inibição (mm) formados pela ação do óleo essencial de *M. alternifolia* (50 µL) frente às 10 cepas de *Candida* spp isoladas da cavidade bucal de gestantes HIV positivas

Cepas	Óleo essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i> (%)									
	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
<i>C. albicans</i> ¹	0	0	4 ± 4	8 ± 3	10 ± 1	11 ± 1	13 ± 1	14 ± 1	16 ± 1	17 ± 3
<i>C. tropicalis</i>	0	0	0	10 ± 1	11 ± 1	12 ± 1	13 ± 1	13 ± 1	14 ± 2	15 ± 2
<i>C. glabrata</i>	0	0	0	9 ± 1	11	11	14 ± 1	15 ± 2	16 ± 1	17 ± 2
<i>C. krusei</i>	0	0	0	0	9 ± 1	11	12 ± 1	14	15 ± 1	16 ± 1

¹valores das médias e desvios padrões dos halos de inibição (mm) formados pelas 7 cepas de *C. albicans* isoladas da mucosa bucal

Resultados numéricos em mm

da concentração de 50%, com variação dos halos de 8 a 16 mm (Tabela 1). Para o volume de 50 µL, 3 cepas de *C. albicans* apresentaram halos de inibição a partir da concentração de 30%; as outras 4 cepas, a partir da concentração de 40%, com variação de diâmetro de 4 a 17 mm. (Tabela 2)

O diâmetro dos halos de inibição formados pelas concentrações do óleo essencial de *M. alternifolia* foi menor do que o observado no nitrato de miconazol a 2% (20mg/mL). É possível que a inibição do óleo essencial de *M. alternifolia* não tenha sido maior pelo fato dos componentes de maior atividade antimicrobiana, como os terpenoides, possuírem baixa solubilidade em meios aquosos, impedindo o contato físico com o microrganismo em teste¹¹. Porém, foi observada sensibilidade de todas as cepas testadas, no volume de 20 µL, a partir da concentração de 70% (Tabela 1), e no volume de 50 µL, a partir da concentração de 50% (Tabela 2). Corroborando as considerações de Costa et al¹¹, é difícil comparar os resultados encontrados no presente estudo com os obtidos por outros trabalhos, pois são empregadas metodologias diferentes, e a composição do óleo essencial pode variar, dependendo do local de plantio, condições de cultivo e época de colheita.

As cepas de *C. albicans* e *C. tropicalis* apresentaram-se mais sensíveis em relação às cepas de *C. krusei* e *C. glabrata*. O mesmo foi demonstrado por Mondello et al¹², que testaram o óleo essencial de *M. alternifolia* em várias cepas do gênero *Candida*, isoladas de pacientes HIV-positivos, e obtiveram Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) menores para cepas de *C. tropicalis*, e maiores para as cepas de *C. krusei* e *C. glabrata*. Hammer et al¹³ observaram um CIM maior para as cepas de *C. glabrata* do que para *C. albicans* e *C. parapsilosis*. Vazquez et al¹⁴ testaram cepas de pacientes com candidemia, candidose de orofaringe sintomática, candidose de esofaringe e colonização assintomática, observando menor atividade antifúngica do óleo essencial de *M. alternifolia* em *C. glabrata* e menores CIMs contra *C. albicans*. Neste estudo, a menor sensibilidade foi observada em *C. krusei*, levedura de resistência conhecida ao fluconazol¹⁵.

Estudos *in vivo* têm sido realizados para avaliar o efeito do óleo essencial de *M. alternifolia* no tratamento de infecções causadas por leveduras do gênero *Candida*^{16,17}. Jandourek et al¹⁶ realizaram um estudo clínico em que avaliaram o efeito de uma solução de óleo essencial de *M. alternifolia* em pacientes HIV-positivos com candidose bucal e obtiveram significativa resposta contra as leveduras do gênero *Candida in vivo*.

Para o tratamento de estomatite protética, foram avaliados 27 pacientes por 12 dias de tratamento com uma

mistura de óleo essencial de *M. alternifolia* e Coe-Comfort, um condicionador de tecidos. A partir do terceiro dia, ocorreu diminuição da colonização por leveduras do gênero *Candida* e diminuição da inflamação do palato. Os autores sugeriram usar esta associação como terapia alternativa contra a estomatite protética resistente às terapias convencionais¹⁷.

Wingeter et al³ discutiram a alta taxa de resistência dessas leveduras aos antifúngicos convencionais, ressaltando que estes fatos poderiam estimular as indústrias farmacêuticas a diversificar o arsenal terapêutico para a candidose bucal e oferecer novas opções de drogas antifúngicas para o uso tópico em mucosas, tendo em vista a grande ingestão de medicamentos por via oral pelos portadores do HIV.

CONCLUSÃO

As cepas de candidose bucal mostraram sensibilidade frente às diversas concentrações do óleo essencial de *M. alternifolia*, com 100% sensibilidade das leveduras do gênero *Candida*, a partir das concentrações de 70% e 50% nos volumes de 20 µL e 50 µL, respectivamente. Os resultados demonstraram o potencial antifúngico do óleo essencial de *M. alternifolia*, despertando o interesse para o desenvolvimento de novos fármacos.

REFERÊNCIAS

1. Souza LB, Pinto LP, Medeiros AMC, Araújo Junior RF, Mesquita OJX. Manifestações orais em pacientes com AIDS em uma população brasileira. *Pesqui Odontol Bras*. 2000; 14 (1): 79-85.
2. Shmidt-Westhausen AM, Bendick C, Reichart PA, Samaranyake LP. Oral candidosis and associated *Candida* species in HIV-infected Cambodians exposed to antimycotics. *Mycoses*. 2004; 47: 435-1.
3. Wingeter MA, Guilhermetti E, Shinobre CS, Takaki I, Svidizinski IE. Identificação microbiológica e sensibilidade *in vitro* de *Candida* isoladas da cavidade oral de indivíduos HIV positivos. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007; 40 (3): 272-6.
4. Sant'Ana PL, Milan EP, Martinez R, Queiroz-Telles F, Ferreira MS, Alcântara AP et al. Multicenter brazilian study of oral *Candida* species isolated from aids patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002; 97 (2): 253-7.
5. Chavasco JK, Paula CR, Hirata MH, Aleva NA, Melo CE, Gambale W et al. Molecular identification of *Candida dubliniensis* isolated from oral lesions of HIV-positive and HIV-negative patients in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2006; 48 (1): 21-6.

6. Mariano PLS, Milan EP, Matta DA, Colombo AA. *Candida dubliniensis* identification in brazilian yeast stock collection. *Mem Ins Oswaldo Cruz*. 2003; 98 (4): 533-8.
7. Cox SD, Mann CM, Markham JL, Gustafson JE, Warmington JR, Wyllie SG. Determining the antimicrobial actions of tea tree oil. *Molecules*. 2001; 6: 87-91.
8. Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warmington JR et al. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J Appl Microbiol*. 2000; 88: 170-5.
9. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J Antimicrob Chemother*. 2004; 53: 1081-5.
10. Silva CJ, Barbosa LCA, Maltha CRA, Pinheiro AL, Ismail FMD. Comparative study of the essential oils of seven *Melaleuca* (Myrtaceae) species grown in Brazil. *Flavour Frag J*. 2007; 22: 474-8.
11. Costa ACBP, Pereira CA, Freire F, Junqueira JC, Jorge AOC. Atividade antifúngica dos extratos glicólicos de *Rosmarinus officinalis* Linn. e *Syzygium cumini* Linn. sobre cepas clínicas de *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*. *Rev Odontol UNESP*. 2009; 38 (2): 111-6.
12. Mondello F, Bernardis F, Girolamo A, Salvatore G, Cassoni A. *In vitro* and *in vivo* activity of tea tree oil against azole-susceptible and- resistant human pathogenic yeasts. *J Antimicrob Chemother*. 2003; 51: 1223-9.
13. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. *In vitro* activity of essential oils, in particular *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and tea tree oil products, against *Candida* spp. *J Antimicrob Chemother*. 1998; 42: 591-5.
14. Vazquez JA, Arganoza MT, Boikov D, Vaishampayan JK, Akins RA. *In vitro* susceptibilities of *Candida* and *Aspergillus* species to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Rev Iberoam Micol*. 2000; 17: 60-3.
15. Silva JO, Franceschini AS, Candido RC. Presença de leveduras em mucosas e fezes de indivíduos aparentemente saudáveis e de pessoas com sintomas de infecção fúngica. *Rev Ins Adolfo Lutz*. 2002; 61(2): 113-20.
16. Jandourek A, Vaishampayan JK, Vazquez JA. Efficacy of melaleuca oral solution for the treatment of fluconazole refractory oral candidiasis in AIDS patients. *AIDS*. 1998; 12: 1022-37.
17. Catalán A, Pacheco JG, Martínéz A, Mondaca MA. *In vitro* and *in vivo* activity of *Melaleuca alternifolia* mixed with tissue conditioner on *Candida albicans*. *Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008; 105: 327-32.

Avaliação do controle da qualidade realizado nos produtos vacinais para sarampo, caxumba e rubéola utilizados no Programa Nacional de Imunizações do Brasil no período de 1999 a 2007

Evaluation of the quality control data records for the measles, mumps, rubella vaccine products used in the Brazilian National Immunization Program in the period from 1999 to 2007

RIALA6/1307

Eduardo Jorge Rabelo NETTO¹, Eduardo Chaves LEAL¹, Isabella Fernandes DELGADO¹, Katia Christina LEANDRO^{2*}

¹Departamento de Imunologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, FIOCRUZ-RJ. Telefone: (21) 3865-5180. E-mail: eduardo.netto@incqs.fiocruz.br, eduardo.leal@incqs.fiocruz.br, isabella.delgado@incqs.fiocruz.br

^{2*}Departamento de Química, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, FIOCRUZ-RJ. Avenida Brasil, 4365 - CEP: 21.045-900, Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil. Telefone: (21) 3865-5180. email: katia.leandro@incqs.fiocruz.br

Recebido: 16.03.2010 – Aceito para publicação: 10.08.2010

RESUMO

Os registros de controle da qualidade dos produtos vacinais contra sarampo, caxumba e rubéola (VSCR), utilizados no Programa Nacional de Imunizações do Brasil, no período de 1999 a 2007, foram avaliados por meio de levantamento de dados provenientes do Sistema de Gerenciamento de Amostras do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da FIOCRUZ. Foram analisados 512 lotes da vacina, produzidos por nove laboratórios distintos, quanto ao registro de dados do controle de qualidade das VSCR, por meio dos seguintes parâmetros: (i.) análise dos protocolos de produção e de controle de qualidade do produto emitidos pelo fabricante; (ii.) ensaio de potência; (iii.) ensaio de identidade; (iv.) ensaio de termostabilidade; (v.) ensaio de esterilidade bacteriana e fúngica; e (vi.) teor de umidade residual. Resultados insatisfatórios foram encontrados nos lotes de vacinas utilizadas nos anos de 1999 e 2001, com desvios nos parâmetros de qualidade e de conformidade em 12 lotes utilizados em 1999 e 11 lotes, em 2001, produzidos por quatro diferentes laboratórios. Os registros da qualidade de lotes de vacinas, empregadas a partir de 2002, apresentaram parâmetros satisfatórios, o que indica conformidade com a Farmacopeia Brasileira e assegura a qualidade do produto utilizado no país.

Palavras-chave. controle da qualidade, vacina sarampo, caxumba, rubéola (VSCR), Brasil.

ABSTRACT

This study aimed at evaluating the quality control protocols attested on the measles, mumps and rubella vaccines by manufacturers, and being used in the Brazilian National Immunization Program from 1999 to 2007. Analytical data on the protocols of 512 vaccine batches attested by respective manufacturers, and kept at INCQS/FIOCRUZ - Sample Management System, were analyzed. Vaccines produced by nine different laboratories, were evaluated considering: (i) potency testing, (ii) identity assay, (iii) thermo stability, (iv) bacterial and fungal sterility assay, (v) residual humidity contents, and (vi) vaccine production and respective quality control protocols stated by manufacturers. Unsatisfactory findings on quality were detected in 12 and 11 vaccine batches, produced by four laboratories, which were employed by Vaccination Program in 1999 and 2001, respectively. From 2002 on, all the vaccines quality data have been satisfactory, and in compliance with the Brazilian Pharmacopeia parameters.

Key words. quality control, measles, mumps, rubella vaccine (MMR), Brazil.

INTRODUÇÃO

A história do controle da qualidade oficial dos imunobiológicos utilizados no Brasil se inicia em 1973¹, por determinação do Ministério da Saúde, com a institucionalização do Programa Nacional de Imunizações (PNI). Essa iniciativa teve como objetivo principal estimular e expandir a utilização de agentes imunizantes, tanto de origem nacional quanto internacional, buscando a integridade e a uniformidade das ações relativas às imunizações realizadas no país. As legislações específicas sobre imunizações² e vigilância epidemiológica³ deram ênfase às atividades permanentes de vacinação e contribuíram para fortalecer institucionalmente o PNI, que passou, então, a coordenar as ações de imunizações, que até aquele momento se caracterizavam pela descontinuidade, pelo caráter episódico e pela reduzida área de cobertura^{4,5}.

Apesar dos esforços, a cobertura vacinal cresceu de forma lenta nos primeiros anos de criação do PNI. Assim, em 1979, a fim de minimizar os problemas enfrentados pelo governo brasileiro, criou-se uma comissão interministerial, que recomendava maior apoio ao desenvolvimento de vacinas nacionais, bem como a criação de estratégias para avaliação da qualidade destes produtos.

Nesse contexto, em 1983, o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), integrante pleno da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), como órgão público federal que atende ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, assume a responsabilidade pelo controle oficial da qualidade de todos os lotes de imunobiológicos a serem utilizados pelo PNI^{4,5}. A partir desse momento, seguindo critérios preconizados pela Organização Mundial de Saúde (OMS), passa a haver a obrigatoriedade de análise laboratorial (*i.e.* ensaios físicos, químicos e biológicos) e também documental (*i.e.* protocolo resumido de produção e controle de qualidade emitido pelo fabricante) pelo laboratório oficial de controle nacional, previamente à distribuição de tais produtos destinados ao consumo humano. Tal obrigatoriedade não se restringe unicamente aos produtos imunobiológicos de produção nacional; diz respeito também aos produtos importados.

Já em 1985, o INCQS realizava análises laboratoriais de uma diversidade de vacinas virais, entre elas poliomielite, sarampo, febre amarela e raiva; das vacinas bacterianas BCG, DTP, dT e de soros hiperimunes (antitóxicos, anti-peçonhentos e anti-rábico) adquiridos pelos programas oficiais de imunização⁶. No período entre 1989 e 2006, esse instituto passa a integrar o grupo de laboratórios

colaboradores da OMS e, como tal, começa a atuar na realização de análises laboratoriais de uma variedade de vacinas (BCG, meningite meningocócica, pertussis, raiva e pólio) utilizadas em programas oficiais de imunizações de outros países, participando também na avaliação da qualidade de vacinas candidatas à pré-qualificação junto a OMS⁷.

A vacina sarampo, caxumba, rubéola (VSCR) foi registrada no início da década de 1970 e é utilizada no Brasil desde 1992^{8,9}. A introdução desta vacina representou um avanço em termos de eficiência da imunização infantil, uma vez que, a partir de uma única injeção, confere-se proteção contra três doenças distintas, diminuindo custos e simultaneamente aumentando a cobertura vacinal¹⁰. Esta abordagem é especialmente vantajosa em países como o Brasil, com dimensões continentais e regiões de difícil acesso. Desde o início de sua utilização, a VSCR é avaliada quanto a sua qualidade pelo INCQS. Esta vacina, preparada a partir de vírus vivos atenuados de sarampo (cepas Edmonston - Zagreb, Schwarz, AIK-C ou CAM-70), vírus vivos atenuados de caxumba (cepas Jeryl Lynn, Urabe AM/9, Leningrado-Zagreb ou Rubini) e vírus vivos atenuados de rubéola (RA 27/3, TO-336), é indicada a partir dos 12 meses de idade, preferencialmente aplicada aos 15 meses, em dose única, com reforço a ser aplicado entre 4 a 6 anos de idade¹¹. Todos os três componentes desta vacina são altamente imunogênicos e eficazes, conferindo imunidade duradoura por praticamente toda a vida. A proteção inicia-se cerca de duas semanas após a vacinação e a soroconversão é de aproximadamente 95%¹². Sua implantação no país iniciou-se em 1992 no estado de São Paulo para faixa etária de 1 a 10 anos. No ano seguinte, a vacina foi implantada no Distrito Federal sendo oferecida para crianças a partir de 1 ano de idade. Em 1995 foi implantada no Espírito Santo e no Paraná, para a faixa etária de 1 a 11 anos, e em 1996 nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e Santa Catarina, preconizada, para esta mesma faixa etária. No ano de 1997, Piauí, Ceará, Bahia e Rio Grande do Sul receberam pela primeira vez a VSCR, também preconizada para a faixa etária compreendida entre 1 a 11 anos¹³. Em 1998, foi a vez dos estados brasileiros Rio Grande do Norte, Paraíba, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso e, em 1999, do Maranhão, Goiás e Sergipe. Finalmente, em 2006, através da Portaria nº 1.602, de 17 de Julho de 2006, institui-se em todo o território nacional, o calendário de vacinação da criança, do adolescente, do adulto e do idoso, contemplando a VSCR como uma das vacinas integrantes destes calendários⁸.

O controle da qualidade da VSCR, assim como dos demais produtos imunobiológicos, é realizado lote a lote e segue a Farmacopeia Brasileira, onde estão estabelecidos os requisitos que a vacina deve obrigatoriamente obedecer¹⁴.

O presente estudo teve como objetivo principal conduzir uma análise retrospectiva dos dados relacionados ao controle da qualidade de todos os lotes de VSCR analisados pelo instituto oficial de controle nacional, no período compreendido entre 1999 e 2007, no âmbito do PNI. Para isso, dados oriundos do Sistema de Gerenciamento de Amostras (SGA) do INCQS foram avaliados, contemplando as diversas etapas do processo de controle da qualidade, entre elas, (i.) a análise documental do protocolo resumido de produção e controle de qualidade do fabricante e (ii.) a análise dos resultados provenientes dos ensaios físicos, químicos e biológicos realizados em nosso instituto. Assim esperamos, através da avaliação dos resultados, verificar a qualidade e segurança de VSCR utilizada no Brasil, comprovando a importância desse estudo para a saúde pública do país.

MATERIAL E MÉTODOS

O Sistema de Gerenciamento de Amostras (SGA) do INCQS permitiu o acompanhamento das análises de produtos, desde seu ingresso no instituto até a emissão do laudo de análise, que é liberado somente após análise laboratorial e/ou análise de protocolo resumido de produção e controle de qualidade emitido pelo fabricante. Foram analisados 512 lotes, no período de 1999 a 2007, de nove laboratórios produtores distintos, designados por A, B, C, D, E, F, G, H e I. Compuseram a análise relativa ao controle de qualidade da VSCR, os seguintes parâmetros: (i.) análise do protocolo resumido de produção e controle de qualidade do produto emitido pelo fabricante, (ii.) ensaio de potência, (iii.) ensaio de identidade, (iv.) ensaio de termoestabilidade, (v.) ensaio de esterilidade bacteriana e fúngica e (vi.) teor de umidade residual. No caso dos itens (ii.), (iii.) e (iv.), os ensaios são realizados individualmente para cada um dos três componentes (sarampo, caxumba e rubéola) presentes na vacina. Todos os ensaios laboratoriais, a partir do ano de 2000, passaram a obedecer aos valores de referência citados na Farmacopeia Brasileira¹⁴. Antes desse ano, estes valores estavam descritos nos compêndios OMS^{15,16}, conforme Tabela 1.

Através de consultas ao SGA, tivemos acesso ao acompanhamento das análises, levantamento de dados históricos e aos demais relatórios gerenciais, permitindo uma avaliação detalhada das informações provenientes

de cada lote de produto analisado pelo INCQS. Foram obtidos os dados das amostras de VSCR de 1999 a 2007, que possibilitaram a realização de análises críticas dos parâmetros estudados, como: número de lotes recebidos, características de cada lote (e.g. tamanho do lote, número de doses e procedência), frequência de resultados satisfatórios e insatisfatórios, causas da insatisfatoriedade, concordância dos resultados analíticos entre INCQS e o laboratório produtor (através de análise dos dados presentes no protocolo resumido de produção e controle de qualidade), consistência de produção, entre outros.

Tabela 1. Natureza das análises realizadas para a VSCR e seus valores de referência¹⁴⁻¹⁶

Natureza das Análises	Valores de Referência
Análise Documental Protocolo de produção e controle da qualidade	—
Potência e Identidade	
Sarampo	$\geq 10^{3.0}$ CCID ₅₀ ^a /dose
Caxumba	$\geq 10^{3.7}$ CCID ₅₀ /dose
Rubéola	$\geq 10^{3.0}$ CCID ₅₀ /dose
Termoestabilidade	
Sarampo	Perda $\leq 1,0$ log10 e título $\geq 10^{3.0}$ CCID ₅₀ /dose
Caxumba	Perda $\leq 1,0$ log10 e título $\geq 10^{3.7}$ CCID ₅₀ /dose
Rubéola	Perda $\leq 1,0$ log10 e título $\geq 10^{3.0}$ CCID ₅₀ /dose
Esterilidade bacteriana e fúngica	Ausência de bactérias e fungos
Teor de umidade residual	$\leq 2,0\%$

^aCCID₅₀: quantidade de vírus que infecta 50% de cultura de células

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verificou-se que no período estudado foram analisados 512 lotes de VSCR de nove laboratórios produtores distintos, designados por A, B, C, D, E, F, G, H e I. Detalhes sobre as cepas de vírus vivo atenuado, usadas para cada um dos componentes presentes nas vacinas analisadas, estão descritos na Tabela 2.

Nos últimos anos, observa-se na literatura científica um intenso debate a respeito da reatogenicidade das

diferentes cepas vacinais presentes na VSCR^{13,17-20}. Entre os eventos adversos associados a algumas cepas de caxumba, destaca-se a meningite asséptica pós-vacinal, que, embora apresente um curso benigno, representa um aumento no número de internações e exames laboratoriais complementares, sobretudo após as campanhas de vacinação em massa. Segundo Tesovic e Lesnikar²¹, as cepas L. Zagreb e Urabe se equivalem em termos de neurovirulência, *i.e.* cerca de 50 casos de meningite asséptica em cada 100.000 doses de vacina, índice bem maior que o observado para as cepas de baixa reatogenicidade, como Jeryl Lynn e RIT4385.

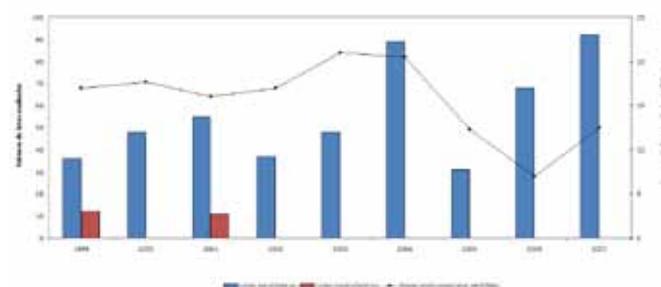
Tabela 2. Cepas de vírus vivos atenuados das VSCR analisadas pelo INCQS

Laboratório	Sarampo	CEPAS	
		Caxumba	Rubéola
A	Schwarz	Urabe	RA27/3
B	Edmonston-Zagreb	L. Zagreb	RA27/3
C	Schwarz	Urabe	RA27/3
D	Schwarz	Urabe	RA27/3
E	Schwarz	Urabe	RA27/3
F	Schwarz	Jeryl Lynn	RA27/3
G	Schwarz	Urabe AM-9	RA27/3
H	Schwarz	Urabe	RA27/3
I	Edmonston-Zagreb	Jeryl Lynn	RA27/3

A Figura 1 mostra a variação do número de lotes e doses de VSCR analisados no INCQS no período de 1999 a 2007. Pode-se observar que nem sempre há uma relação direta entre o número de lotes/ano e o número de doses/ano. Tal fato deve-se às diferenças existentes entre os diversos laboratórios produtores em termos de apresentação do produto (unidose ou 10 doses) e tamanho dos lotes. Observa-se, ainda, um acréscimo de doses nos anos de 2003 e 2004, que se deveu a um plano de intensificação de ações preventivas e de vigilância do sarampo. Assim, visando evitar a reintrodução do vírus no país, houve campanhas de vacinação da população brasileira nas unidades de saúde e nos locais de grande circulação de pedestres, como em feiras livres, comércios, mercados, rodoviárias e outros. Além disso, à época ainda existia, em diversas unidades federadas do Brasil, a transmissão do vírus e surtos de rubéola de grande importância, apesar dos esforços de vacinação dirigida às mulheres de idade fértil^{22,23}. Deste modo, em 2003 foi estabelecida a meta de eliminação da rubéola e da Síndrome da Rubéola Congênita (SRC)

nas Américas até o ano de 2010^{24,25}, sendo fundamental não só assegurar uma vigilância de qualidade, mas manter coberturas vacinais altas e homogêneas para interromper a circulação viral, reduzindo o risco de exposição de gestantes suscetíveis.

Como pode ser observado na Figura 1, somente nos anos de 1999 e 2001 foram encontrados resultados insatisfatórios para VSCR adquiridas pelo PNI. Somando os anos de 1999 e 2001, foram detectados desvios de qualidade e conformidade em 23 lotes (12 lotes em 1999 e 11 lotes em 2001) de vacinas provenientes de quatro diferentes laboratórios produtores (A, B, C e G).



No ano de 1999, dos resultados insatisfatórios obtidos, 50% corresponderam ao laboratório produtor B (6 lotes) que apresentou resultados insatisfatórios para o componente caxumba, sendo 42% em relação ao ensaio de termoestabilidade e 8% nos ensaios de potência e termoestabilidade. Ainda no mesmo ano, 25% das insatisfatoriedades (3 lotes) foi do Produtor G, que apresentou resultado insatisfatório em relação à análise documental, e 25% do Produtor A (3 lotes), que apresentou resultados insatisfatórios em relação ao ensaio de potência de caxumba (cujas amostras foram enviadas para análise prévia com objetivo de petição de registro junto a Agência Nacional de Vigilância Sanitária); estimando-se um total de 2.750.000 doses insatisfatórias nesse ano.

Em 2001, o laboratório produtor C apresentou 100% de seus lotes insatisfatórios (11 lotes) em relação à análise documental, correspondendo a 2.200.000 doses, aproximadamente.

A porcentagem de doses insatisfatórias, em relação ao total de doses fornecidas ao PNI, relativa aos anos de 1999 e 2001 foi de 4,04% e 3,44%, respectivamente.

As Tabelas 3 e 4 demonstram o número de lotes de VSCR analisados pelo INCQS nos anos de 1999 a 2007. De acordo com o Ministério da Saúde do governo brasileiro, as prioridades de produção no âmbito nacional

e aquisição de imunobiológicos importados são para produtos que atendam às necessidades epidemiológicas nacionais. Assim, podemos observar que, a partir do ano de 2004, o laboratório produtor F assume a liderança no fornecimento da VSCR, atendendo à demanda gerada pelo quadro epidemiológico do país. No triênio de 2005 a 2007, mais de 80% dos lotes de VSCR analisados pelo INCQS foram provenientes deste laboratório produtor (Tabela 4).

O monitoramento permanente da qualidade de todos os lotes de vacinas foi fundamental para uma diminuição do percentual de reprovação dos produtos imunobiológicos, utilizados pelos programas oficiais no Brasil, e utilizados em larga escala pela população brasileira. Neste contexto, vale lembrar que, embora a

vacinação contra doenças infecciosas seja provavelmente uma das intervenções em saúde pública de maior efetividade e que apresente uma ótima relação custo-benefício, deve-se sempre considerar a importância tanto do processo de controle da qualidade destes produtos, como da vigilância epidemiológica de eventos adversos pós-vacinais. Associada ao controle de qualidade, a vigilância epidemiológica desses produtos é de extrema importância, já que na maioria dos casos, os programas de vacinações destinam-se a um grande número de indivíduos e à população saudável^{26,27}. Sendo assim, falhas neste processo e eventos adversos sérios, ainda que pouco frequentes, podem impactar negativamente a credibilidade nessa e em outras políticas públicas de saúde.

Tabela 3. Lotes de vacina sarampo, caxumba, rubéola analisados pelo INCQS – 1999 a 2007

Produtores	Número de lotes analisados/ano									
	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	
A	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	-	-	26	-	-	1	2	-	-	-
D	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	-	-	10	21	23	21	-	-	-	16
F	-	-	-	-	-	49	29	52	75	
G	30	33	30	16	25	18	-	-	-	
H	-	15	-	-	-	-	-	-	-	
I	-	-	-	-	-	-	-	16	-	
Total de lotes analisados/ano	48	48	66	37	48	89	31	68	91	

Tabela 4. Percentual de lotes de vacina sarampo, caxumba, rubéola analisados pelo INCQS - 1999 a 2007

Produtores	% lotes analisados		
	1999 a 2001	2002 a 2004	2005 a 2007
A	1,8	0	0
B	8,6	0	0
C	16,1	0,6	1,1
D	0,6	0	0
E	6,2	37,3	8,4
F	0	28,2	82,1
G	57,4	33,9	0
H	9,3	0	0
I	0	0	8,4

Dentre os nove laboratórios produtores avaliados, quatro apresentaram resultados insatisfatórios nos anos de 1999 e 2001, mas, a partir de 2002, todos os resultados obtidos foram satisfatórios em relação às análises laboratoriais e documentais, assegurando qualidade ao produto utilizado no país, sob o ponto de vista do processo industrial e em conformidade com a Farmacopeia Brasileira. Embora este processo tenha como objetivo avaliar as especificações definidas em normas oficiais e/ou no registro sanitário, a relação de ensaios preconizados nos compêndios oficiais, e conduzidos mundialmente nos laboratórios oficiais de controle da qualidade para fins de liberação de lote de imunobiológicos, não apresenta potencial preditivo para detecção de todo e qualquer tipo de evento adverso; alguns destes eventos serão detectados apenas em campo. Assim sendo, destaca-se a necessidade de um sistema de farmacovigilância ágil, seguro e eficiente

Neste contexto, vale lembrar que no Brasil, durante a campanha de vacinação de 2004, foram constatados mais de 200 casos de reações alérgicas, incluindo *rash* cutâneo, urticária, angioedema e choque anafilático (sem registro de óbitos), em crianças com idade entre 0 e 4 anos que haviam recebido a VSRC. As autoridades brasileiras da área da saúde, através da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), identificaram que os eventos adversos notificados estavam associados a um dos laboratórios produtores (Laboratório G) e que, neste caso, tais eventos foram significativamente mais frequentes entre crianças que receberam a vacina deste laboratório produtor (7,40/100.000 doses aplicadas), do que dos laboratórios produtores E (0,78/100.000 doses) e F (0,21/100.000 doses) [*dados não publicados*]. Na ocasião, a SVS recolheu 5,7 milhões de doses produzidas pelo laboratório produtor G²⁸. Em 2005, este mesmo laboratório forneceu cerca de 5 milhões de doses do produto, sobretudo para países em desenvolvimento, por meio do Fundo das Nações Unidas para a Infância (Unicef) e da Organização Pan-americana de Saúde (OPAS). Porém, no ano de 2006, o próprio laboratório produtor G anunciou o recolhimento dos lotes de VSCR por ele produzidos, alegando como motivação para tal decisão os altos níveis de eventos adversos pós-vacinação.

Assim, mais uma vez, destaca-se: (i.) a necessidade da estreita relação entre as esferas de atuação responsáveis pelo “controle da qualidade pré-vacinal” e “farmacovigilância”; (ii.) que esta parceria é fundamental para assegurar a qualidade do produto, sob o ponto de vista do seu processo produtivo, e também para prevenir e/ou minimizar a morbidade relacionada a eventos adversos;

e (iii.) quanto mais eficiente tal parceria, mais ágeis serão as decisões regulatórias e as intervenções resultantes deste processo. Tal estratégia é fundamental para a garantia da qualidade do produto final, além de fortalecer os programas oficiais de imunização e torná-los aptos a atenderem efetivamente às necessidades da população, contribuindo como medida pronta, eficaz e segura de promoção da saúde e proteção individual e coletiva.

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Saúde. Programa Nacional de Imunizações. PNI 25 anos. Brasília: Fundação Nacional de Saúde/MS, 1998.
2. Brasil. Lei nº 6259, de 30 de outubro de 1975. Dispõe sobre a organização das ações de vigilância epidemiológica, sobre o programa nacional de imunizações, estabelece normas relativas à notificação compulsória de doenças, e da outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 31 out. 1975. Seção 1. p. 014433.
3. Brasil. Decreto nº 7.8231, de 12 de agosto de 1976. Regulamenta a Lei nº 6.259, de 30 de outubro de 1975, que dispõe sobre a organização das ações de vigilância epidemiológica, sobre o programa nacional de imunizações, estabelece normas relativas a notificação compulsória de doenças, e da outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 13 ago. 1976. Seção 1. p. 010731.
4. Buss PM, Temporão JG, Carneiro JR. Vacinas, soros e imunizações no Brasil. Capítulo 5: Programa Nacional de Imunizações (PNI): história, avaliação e perspectivas. Temporão JG, Nascimento MVL, Maia MLS, p.101-123. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2005.
5. Ponte, CF. Vacinação, controle de qualidade e produção de vacinas no Brasil a partir de 1960. História, Ciência, Saúde - Manguinhos 2003; 10 (suppl.2): 619-53.
6. Temporão JG. Brazil's national immunization program: origins and development. História, Ciência, Saúde - Manguinhos 2003; 10 (suppl.2): 601-17.
7. Gemal AL, Leal EC. Vacinas, soros e imunizações no Brasil. Capítulo 7: Controle de Qualidade dos Imunobiológicos: participação do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS). Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2005. p. 131-44.
8. Weckx LY, Carvalho ES. Calendário Vacinal: dinâmica e atualização. J Pediat. 1999; 75 (supl.1): 149-54.

9. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 61, de 25 de agosto de 2008. Dispõe sobre critérios para harmonização de nomenclatura de soros e vacinas. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 26 de agosto de 2008.
10. Jefferson T, Price D, Demicheli V, Bianco E. Unintended events following immunization with MMR: a systematic review. *Vaccine*. 2003; 21: 3954-60.
11. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasil livre da Rubéola: Campanha Nacional de Vacinação para Eliminação da Rubéola, Brasil, 2008: relatório. Brasília: Ministério da Saúde; 2009. 196p.
12. Forleo Neto E, Carvalho ES, Fuentes ICP, Precivale MS, Forleo LHA, Farhat CK. Soroconversão da vacina tríplice viral em crianças de 9 e 15 meses de idade. *Rev Paul Pediat*. 1998; 16(2): 99-103.
13. Lucena R, Gomes I, Nunes L, Cunha S, Dourado I, Teixeira MG et al. Características clínicas e laboratoriais da meningite asséptica associada à vacina tríplice viral. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Publ Health*. 2002; 12 (4): 258-61.
14. Farmacopéia Brasileira (2000). 4ed. pt 2, fasc. 2. São Paulo: Editora Atheneu; 2000.
15. World Health Organization. WHO Technical Report Series 840. Requirements for measles, mumps and rubella vaccines and combined vaccine. 1997; p. 104-6.
16. World Health Organization. WHO Expert Committee on Biological Standardization – WHO Technical Report Series 840. 1994; 224p.
17. Cunha SC, Dourado I. MMR mass vaccination campaigns, vaccine-related adverse events, and the limits of the decision making process in Brazil. *Health Pol*. 2004; 67: 323-8.
18. Bonnet MC, Dutta A, Weinberger C, Plotkin SA. Mumps vaccine virus strains and aseptic meningitis. *Vaccine*. 2006; 24: 7037-45.
19. Kulkarni PS, Phadke MA, Jadhav SS, Kapre SV. No definitive evidence for L-Zagreb mumps strain associated aseptic meningitis: a review with special reference to the da Cunha study. *Vaccine*. 2005; 23: 5286-8.
20. Cunha SC, Barreto ML, Dourado MI, Rodrigues LC. On “No definitive evidence for L-Zagreb mumps strain associated aseptic meningitis: a review with a special reference to the da Cunha study, *Vaccine* 2005; 23:5286-8 by Kulkarni PS et al. *Vaccine*. 2006; 21: 4261-2.
21. Tesovic G, Lesnikar V. Aseptic meningitis after vaccination with L-Zagreb mumps strain – virologically confirmed cases. *Vaccine*. 2006; 24: 6371-3.
22. Faversani MCSS, Kupek E, Westrupp MHB. Perfil epidemiológico do sarampo no Estado de Santa Catarina, Brasil, de 1996 a 2000. *Cad S Públ (RJ)*. 2005; 21(2): 535-44.
23. Campos RMC, Sandini E. Resultados obtidos na campanha de vacinação contra rubéola e sarampo, em mulheres, por região do município de Taubaté, São Paulo. *Acta Paul Enf*. 2004; 17(1): 25-30.
24. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação Geral do programa Nacional de Imunizações. Nota Técnica nº 99: Modificações a serem feitas no calendário básico de vacinação do Programa Nacional de Imunizações a partir de janeiro de 2004, de 26 de dezembro de 2003, Brasília, Brasil.
25. Secretaria de Estado da Saúde e Defesa Civil. Informe Técnico: Rubéola – Rio de Janeiro – 2007, de 18 de maio de 2007, Rio de Janeiro, Brasil.
26. Silva LJ. Vacinação, segurança de imunobiológicos e direitos do cidadão. *Rev S Públ (SP)*. 1996; 30(4): 297-8.
27. Succi RCM, Farhat CK. Vaccination in special situations. *J Pediat*. 2006; 82 (3): S91-S100.
28. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Portal do consumidor - Notícias (20/03/2006): Fabricantes de vacina tríplice anuncia recall; Brasil teve problemas. [acesso 17 set. 2009]. Disponível em: [<http://www.portaldodoconsumidor.gov.br/noticias.asp?busca=sim&id=5457>].

Quantificação do retinol em leite de cabra e sua importância na alimentação infantil

Determining the retinol contents in goat milk and its nutritious value in the infant feeding

RIALA6/1308

Roberto DIMENSTEIN^{1*}, Ciro Uchôa de MELO², Lígia Rejane Siqueira GARCIA³, Larissa Queiroz de LIRA⁴

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

¹Laboratório de Bioquímica de Alimentos e Nutrição, Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte

²Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Professor substituto do Curso de Biologia

³Secretaria de Estado da Saúde Pública - Governo do Rio Grande do Norte

⁴Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Recebido: 27.03.2010 – Aceito para publicação: 06.08.2010

RESUMO

O leite de cabra apresenta grande importância para a política de produção de alimentos no Nordeste brasileiro, fato que, somado a seu reconhecido valor nutricional, o faz assumir papel na alimentação complementar das crianças dessa região. Assim, o objetivo deste trabalho foi determinar a concentração de retinol em leite de cabra e verificar sua adequação quanto à necessidade nutricional de crianças de 7 a 36 meses. Sessenta e oito amostras foram coletadas de animais com peso, idade, período de lactação e alimentação semelhantes, provenientes da região semiárida do Rio Grande do Norte, Brasil. O teor de retinol foi obtido por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e sua contribuição para a ingestão de vitamina A foi estimada utilizando recomendações para a faixa etária em questão. Foi encontrado $38,5 \pm 12,7$ mg/100mL de retinol no leite de cabras da raça Saanen e $40,5 \pm 9,6$ mg/100mL na raça Murciana ($p=0,61$), o que corresponde, respectivamente, a 45% e 66% da ingestão recomendada para este micronutriente. Dessa forma, o leite de cabra é considerado uma boa fonte de vitamina A para crianças nessa faixa etária, apesar de ser necessário incluir na dieta outros alimentos fontes para atingir suas necessidades.

Palavras-chave. leite de cabra, retinol, crianças.

ABSTRACT

Goat milk has great importance for politics of food production in Northeast Brazil, which added to their recognized nutritional value, is taking part in the complementary feeding of children in this region. The objective of this study was to determine the concentration of retinol in goat milk and check its suitability as to the nutritional needs of children aged 7 to 36 months. Sixty-eight samples were collected from animals with weight, age, lactation period and feeding like, from the semi-arid region of Rio Grande do Norte, Brazil. The level of retinol in goat milk was obtained by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and their contribution to vitamin A intake was estimated using the recommendations for the age group concerned. It was found 38.5 ± 12.7 mg/100mL retinol in the milk of Saanen goats and 40.5 ± 9.6 mg/100mL Murciana race ($p = 0.61$), corresponding respectively to 45% and 66% of recommended intake for this nutrient. Thus, goat milk is considered a good source of vitamin A to children at this age, although in diet to include other food sources to meet your needs.

Key words. goat milk, retinol, children.

INTRODUÇÃO

O leite constitui um item básico na alimentação humana, especialmente na alimentação infantil, contribuindo para o crescimento e o desenvolvimento das crianças através do fornecimento de nutrientes essenciais, como lipídios, carboidratos, proteínas, sais minerais e vitaminas¹. A vitamina A, uma das principais vitaminas lipossolúveis encontradas no leite, apresenta especial importância durante os períodos de crescimento e desenvolvimento, fato que a torna essencial na infância. Isto se deve ao fundamental papel que a vitamina A exerce em períodos de proliferação e diferenciação celular, além da participação em diversos mecanismos biológicos, como na reprodução, na visão normal e na manutenção do sistema imune².

Dentre as deficiências nutricionais de maior importância epidemiológica, a deficiência de vitamina A ainda hoje assume graves proporções no contexto da saúde pública em todo o mundo³. Em nosso país, 17,4% das crianças apresentam níveis inadequados de vitamina A, sendo o índice da região Nordeste (19%) um dos mais preocupantes⁴.

Sabe-se que um estado de deficiência de vitamina A persistente irá prejudicar as funções fisiológicas, tanto em crianças quanto em indivíduos adultos, ainda que os sinais clínicos de carência não sejam evidentes. Assim, por ser o leite o alimento mais consumido e indicado durante estágios iniciais da vida, ele é considerado a mais importante fonte de vitamina A para multiplicar as reservas hepáticas da criança, fornecendo energia e nutrientes em quantidades apropriadas para uma boa nutrição⁵.

O leite materno é, sem dúvida, o melhor alimento para crianças até seis meses de idade por proporcionar vantagens nutricionais, imunológicas e psicológicas ao lactente, além de contribuir para a redução de manifestações alérgicas nessa fase. A partir dos seis meses, alimentos complementares são introduzidos na alimentação da criança, dentre eles o leite de outras espécies ou fórmulas especiais são frequentemente utilizados⁶.

O leite de cabra tem sido indicado para crianças que apresentam reações alérgicas ao leite de vaca ou outras doenças gastrointestinais, uma vez que possui glóbulos de gordura bem menores que os do leite de vaca, proporcionando uma maior digestibilidade, além de maior porcentagem de ácidos graxos de cadeia curta e média. Apresenta maior aceitação e tolerância que o leite de vaca em crianças pré-escolares, favorecendo o incremento da ingestão láctea e, conseqüentemente, dos nutrientes contidos no leite⁷.

Apesar de a região Nordeste do Brasil apresentar elevados índices de desnutrição infantil e de deficiência em vitamina A⁴, o Brasil é o maior produtor de leite de cabra da América do Sul, estando quase 90% do rebanho caprino do país concentrado na região Nordeste⁸. Dessa maneira, o uso de caprinos como produtor de leite pode tornar-se um importante instrumento na política de produção de alimentos, principalmente em regiões semiáridas onde a precipitação pluvial e a temperatura não favorecem a exploração de bovinos leiteiros.

Dentro desse contexto, o Rio Grande do Norte vem exibindo produção crescente de leite caprino, tendo em vista o incentivo governamental, o qual compra parte do leite produzido para distribuir a pessoas de baixo poder aquisitivo⁹. Assim, considerando o papel da vitamina A para a infância e a importância que o leite de cabra apresenta para a região Nordeste, este trabalho teve como objetivo determinar os níveis de vitamina A no referido no leite, a fim de verificar a adequação desta fonte quanto à necessidade nutricional de crianças de 7 a 36 meses.

MATERIAL E MÉTODOS

O leite de cabra foi coletado de animais das raças Saanen (n=38) e Murciana (n=30) provenientes de mesma região semiárida e criados de forma intensiva. Estes animais apresentavam idade entre 2 a 4 anos, peso entre 35 a 40kg e encontravam-se no período de lactação entre 30 a 90 dias pós-parto. A alimentação destes animais foi baseada em concentrado, composto de milho, capim elefante, arbustos de mangabeira e torta verde, além de volumoso constituído por sorgo, capim elefante e capim napier, na proporção média de 20% do peso de cada animal, sendo usado como fonte de fibras.

As amostras de leite foram coletadas no primeiro horário de ordenha da manhã, sendo coletados de cada animal 15mL de leite fresco dos últimos jatos. O leite foi acondicionado em frasco de polipropileno protegido da luz, transportado sob refrigeração para o laboratório e congelado a -20°C para posterior análise.

A extração do retinol no leite de cabra foi realizada segundo método de Giuliano et al¹⁰, sendo determinada sua concentração através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Esta foi realizada em sistema isocrático de fase reversa, utilizando Cromatógrafo LC-10 AD Shimadzu acoplado a um Detector SPD-20^A Shimadzu UV-VIS e Coluna e coluna Shim-pack CLC-ODS(M) 4,6mm x 25cm, sendo utilizado comprimento de onda de 325 nm.

A identificação e quantificação do retinol nas amostras foram estabelecidas por comparação com o tempo de retenção e a área do respectivo padrão de retinol (Sigma). A concentração do padrão foi confirmada pelo coeficiente de extinção específico (1%, 1cm = 1780) em etanol absoluto e comprimento de onda de 325nm¹¹. Os valores de retinol foram expressos como média ± desvio padrão.

A adequação nutricional do leite de cabra para vitamina A em crianças foi calculada pelo produto do volume estimado de ingestão de leite para crianças nas faixas etárias de sete a doze meses e de treze a trinta e seis meses¹², com a concentração média de retinol das amostras leite de cabra. A análise foi realizada por comparação direta desse produto com as recomendações nutricionais estabelecidas pela *Dietary Reference Intakes* (DRIs) para a ingestão diária de vitamina A nas referidas faixas etárias¹³. Para crianças de sete a doze meses de idade, foi considerado o valor estabelecido para a Ingestão Adequada (AI) correspondente à 500µg/dia de vitamina A e, para crianças de treze a trinta e seis meses, considerou-se a ingestão dietética recomendada (RDA), que é 300µg/dia desse nutriente. Não foram consideradas crianças de zero a seis meses, já que o consumo do leite de cabra não é indicado para esse estágio de vida devido à sua elevada concentração proteica.

Para as análises estatísticas, foi utilizado o test t de Student, e o nível de probabilidade $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As concentrações de retinol encontradas nos leites de cabra foram de $38,5 \pm 12,7$ mg/100mL na raça Saanen e $40,55 \pm 9,56$ mg/100mL na raça Murciana. Considerando que o sistema alimentar foi semelhante, composto de concentrado e volumoso, estes resultados não apresentaram diferença significativa ($p=0,61$), sugerindo que a raça não é um fator de diferenciação entre os níveis de retinol no leite caprino.

Comparando-se esses resultados com os apresentados pela tabela americana de composição alimentar¹⁴, que atribui o valor de 56µg de retinol /100mL ao leite caprino, percebemos que os valores aqui encontrados são inferiores, embora não seja especificada na referida tabela a forma de criação e alimentação dos animais, o que poderia influenciar os níveis de retinol.

Em termos nutricionais, o leite de cabra é considerado um alimento de alto valor biológico, hipoalergênico e de alta digestibilidade⁷, o que o tem tornado uma boa opção na escolha do tipo de leite a ser

oferecido para crianças. Diante disso, a avaliação do grau de contribuição do leite de cabra sobre a ingestão dietética diária de retinol em crianças é de grande importância.

A partir das recomendações de consumo diário de leite para crianças de sete a doze meses (570mL) e de treze a trinta e seis meses (500mL)¹², estimou-se uma ingestão de retinol de 225 µg/dia e 198 µg/dia para as referidas faixas etárias. Dessa maneira, a adequação do leite de cabra sobre as recomendações dietéticas diárias de vitamina A foi de 45%, para crianças da faixa etária menor, e de 66%, para as da faixa etária superior. Esses valores superam a porcentagem de contribuição do leite para ingestão de retinol encontrada em estudo realizado com crianças americanas de 12 a 24 meses (30,2%)¹⁵.

Apesar dos resultados satisfatórios, considerando que a criança nesse estágio de vida incorpora outros alimentos à sua dieta, ressaltamos a importância de incluir na alimentação complementar alimentos fontes de vitamina A. Esses alimentos são necessários para fornecer um aporte adequado deste nutriente, uma vez que níveis inadequados contribuem para o desenvolvimento de sinais e sintomas de deficiência, dentre eles uma maior vulnerabilidade a infecções oportunistas, considerada uma das principais causas de mortalidade infantil.

CONCLUSÃO

O leite de cabra analisado pode ser considerado uma excelente fonte de vitamina A, fornecendo quantidade satisfatória deste micronutriente para crianças de sete a trinta e seis meses de idade. No entanto, é necessário ressaltar que outros alimentos fontes devem ser incluídos na alimentação complementar da criança para atingir a ingestão recomendada.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) do Ministério da Educação do Brasil, pelo suporte técnico e financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Ferreira IM. Quantification of non-protein nitrogen components of infant formulae and follow-up milks: comparison with cows' and human milk. *Br J Nut*. 2003; 90(1):127-33.
2. Almeida-Muradian LB, Penteado MVC. Vitamina A. In: Penteado MVC. Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos 1nd ed. São Paulo: Ed. Manole; 2003. p.55-72.

3. World Health Organization - WHO. Global prevalence of vitamin A deficiency in populations at risk 1995-2005. WHO Global Database on vitamin A deficiency. Geneva: WHO; 2009.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde da Criança e da Mulher. Brasília (DF); 2009.
5. Underwood B. Maternal vitamin A status and its importance in infancy and early childhood. *Am J Clin Nutr*. 1994;59:517S-524S.
6. Park YW, Juárez M, Ramos M, Haenlein GFW. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Res*. 2007;68(1-2):88-113.
7. Fisberg M, Nogueira M, Ferreira AMA, Fisberg RM. Aceitação e tolerância de leite de cabra em pré-escolares. *Pediatr Mod*. 1999;35(7):526-7.
8. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Censo Agropecuário 2006. [acesso 2009 Mai 22]. Disponível em: [<http://www.ibge.gov.br>].
9. Secretaria de Estado do Trabalho, da Habitação e da Assistência Social do Rio Grande do Norte - SETHAS. [acesso 2009 mai 27] Disponível em: [<http://www.sethas.rn.gov.br/programasprojetos/programaleite>].
10. Giuliano AR, Neilson EM, Kelly BE. Simultaneous quantitation and separation of carotenoids and retinol in human milk by high-performance liquid chromatography. *Meth Enzymol*. 1992;213:391-9.
11. Nierenberg RD, Namm SL. A method for determining concentrations of retinol, tocopherol, and five carotenoids in human plasma and tissue samples. *Am J Clin Nutr*. 1992; 56: 417-26.
12. Brasil. Ministério da Saúde. Organização Pan-Americana de Saúde. Dez passos para uma alimentação saudável. Guia alimentar para crianças menores de dois anos. 1ª ed, Brasília, DF; 2002.
13. Institute of Medicine. Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. Washington, DC: National Academy Press; 2001.
14. United States Department of Agriculture. National Nutrients Database for Standard Reference, 2004; Realease 16-1 [acesso 2004 Jul 20]. Disponível em: [http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/nut_search_new.pl].
15. Fox MK, Reidy K, Novak T, Ziegler P. Sources of energy and nutrients in the diets of infants and toddlers. *J Am Diet Assoc*. 2006;106:28S-42S.

Estudo da toxicidade *in vivo* e *in vitro* em produtos de papel para fins sanitários e sua avaliação microbiológica

Study the toxicity *in vivo* and *in vitro* in papers with sanitary purposes and microbiological quality assessment

RIALA6/1309

Lígia Luriko MIYAMARU^{1*}, Maria Cristina SANTA BÁRBARA¹, Adriana BUGNO², Adriana Aparecida Buzzo ALMODOVAR², Tatiana Caldas PEREIRA², Áurea Silveira CRUZ³, Tamiko Ichikawa IKEDA³, Rezolina Pereira dos SANTOS³

Endereço para correspondência: ¹Núcleo de Ensaios Físicos e Químicos em Cosméticos e Saneantes, Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes, Instituto Adolfo Lutz. *e-mail: lmiyamaru@ial.sp.gov.br

²Núcleo de Ensaios Biológicos e de Segurança, Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes, Instituto Adolfo Lutz

³Núcleo de Culturas de Células, Centro de Procedimentos Interdisciplinares, Instituto Adolfo Lutz

Aceito para publicação: 19.02.2010 - Recebido: 13.08.2010

RESUMO

Os papéis para fins sanitários são produtos absorventes compostos de fibras naturais, destinados à fabricação de papel higiênico, lenços, toalhas, guardanapos e lençóis hospitalares. Foram analisados 65 produtos de diferentes marcas de papéis comercializadas em São Paulo para avaliar a toxicidade dérmica utilizando-se ensaios *in vivo* e *in vitro* e a qualidade microbiológica. Foram utilizados ensaios recomendados pelas Normas ABNT NBR 15134-30/09/2004, Portaria 1480-31/12/1990 e Farmacopeia Americana. O ensaio *in vivo* foi realizado utilizando-se técnicas de Draize, Magnusson e Kligman; para o teste *in vitro* pela difusão em ágar foram empregadas as linhagens celulares NCTC clone 929 (ATCC-CCL1). Os produtos apresentaram resultados satisfatórios nos ensaios *in vivo* e *in vitro*. A qualidade microbiológica foi satisfatória em 49 (75,4%) amostras, porém em 16 (24,6%) amostras os resultados foram insatisfatórios pela presença de bactérias mesófilas aeróbias e de *Clostridium spp.* A técnica de citotoxicidade *in vitro* poderá ser utilizada como teste de triagem e como ensaio alternativo em substituição aos ensaios *in vivo*. Apesar da análise microbiológica não constar nas normas vigentes, o seu uso torna-se relevante para avaliar as condições higiênico-sanitárias e atender às normas de Boas Práticas de Fabricação e Controle.

Palavras chave. papel sanitário, análise microbiológica, toxicidade *in vitro/in vivo*.

ABSTRACT

Papers manufactured for sanitary purposes are absorbing products, composed by natural fibers, and used to produce hygienic paper, handkerchiefs, towels, napkins, and hospital sheets. Sixty-five products from different manufacturers and marketed in São Paulo, Brazil were investigated by *in vivo* and *in vitro* dermal toxicity assays and microbiological quality analysis. The assays were performed following ABNT NBR 15134 Regulation and Ministerial Decree 1480. *In vivo* assay was carried out by Draize and Magnusson and Kligman techniques, and *in vitro* testing was performed by agar diffusion NCTC cell strains clone 929 (ATCC-CCL1). Microbiological analysis was performed according to Ministerial Decree 1480. The analyzed products showed satisfactory results on both *in vivo* and *in vitro* assays. Forty-nine (75.4%) samples showed satisfactory microbiological quality, but unsatisfactory in 16 (24.6%) samples due to the occurrence of aerobic mesophilic bacteria and *Clostridium spp.* *In vitro* cytotoxicity assay could be used as screening test, and as an alternative test for replacing the animal-using methodologies. The microbiological analysis is not included in the pertinent guidelines, but the use of analytical marker is crucial for assessing the sanitary-hygienic conditions and also to act in compliance with Good Manufacturing and Control Practices.

Key words. papers for sanitary purposes, microbiological analysis, *in vivo* and *in vitro* toxicity.

INTRODUÇÃO

Papéis são formados por fibras celulósicas entrelaçadas e a madeira é a principal matéria-prima em seu processo de obtenção. As diferentes propriedades químicas e físico-mecânicas relacionadas às matérias-primas, reagentes químicos e processos mecânicos empregados em sua produção permitem inúmeras aplicações do papel, tornando-o um dos materiais contemporâneos mais versáteis, com emprego na escrita e impressão, embalagem e para fins sanitários¹. Quando usados nesta última finalidade, são produtos absorventes, encrespados, coloridos ou não, fabricados a partir de fibras naturais, virgens e/ou recicladas, que resultam em papel higiênico, lenços, toalhas, guardanapos e lençóis hospitalares de papel².

Atualmente, o Brasil é considerado o sétimo maior produtor mundial no segmento de celulose³ e o décimo segundo maior produtor de papel, fabricando 6,5 milhões de toneladas, que correspondem a 2,2% do total. Esta produção concentra-se na região sul e sudeste, sendo que a fabricação de papéis sanitários está centralizada em São Paulo e Santa Catarina, que juntos detêm 68% da oferta ao mercado consumidor. As indústrias, também visando à redução de custos, têm utilizado fibras recicladas, que correspondem a 50% do volume usado durante a fabricação de papéis sanitários, cartões e papéis de embalagem³.

A qualidade do produto final depende da madeira e das condições de processo de fabricação. No seguimento de papéis não refinados ou fracamente refinados, destacam-se os produtos de papel higiênico, papel toalha, guardanapos, lenços, entre outros. Os atributos de qualidade estão relacionados com a sensação de maciez, absorção e retenção de líquido. Na sua fabricação, são utilizadas matérias-primas que resultam em papéis de baixa densidade e alto volume específico com potencial de absorver e reter grande quantidade de líquido⁴.

Mesmo atendendo a todos estes atributos, a questão da qualidade ainda não está esclarecida, pois muitas causas de dermatites de contato na região perianal estão relacionadas com o uso dos papéis higiênicos. As manifestações clínicas variam de um simples eritema até fissuras e hemorróidas às quais podem associar-se *Candida albicans* e outros fungos⁵.

No Brasil, os papéis para fins sanitários são dispensados de registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), sendo que o controle fica sob a responsabilidade do fabricante, importador ou distribuidor, os quais, desde 2004, devem seguir a Norma ABNT NBR 15134². Nela encontram-se definidos os ensaios utilizados na avaliação da qualidade de papéis para fins sanitários e estes ensaios devem estar em

conformidade com a Portaria 1480/90 do Ministério da Saúde⁶.

Assim, com o objetivo de contribuir no controle da saúde da população, realizou-se um estudo para avaliar a qualidade dos produtos de papéis para fins sanitários comercializados na cidade de São Paulo. Este estudo visou analisar a carga microbiana, a sensibilização cutânea e a toxicidade cutânea, tanto por métodos *in vitro* como *in vivo*.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Foram avaliados 65 produtos de papéis para fins sanitários de diferentes marcas e finalidades, sendo: 27 amostras de papel higiênico, 28 de papel toalha, 03 de guardanapo e 07 de lençol hospitalar.

Todas as amostras foram submetidas à avaliação dérmica primária e cumulativa, à sensibilização cutânea, à citotoxicidade *in vitro* e à análise microbiológica.

Avaliação da toxicidade *in vitro* em culturas de células

Foi realizada pelo método de difusão em ágar, utilizando a linhagem celular NCTC clone 929 (ATCC-CCL1) de tecido conjuntivo de camundongo. A linhagem celular foi semeada em placas de Petri (60 x 15mm), na concentração de $3,0 \times 10^5$ células/ mL de meio mínimo de Eagle (MEM) com 10% de soro fetal bovino (SBF) sem antibióticos e incubadas a 37 °C por 48 horas, em estufa com ambiente de 5% de CO₂. Após a formação da monocamada celular, o meio líquido foi descartado e adicionado volume de 5mL do meio sólido composto de partes iguais de MEM (duas vezes concentrado) e ágar (Bacto-Difco) a 1,8 % com 0,01 % de vermelho neutro, como corante vital^{6,7}.

Fragmentos de aproximadamente 0,5 cm² de cada amostra foram posicionados sobre a camada de ágar, antes de sua completa solidificação, e as placas, novamente incubadas. Todas as amostras foram analisadas em triplicatas e, como controle negativo e positivo, foram utilizados respectivamente disco de papel de filtro atóxico e fragmentos de látex com as mesmas dimensões das amostras.

Após 24 horas, as leituras das placas foram feitas macroscopicamente e microscopicamente, observando-se a presença do halo claro ao redor do material tóxico correspondente às células mortas, que não incorporaram o corante vital. Quando presente, a extensão dos halos resultantes do efeito citotóxico foi cuidadosamente medida, usando paquímetro. A média da medida dos halos obtidos em cada amostra foi calculada e o valor classificado em índices de zona (IZ), de acordo com a Farmacopeia Americana⁸.

Avaliação da toxicidade *in vivo*

Ensaio de irritação dérmica primária e cumulativa

Foram realizados conforme o Método de Draize^{2,6,9,10} e OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*)¹¹, utilizando três coelhos albinos da raça Nova Zelândia com pesos entre 2,0 e 2,5 Kg, sendo que a amostra foi colocada em contato na região dorsal depilada de cada animal. A avaliação da irritação dérmica primária foi feita com uma única aplicação da amostra e a leitura de eritema e edema, após 24 horas. Na irritação dérmica cumulativa, foram efetuadas 10 aplicações consecutivas, sendo a leitura de eritema e edema realizada após 24 horas da última aplicação. Com estes valores foram calculados os índices de irritação.

Ensaio de sensibilização cutânea

Foi realizado pelo método Modificado de Magnusson e Kligmam. Foram feitas aplicações tópicas da menor dose não irritante por um período de três semanas, juntamente com aplicações subcutâneas de adjuvante completo de Freund, para exacerbar a resposta imune. Após um período de repouso, realizou-se outra aplicação tópica da maior dose não irritante. As reações foram graduadas segundo escala onde a ausência de reação macroscópica em todos os animais avaliados demonstra sensibilização cutânea negativa^{10,12,13}. Qualquer alteração observada na pele foi considerada como resultado positivo para este ensaio.

Avaliação microbiológica

Foi realizada considerando os parâmetros definidos pela Norma ABNT NBR 15134/2004²: enumeração de bactérias aeróbias mesófilas e de bolores e leveduras, pesquisa de *Staphylococcus aureus*, de *Pseudomonas aeruginosa*, de *Escherichia coli* e de *Clostridium* spp. ou clostrídio sulfito-reduzidor – realizadas conforme as metodologias analíticas descritas na Portaria 1480/1990⁶ – além da pesquisa de *Salmonella* spp. e de *Candida albicans* realizada de acordo com as metodologias analíticas descritas em compêndios oficiais¹⁴.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em todos os produtos avaliados verificaram-se índices de irritação dérmica primária e cumulativa iguais à zero, assim como não foram observadas reações de sensibilização cutânea. Com relação à avaliação da toxicidade *in vitro*, não foi observada morte ou alguma alteração celular que sugerisse efeito tóxico, sendo que todas as células estavam com a morfologia íntegra e apresentavam coloração vermelha devido à presença do corante vital.

Os resultados da avaliação toxicológica indicam que os produtos avaliados e disponíveis no mercado de São Paulo não causam irritação. Ainda, demonstram que a análise de toxicidade pode ser feita preferencialmente pelo método *in vitro* diminuindo ou eliminando o uso de animais em ensaios de irritação dérmica primária e cumulativa, além de ir ao encontro das questões colocadas pela Sociedade Protetora dos Animais.

Com relação à avaliação microbiológica, das 16 amostras analisadas (24,6%), 81,2% apresentaram resultados insatisfatórios devido à presença de população bacteriana acima do limite máximo permitido de 1000 UFC/g. Foi evidenciada a presença de clostrídios sulfito redutores somente em 6,2% das amostras e a presença de população bacteriana acima do limite máximo, aliada à de clostrídios sulfito redutores em 12,5% destas amostras. Considerando o tipo de papel avaliado, estes resultados insatisfatórios foram verificados em papéis toalha, lençóis hospitalares e papéis higiênicos (Figura 1).

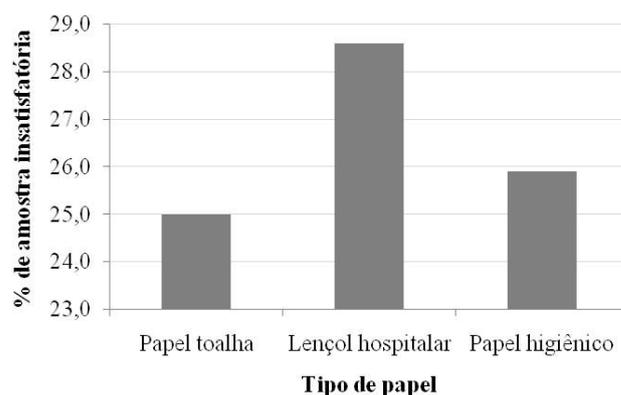


Figura 1. Distribuição das amostras insatisfatórias na avaliação microbiológica em função do tipo de papel

Em complementação às análises microbiológicas definidas pela Norma ABNT NBR 15134/2004², verificou-se a presença de outros micro-organismos (Figura 2) em amostras de papel higiênico, papel toalha, lençol hospitalar e guardanapos. Considerando o tipo de papel, além da presença de cocos Gram (+) em todas as amostras analisadas, verificou-se a presença de *Citrobacter* spp em 66,7% das amostras de guardanapos; em amostras de papel higiênico, verificou-se a presença de bactérias esporuladas (22,2%), *Citrobacter* spp (11,1%), complexo *Burkholderia cepacea* (5%) e de *Providencia* spp (3,7%) e *Klebsiella* spp (3,7%); em amostras de papel toalha, evidenciou-se a presença de bactérias esporuladas (21,4%), *Citrobacter* spp (14,3%) e *Enterobacter* spp (3,6%); e em amostras de lençol hospitalar, foram evidenciadas bactérias esporuladas (14,3%) e complexo *Burkholderia cepacea* (14,3%).

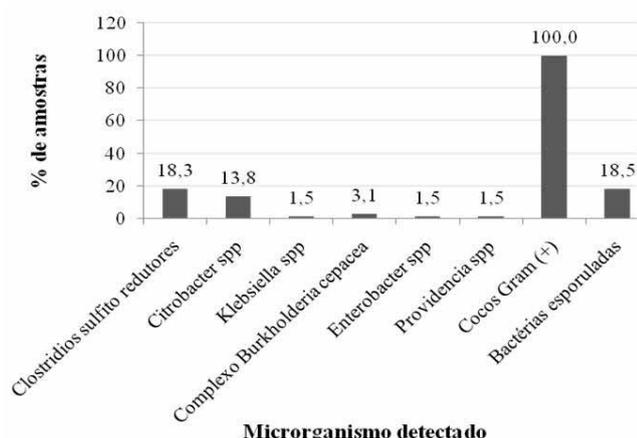


Figura 2. Distribuição das amostras insatisfatórias na avaliação microbiológica em função do tipo de micro-organismo

Os micro-organismos isolados nas amostras podem estar associados às principais fontes de contaminação microbiológica durante o processo produtivo, como ambiente, equipamentos, pessoal e matéria-prima. De um modo geral, estes micro-organismos estão relacionados às infecções em indivíduos com defesa comprometida, como por exemplo, infecções do aparelho urinário relacionadas a *Klebsiella* spp, *Providencia* spp e cocos ou infecções da pele associadas à presença de *Klebsiella* spp e *Providencia* spp.

Embora a norma ABNT NBR 15134/2004² tenha indicado a necessidade da avaliação microbiológica em produtos de papéis para fins sanitários, sua nova edição em 2007 não os contempla; entretanto, considerando os resultados obtidos neste estudo e a ampla utilização em ambiente doméstico, institucional e hospitalar, verificamos a necessidade de nova revisão da referida norma, com o objetivo de garantir a qualidade e a segurança de uso de tais produtos.

CONCLUSÃO

Este estudo indica a possibilidade de utilizar testes de citotoxicidade *in vitro* como triagem na avaliação da qualidade da toxicidade de produtos de papéis para fins sanitários, sendo uma técnica rápida, de baixo custo e alta sensibilidade, que possibilita minimizar a utilização de animais de laboratório para os ensaios *in vivo*.

Embora o estudo tenha indicado que todos os produtos avaliados não causem irritação, verificou-se que 24,6% deles não cumpriram com requisitos microbiológicos mínimos estabelecidos em edição anterior da norma específica, o que indica a necessidade de nova revisão desta norma,

considerando a importância da avaliação microbiológica destes produtos para a garantia da qualidade e da segurança de uso, além de permitir verificar o cumprimento dos requisitos de Boas Práticas de Fabricação e Controle.

REFERÊNCIAS

1. Santos CP, Reis IM, Moreira JEB, Brasileiro LB. Papel como se fabrica? *Rev Quim Nova Esc*. 2001;14. Disponível em: [http://www.dqo.iqm.unicamp.br/disciplinas/pos-graduação/qp-322/artigo.pdf].
2. Associação Brasileira de Normas Técnicas [ABNT] NBR-15134. Papel e produto de papel para fins sanitários. Método de ensaio. Rio de Janeiro, 2004.
3. Mattos RLG, Valença ACV. A reestruturação do setor de papel e celulose. *BNDES Setorial*. 1999;10:253-68. Disponível em: [http://www.bndes.gov.br/conhecimento/bnset/sete 1006.pdf].
4. Mokfienski A, Gomide JL, Colodette JL, Oliveira C. Importância da densidade e do teor de carboidratos totais da madeira de eucalipto no desempenho da linha de fibra. Disponível em: [http://www.celuloseonline.com.br/imagembank/Docs/DocBank/dc/dc099.pdf].
5. Rodrigues-Acar M, Carmona MN, Montañó AJ, Alarcón HH. Patologías más frecuentes del área perianal. *Rev Cent Dermatol Pascua*. 2000; 9 (2):86-95.
6. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 1480, de 31 de dezembro de 1990. Aprova o Regulamento Técnico para o controle de produtos absorventes higiênicos descartáveis, de uso externo e intra-vaginal. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 07 jan.1991. Seção 1, p.295-301.
7. International Organization For Standardization [BSEN ISO] 10993-05. Biological evaluation of medical devices tests for in vitro cytotoxicity. Geneva, 1992.
8. United States Pharmacopeia. 28 ed. Rockville. United States Pharmacopeial Convention, 2005. p.2268-9.
9. American Society for Testing and Materials [ASTM], F719. Standard practice for testing biomaterials in rabbits for primary skin irritation. Philadelphia: ASTM, 1996.
10. International Organization for Standardization [BS EM ISO] 10993-10. Biological evaluation of medical devices tests for irritation and sensitization. Geneva, 1996.
11. Organisation for Economic Co-operation and Development of Chemicals revised guideline 404. Acute Dermal Irritation/Corrosion, 2002.
12. Magnusson B, Kligman. A. Allergic contact dermatitis in the guinea pig. Thomas CC, Springfield IL, 1970.
13. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. [ANVISA]. Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos, 2003.
14. Bacteriological Analytical Manual Online, 2001. Disponível em: [http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-4.html].

Avaliação de rotulagem nutricional, composição centesimal e teores de sódio e potássio em batatas-palha

Centesimal composition, mineral contents and nutritional labeling in matchstick potatoes

RIALA6/1310

Hayla Félix RODRIGUES, Luiz Fernando Miranda da SILVA*, Karla Silva FERREIRA, Fernanda dos Santos NOGUEIRA

*Endereço para correspondência: Graduando em Ciências Biológicas, Centro de Biociências e Biotecnologia. Universidade Estadual do Norte Fluminense, Bolsista UENF. Avenida Alberto Lamego, 2000 – Pq Califórnia – Campos dos Goytacazes/RJ. CEP: 28013-602 RJ/Brasil. Tel.: 22 2739-7160, e-mail: biomiranda@yahoo.com.br

Recebido: 16.11.2009 – Aceito para publicação: 29.08.2010

RESUMO

Nos últimos vinte anos, as agroindústrias têm se instalado nos grandes centros urbanos do Brasil com o objetivo de abastecer sobretudo o mercado de *fast food* com produtos como batata-palha e batata *chips*. No presente trabalho, foram determinados o valor energético, a composição centesimal e os teores de sódio e potássio em amostras de batata-palha. Os resultados destas análises foram comparados com os valores declarados na informação nutricional descritos nas embalagens dos respectivos produtos. Todas as marcas de batata palha analisadas estavam em desacordo com a legislação vigente, pois foram sido detectados teores de algumas substâncias nas taxas de 20% superiores ou inferiores em relação aos valores declarados nos rótulos das embalagens. Verificou-se também que 60% das marcas dos produtos analisados têm sido comercializadas sem a indicação de algum componente ou nenhuma informação nutricional.

Palavras-chave. batata, alimentos, lipídio, rotulagem.

ABSTRACT

In the last twenty years, the agribusiness has been setting up in the Brazilian major urban centers with the purpose of supplying mostly the fast food market with the products as matchstick potatoes and potato chips. The energetic value, centesimal composition, and sodium and potassium contents were investigated in matchstick potatoes, and the results from these analyses were compared with the values described in the nutritional information on the respective products labels. In all of the matchstick potatoes brands analyzed in this study, some components were 20% higher or lower than those values described on the packages labels. Also, 60% of the product brands were marketed without specifying some nutritional components or none of them were stated in details. These products did not comply with the legislation in force.

Key words. potato, foods, lipid, label.

INTRODUÇÃO

A batata é um dos principais alimentos da humanidade, consumida por mais de um bilhão de pessoas, sendo a quarta cultura na ordem de importância no mundo. O Brasil está na 18ª posição no *ranking* mundial de produção¹.

A produção industrial de batata é um segmento forte e competitivo na Europa e Estados Unidos, países onde o consumo *per capita* é elevado nas suas diferentes formas industrializadas – *chips*, *french fries* (palito), amido, entre outras. Já no Brasil, nos últimos vinte anos, as agroindústrias têm se instalado nos grandes centros urbanos com o objetivo de abastecer, sobretudo, o mercado *fast food* com produtos como batata-palha e batata *chips*². A batata *chips* tem sua composição química mais estudada^{3,4}. Quanto à batata-palha, não foram encontrados dados oficiais sobre sua composição.

A rotulagem nutricional dos alimentos é regulamentada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Em atendimento às solicitações da Organização Mundial da Saúde, tornou obrigatória a declaração do valor energético e teores de carboidrato, proteína, gordura total, gordura saturada, gordura *trans*, fibra alimentar e sódio nos produtos alimentícios embalados para consumo humano⁵.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi determinar o valor energético, a composição centesimal e os teores de sódio e potássio em amostras de batata-palha, além de comparar os resultados destas análises com os valores declarados na informação nutricional descritos nas embalagens dos respectivos produtos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas cinco marcas de batata-palha, dois ou três lotes de cada, totalizando 26 amostras. As amostras foram compradas no município de Campos dos Goytacazes/RJ, selecionando-se todas as marcas comercializadas nas três maiores redes de supermercados da cidade e em dois hortifrutis. A mensuração dos teores de proteínas foi realizada por meio do método de Kjeldahl⁶; os de fibra, pelo método enzimático⁶; lipídios totais, pelo método Bligh Dyer⁶; cinzas, por calcinação em mufla a 550°C⁶; umidade, por secagem em estufa a 105°C até peso constante⁶; e sódio, por fotometria de chama após digestão úmida das amostras⁶. O teor de carboidrato foi calculado subtraindo de 100 os teores detectados de proteínas, cinzas, lipídios e umidade; já o valor energético, pela soma da porcentagem de carboidrato e proteína, multiplicada por quatro, e de lipídio, multiplicada

por nove⁵. A determinação de sódio e potássio foi feita por fotometria de chama após digestão da matéria orgânica por via úmida com ácidos nítrico e perclórico⁹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição das batatas-palha analisadas é mostrada na Tabela 1.

Enquanto os teores de lipídios totais nas batatas-palha variaram entre 32 e 57%, com média de 41%, a média de teores de lipídio em batatas *chips* encontrados na TACO³ é de 36,6% e, de acordo com o banco de dados da USDA⁴, é de 38,4%. Pelo fato de ser um alimento com grande superfície de contato, supõe-se que a batata-palha absorva maior quantidade de gordura durante a fritura. Em casos em que a batata-palha é adicionada a pratos prontos, por exemplo, “cachorro-quente”, “*stroganoff*” e “salpicão”, contribui para elevar o valor energético da refeição.

Foi observado que, em média, duas porções (50g) dos produtos analisados chegam a fornecer 40% da ingestão diária recomendada de gorduras totais, segundo a ANVISA (55g)⁵.

Em relação ao teor de potássio, 25g do mesmo produto fornece em média 0,05% da ingestão diária recomendada⁷. Segundo o *Institute of Medicine of the Natural Academies*⁷, a recomendação diária de potássio é de 4,7g. Portanto, esse tipo de alimento não deve ser considerado fonte de potássio, visto que deveria fornecer no mínimo 15% da recomendação⁸. Essa desproporção entre os teores de sódio e os de potássio é inadequada do ponto de vista nutricional por ser um fator positivo para a elevação da pressão arterial⁹.

Foi observado desvio padrão mais elevado de valor energético, sódio e principalmente de potássio. Essa observação refere-se aos teores de nutrientes encontrados entre lotes dos mesmos produtos e também entre as marcas. Tal diferença pode ser explicada pela falta de controle de qualidade durante a fabricação destes alimentos e, também, pela diferença nas quantidades de potássio entre as batatas utilizadas. Sabe-se que as batatas-inglesas são ricas em potássio¹⁰.

Na tabela 2 é apresentado o percentual de diferença de valores energéticos e nutrientes entre as marcas declarados no rótulo e os detectados nas análises.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) determina, por meio da RDC 360, além de especificar como deve ser a informação nutricional obrigatória, que a margem de erro entre o teor de qualquer substância declarada no rótulo nutricional em relação ao valor real não pode ser superior a 20%, para mais ou para menos⁵.

Tabela 1. Valor energético (Kcal), porcentagem de carboidrato, proteína, lipídios, fibra e teores de sódio e potássio (mg/100g) detectados nas amostras de batata-palha

Marca/ Lote	(Kcal)	Carboidrato	Proteína	Lipídio	Fibra	Sódio	Potássio
Marca A							
1	565	45	4	41	2	224	650
2	573	46	5,1	41	0,9	151	531
3	577	44	5,8	42	0,9	237	833
Média	572	45	5	41	1	204	671
Desvio padrão	6,1	1	0,9	0,6	1	46	152
Rótulo*	<u>540</u>	<u>44</u>	<u>4,8</u>	<u>40</u>	<u>0,8</u>	<u>200</u>	-
Marca B							
1	565	52	3,8	38	2,2	144	805
2	571	52	5,3	38	0,6	250	692
3	558	54	4,6	36	1,4	164	807
Média	565	53	5	37	1	186	768
Desvio padrão	6,5	1,2	0,8	1,2	0,8	56	66
Rótulo*	<u>550</u>	<u>45</u>	<u>5</u>	<u>40</u>	<u>2,5</u>	<u>500</u>	-
Marca C**							
1	530	53	5,2	33	1,3	133	744
2	539	56	6,8	32	1,3	237	873
3	569	48	4,2	40	1,8	211	855
Média	546	52	5	35	1	194	824
Desvio padrão	20	4	1,3	4,4	0,3	54	70
Rótulo*	-	<u>40</u>	<u>5,4</u>	<u>45</u>	<u>4,5</u>	-	-
Marca D							
1	600	47	4,1	44	3,1	167	819
2	612	45	4,6	46	2,1	153	849
Média	606	46	4	45	3	160	834
Desvio padrão	8,5	1,4	0,4	1,4	0,7	10	21
Rótulo*	<u>540</u>	<u>44</u>	<u>4,8</u>	<u>40</u>	<u>2,5</u>	<u>500</u>	-
Marca E							
1	664	34	3,8	57	1,8	213	611
2	632	39	4,3	51	1,7	261	588
Média	648	37	4	54	2	237	600
Desvio padrão	27	3,5	0,4	4,2	0,1	34	16
Rótulo**	-	-	-	-	-	-	-
DSV(X)***	40	6,4	0,5	7,5	0,9	28	101

*Valores declarados na informação nutricional das embalagens dos produtos

** Produtos comercializados sem alguma ou nenhuma informação nutricional

***Desvio padrão das médias de todas as marcas

Todas as marcas analisadas apresentavam margem de erro superior a 20% para algum tipo de nutriente. Além disso, observou-se ainda que estes resultados foram discrepantes para diversos nutrientes, como sódio, com

erro de até 51% acima do tolerado em 67% das marcas (Tabela 2). Estes resultados dão indícios de falta de padronização na fabricação destes produtos. A lei nº 8078, do Código de Defesa do Consumidor, regulamentada em

1990, prevê, no Art.19º, que “os fornecedores respondem solidariamente pelos vícios de quantidade do produto, sempre que respeitadas as variações decorrentes de sua natureza, seu conteúdo, for inferior às indicações constantes do recipiente, da embalagem, rotulagem ou mensagem publicitária”. Sendo assim, tanto o fabricante do produto quanto o ponto de venda podem ser processados ao

transgredir esta lei. Quanto às informações de rotulagem, as duas marcas (C e E), estavam sendo comercializadas sem a informação nutricional. A mesma lei nº 8078, do Código de Defesa do Consumidor, prevê, no Art.6º, que “é de direito a informação adequada e clara sobre os diferentes produtos e serviços com especificação correta de quantidade, característica, composição e qualidade”¹⁰.

Tabela 2. Percentual de diferença entre os valores energéticos (Kcal), teores de carboidrato, proteína, lipídio, fibra e sódio declarados no rótulo e os detectados pelas análises

Marca/ Lote	% de diferença entre a composição centesimal detectada pela análise e a declarada no rótulo nutricional					
	(Kcal)	Carboidratos	Proteína	Lipídeo	Fibra	Sódio
Marca A						
1	+4,6	+2,3	-17	+2,5	+150	+12
2	+6,1	+4,5	+6,2	+2,5	+13	-25
3	+6,9	0,0	+21	+5,0	+13	+19
Marca B						
1	+2,7	+16	-24	-5,0	-12	-71
2	+3,8	+16	+6,0	-5,0	-76	-50
3	+1,5	+21	-8,0	-10	-44	-67
Marca C*						
1	-	+33	-3,7	-27	-71	-
2	-	+40	+26	-29	-71	-
3	-	+21	-22	-11	-60	-
Marca D						
1	+11	+6,8	-15	+10	+24	-67
2	+13	+2,3	-4,2	+15	-16	-69
Marca E*						
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-

-* Estas marcas estavam sendo comercializadas sem alguma informação nutricional. O sinal (+) refere-se à porcentagem em que o teor declarado no rótulo da embalagem do produto era maior que o detectado nas análises; e o sinal (-) indica a porcentagem em que o teor declarado na embalagem era inferior ao teor detectado nas análises

CONCLUSÃO

Em todas as marcas de batata palha analisadas, foram detectados nutrientes em quantidade superior ou inferior aos valores declarados nos rótulos das embalagens, ultrapassando a margem de erro prevista na legislação vigente. Verificou-se também que a maioria das marcas estavam sendo comercializadas sem alguma informação nutricional.

REFERÊNCIAS

1. Quadros AE. Qualidade da batata *Solanum Tuberosum* L., cultivada sob diferentes doses e fontes de potássio e armazenada em temperatura diferente. [dissertação de mestrado]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2007.
2. Leonel M. Processamento de batata: fécula, flocos, produtos de extrusão. [acesso 2003 Out 2003]. Disponível em: [http://www.abbabatatabrasileira.com.br/minas2005/18%20%20Outras%20formas%20de%20processamento.pdf].

3. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação (NEPA/Unicamp). Tabela brasileira de composição de alimentos (TACO). 2.ed. São Paulo, 2006. [acesso 2009 Nov 08]. Disponível em: [<http://www.unicamp.br/nepa/taco/tabela.php?ativo=tabela&PHPSESSID=8ab54bcd9586d2131bf21fb707820c09>].
4. United States Department of Agriculture USDA. National Nutrient Database for Standard Reference. USA. [acesso 2009 Nov 10]. Disponível em: [<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>].
5. Brasil. 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. Seção 1.
6. 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.
7. Institute of Medicine of the Natural Academies IOM. Dietary Reference Intakes: Water, Potassium, Sodium, Chloride, and Sulfate. [internet]. USA. [acesso 2009 Nov. 4] Disponível em: [<http://www.iom.edu/Reports/2004/Dietary-Reference-Intakes-Water-Potassium-Sodium-Chloride-and-Sulfate.aspx>].
8. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 31, de 13 de janeiro de 1998. Aprova Regulamento Técnico referente a Alimentos Adicionados de Nutrientes Essenciais. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília. DF, 13 dez. 1998. Seção 1
9. Jardim PCBV, Monego ET, Reis MAC. Potássio, cálcio, magnésio e hipertensão arterial. *Rev Bras Hipert*. 2004; 11(2):109-11.
10. Brasil. Ministério da Justiça. Lei n. 8.078, de 11 de setembro de 1990. Código de Defesa do Consumidor. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília. DF, 12 set. 1990.

Histórico e aspectos tecnológicos do processamento da linguiça *cuiabana*

Historical and technological aspects of the *cuiabana* sausage manufacturing procedure

RIALA6/1311

Catharina Calochi Pires de CARVALHO*, Francisco LOPES FILHO, Fernando Leite HOFFMANN, Pedro Fernando ROMANELLI

*Endereço para correspondência: Laboratório de tecnologia de carnes - Departamento de Engenharia e Ciência de Alimentos - Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas - IBILCE - Universidade Estadual Paulista - UNESP - Rua Cristóvão Colombo n. 2265. Bairro Jardim Nazareth, CEP: 15054-000 - São José do Rio Preto - SP. email: ccalochi@hotmail.com

Recebido: 19.11.2009 - Aceito para publicação: 19.07.2010

RESUMO

O presente trabalho apresenta o aspecto histórico da linguiça *cuiabana* e os resultados da análise de suas características tecnológicas/sensoriais. Quatro formulações da linguiça tipo *cuiabana* foram processadas, variando-se a matéria-prima básica (carne bovina, frango, suína) utilizada. As matérias-primas (bovina, frango e suína) cortadas em cubos, assim como os demais ingredientes (alho, queijo, leite, pimenta e cebolinha) foram pesados e homogeneizados. A massa resultante foi refrigerada durante 24 horas para intensificar o sabor e, a seguir, embutida em tripas naturais. Nas amostras obtidas, foi realizada a caracterização do perfil físico-químico, avaliação ao longo de sete dias de armazenamento sob refrigeração por meio de análises microbiológicas de coliformes totais e termotolerantes (fecais), clostrídios sulfito redutores, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* coagulase positiva, e de pH. Já o estudo de vida de prateleira sob refrigeração, ao longo de sete dias de armazenamento, foi efetuado por meio de análises microbiológicas para pesquisa de coliformes totais e termotolerantes (fecais), clostrídios sulfito redutores, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* coagulase positiva, e de pH. As amostras foram submetidas às análises sensorial e estatística das diferentes linguiças tipo *cuiabana* processadas em laboratório. As variações feitas, ao longo do tempo, na formulação das linguiças *cuiabanas* são fatores positivos, evidenciando que as alterações na formulação, como adição de queijo e mudanças nos tipos de carnes, são bem mais aceitas do que o produto original.

Palavras-chave. linguiça frescal, análise microbiológica, avaliação sensorial

ABSTRACT

This paper reports the data on the *cuiabana* sausage historical aspect, and from the study performed on its technical/sensory characteristics. Four formulations of *cuiabana*-type sausage were prepared, varying the basic raw material (bovine, chicken and swine meats). For processing these sausages, the raw meats (beef, chicken and pork) were cut into cubes and together with the other ingredients (garlic, cheese, pepper and chives) they were weighed and homogenized. The resulting mixture was refrigerated for 24 hours for intensifying the flavor. Thereafter, it was stuffed into natural casings. These prepared samples were characterized on the physical-chemical profile and on the shelf life under refrigeration for over a seven day-storage in order to assess the microbiological contamination (total coliforms and fecal thermotolerant bacteria), sulphite-reducing clostridium, *Salmonella* spp., coagulase-positive *Staphylococcus*, and pH. The sensory evaluation and statistics analysis were carried out on the different types of laboratory- processed *cuiabana* sausage. Introducing over time changes in the *cuiabana* sausages formulation are positive factors; therefore, variations in the formulations it is feasible to get a better final product than that original one, and it might be resulted from the market demand.

Keywords. fresh sausage, microbiological analysis, sensory evaluation.

INTRODUÇÃO

No Brasil, a linguiça frescal é um dos produtos cárneos mais fabricados, provavelmente porque sua elaboração não exige tecnologia sofisticada e utiliza poucos equipamentos de baixo custo. Estes embutidos cárneos são elaborados a partir de misturas de carne, toucinho e condimentos, podendo ser de carne suína, bovina e de aves, contidos em envoltórios (naturais ou artificiais)¹.

No contexto de linguiça frescal, a linguiça cuiabana é de grande aceitação popular no município de São José do Rio Preto-SP e regiões adjacentes. Originalmente é constituída de carne bovina (corte traseiro), leite, cebolinha, pimenta bode, alho, pimenta do reino e sal refinado. Entretanto, atualmente, encontramos no comércio, diferentes tipos de linguiças cuiabanas diferenciadas por cortes musculares ou de espécies animais (suíno, bovina, frango) e adição de queijo.

Em relação à linguiça frescal, diversos são os fatores que podem afetar a estabilidade e/ou qualidade sanitária do produto final. Podemos citar o emprego de técnicas higiênico-sanitárias inadequadas durante sua elaboração, falta de tratamento térmico no processo, contaminações cruzadas e, conseqüentemente o desenvolvimento de microrganismos patogênicos e/ou deteriorantes².

Considerando que a linguiça cuiabana é um produto regional/tradicional consagrado e de grande aceitação e consumo, considerando também que não existe nada documentado sobre seu surgimento e suas características tecnológicas e que atualmente existem muitas variações e/ou descaracterizações de sua formulação original, torna-se importante realizar seu levantamento histórico, ou seja, realizar um resgate cultural de sua memória, uma caracterização tecnológica desse produto encontrado no comércio (variações na formulação) e uma avaliação sensorial (técnica/científica) dos consumidores.

MATERIAL E MÉTODOS

No laboratório de Tecnologia de Carnes e Derivados, foi realizado o processamento (sob condições assépticas e de acordo com as Boas Práticas de Fabricação- BPF) de quatro lotes de cada tipo de linguiça cuiabana, carne bovina-alcatra (LCCB1) e capa de contra filé (LCCB2), frango-peito (LCCF) e suína- pernil (LCCS), totalizando 16 lotes. A partir destas amostras, foram realizadas análises microbiológicas, físico-químicas e sensoriais.

Para o processamento, as matérias-primas carne (bovina, frango e suína) foram cortadas em cubos (aproximadamente 0,6 cm), que, juntamente com outros ingredientes (alho, queijo, pimenta e cebolinha), foram pesados e homogeneizados. A massa resultante foi deixada em repouso sob refrigeração por 24 horas para melhor desenvolvimento do sabor. Após descanso da massa foi realizado o embutimento em tripas naturais.

Para avaliações posteriores após embutimento, as linguiças foram armazenadas sob refrigeração em sacos plásticos. Realizaram-se análises no tempo zero (dia do processamento) e sob refrigeração (5 - 7°C), com 7 dias fabricação. Para realização da análise sensorial, as amostras (linguiças) foram congeladas (-18°C).

A formulação básica da linguiça tipo cuiabana baseou-se em: 1,5kg de carne, 600mL de leite, 300g de queijo mussarela, 48g de sal, 9,28g de alho, 9,64g de cebolinha e 4,87g de pimenta bode. Como se observa, os 04 tipos de formulação deste trabalho foram rigorosamente iguais, tendo como variação o tipo de carne e adição de queijo.

Levantamento histórico

Foi realizada entrevista (pesquisa) com pessoas ligadas à história da linguiça cuiabana e, assim, registraram-se fatos como: surgimento, criadores e cidade de origem.

Análises

As amostras para análise foram trituradas e homogeneizadas. As análises de umidade, proteína, lipídio e cinzas, foram avaliadas no tempo zero (t_0), já as análises microbiológicas, determinações de pH se estenderam desde o tempo zero (t_0) até o sétimo dia de armazenagem (t_7).

A metodologia usada para determinação de umidade foi de secagem em estufa a 105°C até peso constante. Na determinação de proteína pelo método de Kjeldahl, utilizou-se o fator 6,25 para conversão em proteína. O teor de lipídios foi realizado pelo método de Bligh-Dyer. A concentração de cinzas foi determinada pelo método da incineração da amostra em mufla a 550°C. O carboidrato foi determinado por diferença. Para determinação do pH, foi utilizado pHmetro previamente calibrado³.

As análises microbiológicas foram realizadas de acordo com a legislação vigente para produtos cárneos frescos⁴, que preconiza o monitoramento dos microrganismos: coliformes totais e termotolerantes (fecais), clostrídios sulfito redutores, *Salmonella* spp, *Staphylococcus coagulase positiva*⁵.

Análise Sensorial

As quatro amostras de linguiças tipo cuiabana processadas (LCCB1, LCCB2, LCCF e LCCS) foram avaliadas por 40 provadores não treinados (mulheres e homens). Estes foram selecionados de acordo com a disponibilidade e interesse em participar da equipe sensorial.

As quatro amostras de linguiça foram avaliadas de forma aleatorizadas, codificadas com algarismos de três dígitos, em cabines individuais, utilizando a escala hedônica⁶.

O Índice de Aceitabilidade (IA) foi realizado em relação aos atributos: aparência global, sabor e textura, e os provadores avaliaram o quanto gostaram ou desgostaram do produto, utilizando a escala hedônica estruturada de nove pontos (variando de 9 “gostei muitíssimo” até 1 “desgostei muitíssimo”).

Para execução da análise sensorial e o levantamento histórico da linguiça cuiabana, foi necessário submetê-la à avaliação de risco à saúde humana pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNESP - Campus de São José do Rio Preto, a qual foi aprovada após criteriosa avaliação (nº 041/09).

Os resultados dos parâmetros físico-químicos, microbiológicos e análise sensorial, foram submetidos à análise estatística, aplicando-se testes de análises de variância (ANOVA) e o teste de Tukey (ao nível de 5% de significância). As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa computacional ESTAT versão 2.0⁷.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Histórico da linguiça cuiabana

Segundo levantamento, a linguiça cuiabana foi criada por volta de 1952, pelo Sr. Zenha Ribeiro (também conhecido como Zico), um fazendeiro de Paulo de Faria-SP (cidade localizada à aproximadamente 540 km de São Paulo).

A história conta que Sr. Zenha Ribeiro foi convidado pelo cidadão mato-grossense, Sr. Olinto Correa para um churrasco em Uberaba-MG, onde foram servidas linguiças de carne bovina feita pelas mulheres de sua família, apelidadas de cuiabanas pelo Sr. Zenha. Retornando para Paulo de Faria, ele resolveu fazer tais linguiças devido ao interesse e curiosidade das pessoas sobre estas e, assim, denominou-as de linguiças cuiabanas, uma referência às mulheres que o ensinaram a fazê-las⁸.

Os ingredientes utilizados na época para o processamento da linguiça cuiabana foram: carne bovina (corte traseiro), leite, cebolinha, pimenta bode, alho, pimenta do reino e sal refinado. Historicamente a família faz ainda algumas considerações sobre as matérias-primas e a elaboração da linguiça cuiabana, dentre elas:

- carne bovina deve ser do corte traseiro (contrafilé, alcatra ou parte da fraldinha, conhecida como fraldão), picados em cubos de aproximadamente 1,0 cm;
- gordura bovina utilizada preferencialmente do próprio corte, ou a gordura da ponta de peito;
- leite deve ser *in natura*;
- as tripas devem ser de novilha, pelo seu tamanho e resistência;
- embutimento feito por meio de funil;
- podem ser assadas em churrasqueira;
- e as tripas nunca devem ser furadas durante o cozimento.

O processamento da linguiça cuiabana inicia-se com o preparo (corte) das carnes e condimentos (lavagem e corte), seguido da adição da gordura e condimentos e da homogeneização da massa. Finalmente, adiciona-se o leite à massa cárnea, que permanece em repouso, sob refrigeração, por 24h (para desenvolvimento do sabor). Após isso procede-se o embutimento em tripas.

Em Nova Granada, a Panificadora e Merceria Pipa LTDA., representada pelo proprietário Antonio Eduardo Anqueta, é detentora da marca Linguiça Cuiabana. Registraram a marca no INPI (Instituto Nacional da Propriedade Industrial) para garantia da propriedade e uso exclusivo.

Nas pesquisas atuais, realizadas em açougues da região, verificou-se uma grande variedade de tipo de linguiça cuiabana, ou seja, transformações (modificações) em sua formulação. Essas alterações são na carne utilizada (frango, suína e ovina), na adição de outros condimentos (pimenta dedo de moça, pimenta do reino), de legumes (cenoura) e, principalmente, na presença de queijos (provolone, mussarela, minas frescal). Como consequência, houve uma descaracterização da linguiça cuiabana original, mas isso comercialmente (no aspecto sensorial) produziu um marketing (aceitação) popular bastante favorável, levando alguns tipos mais populares de linguiça frescal a adotarem alguns componentes (leite) da linguiça tipo cuiabana para enriquecer e garantir o sucesso de venda.

Análises

De acordo com as características tecnológicas da linguiça cuiabana (tabela 01), esta pode ser classificada como produto frescal conforme o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de linguiça⁹. Este regulamento determina padrões de características físico-químicas para linguiça frescal, como 70% umidade (máx.), 30% de gordura (máx.) e 12% de proteína (mín.).

Tabela 1. Composição em nutrientes das linguiças tipo cuiabana bovina (LCCB1 e LCCB2), frango (LCCF) e suína (LCCS)

	Nutrientes (%)			
	LCCB1	LCCB2	LCCF	LCCS
Umidade	70,94 ^a ± 0,21	71,73 ^a ± 0,37	72,14 ^a ± 0,19	71,15 ^a ± 0,20
Proteína	15,54 ^a ± 0,16	14,89 ^a ± 0,02	18,50 ^b ± 0,15	17,18 ^b ± 0,09
Lipídios	5,75 ^a ± 0,56	8,60 ^b ± 0,24	2,96 ^c ± 0,12	4,77 ^a ± 0,09
Cinzas	4,07 ± 0,55	2,50 ± 0,01	3,17 ± 0,04	3,25 ± 0,01
Carboidrato	3,70 ± 0,24	2,28 ± 0,24	3,23 ± 0,19	3,65 ± 0,37

Médias com letras iguais na mesma linha não diferem entre si no teste de Tukey ao nível de 5%

Oliveira et al¹⁰, ao analisarem amostras de linguiça frescal de carne de aves (peito) e suína (pernil), coletadas de 7 produtores diferentes do mercado consumidor de Brasília (DF), verificaram que, das 56 amostras estudadas, 10,71% destas encontravam-se em desacordo com a legislação para o teor de umidade, ou seja, teores acima do limite máximo (70%). Isso pode estar relacionado à adição de polifosfato em excesso, sendo que este tem como função a retenção de umidade.

Pardi et al¹¹ ressalta a grande variação no teor de lipídeos presentes nas carnes, que pode ser influenciado por fatores, como sexo, raça, alimentação, assim como cortes musculares, além de que no nosso caso não temos nenhuma informação taxionômica sobre a matéria prima utilizada na elaboração dos diferentes tipos de linguiça.

Os valores de pH das amostras LCCB1, LCCB2, LCCF e LCCS, nos tempos t_0 e t_7 , variaram entre 5,83 a 5,61. Foi observado que em todas as amostras houve redução do pH com sete dias de vida de prateleira, possivelmente causado pela fermentação do leite (adicionado na formulação) com a produção de ácido láctico.

No mesmo contexto, Ferrari e Torres¹², avaliando a oxidação lipídica de salsichas de seis diferentes locais (supermercados) na cidade de São Paulo durante seis semanas seguidas, encontraram valores de pH entre 5,08 a 6,48 e relatam a importância do controle do pH de produtos frescos que estão diretamente relacionados com o possível desenvolvimento microbiano.

Os resultados das análises microbiológicas para as amostras de linguiças cuiabanas processadas e analisadas nos tempos zero e sete dias, apresentaram-se em conformidade com os bioindicadores avaliados (Tabela 02).

Os alimentos de origem animal, principalmente os manipulados, apresentaram condições favoráveis para multiplicação de microrganismos, destacando o grupo

de linguiças tipo frescas que sofrem grande manipulação durante o processamento.

Para clostrídios sulfito redutores, foi analisada amostras com e sem choque térmico (técnica utilizada para promover a conversão das formas esporuladas em células vegetativas) e sua presença foi observada somente nas amostras não submetidas ao choque térmico. Nas amostras de linguiças de carne suína (LCCS) e frango (LCCF), analisadas logo após o processamento (t_0), obtiveram valor médio respectivamente de $1,8 \times 10^1$ UFC/g e $9,2 \times 10^1$ UFC/g, estando em acordo com a legislação vigente (Tabela 02). Estes valores não apresentaram diferença estatisticamente significativa.

Da mesma forma, Silva et al¹³, avaliando 32 (100%) amostras de linguiça mista frescal (bovina e suína) comercializadas na cidade de Pelotas (RS), não detectaram a presença de clostrídios sulfito redutores nas amostras estudadas. Esta baixa frequência de clostrídios sulfito redutores neste tipo de produto frescal, reafirma suas características peculiares de desenvolvimento, uma vez que temperaturas de refrigeração e a presença de outros microrganismos considerados competitivos podem reduzir sua taxa de crescimento¹⁴.

Para a contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva (*S. aureus*), obteve-se em todas as amostras analisadas, resultados em acordo com o padrão vigente (5×10^3 UFC/g).

Almeida Filho e Sgarini¹⁵, ao avaliarem 30 amostras de linguiças frescas, verificaram que 60 % destas apresentaram-se fora dos padrões legais. Essas variações em contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva nesses produtos podem estar relacionadas à intensa manipulação, qualidade microbiológica da matéria-prima, bem como às técnicas higiênicas-sanitárias adotadas durante o processamento¹⁶.

Com relação à presença de coliformes totais e termotolerantes (fecais), verificou-se que todas as amostras avaliadas em nosso estudo, estavam em conformidade com os padrões estabelecidos pela legislação.

Almeida Filho e Sgarini¹⁵, ao analisarem 30 amostras de linguiça frescal suína (15 produzidas sob inspeção federal e 15 de origem artesanal), encontraram, em 11 das amostras artesanais, a presença de coliformes fecais, das quais 3 amostras ultrapassaram os limites estabelecidos legalmente, evidenciando a necessidade de fiscalização e higiene durante o processamento das linguiças frescas.

Para *Salmonella* spp, todas as amostras de linguiças cuiabana encontraram-se de acordo com o estabelecido legalmente. Resultado este satisfatório, uma

vez que microrganismos do gênero *Salmonella* são um dos principais agentes de toxinfecções alimentares graves.

Marques et al² encontraram resultados semelhantes a este trabalho para pesquisa de *Salmonella* spp, também não detectaram a presença deste microrganismo nas 40 (100%) amostras de linguiça fresca pesquisadas nos municípios de Três Corações e Lavras (MG).

Esses trabalhos mostraram que é possível, a obtenção de linguiça fresca com ausência de *Salmonella* spp, utilizando-se matéria-prima de qualidade e adoção de técnicas de higiene adequada durante o processamento.

Teste de aceitação

Na análise sensorial foram avaliados os parâmetros de sabor, textura e aparência, das quatro formulações diferentes de linguiça tipo cuiabana (LCCB1, LCCB2, LCCF e LCCS).

De acordo com a literatura Dutcosky¹⁷, são considerados resultados favoráveis quando o Índice de Aceitabilidade (IA) é maior ou igual a 70%. Em nosso estudo foi considerado o IA favorável para as formulações

LCCB2, LCCF e LCCS, que apresentaram valores entre 77,22 a 84,44% para o atributo sabor, 75,56 a 77,00% para o atributo textura e 71,11 a 80,5% para aparência. Entretanto, a formulação LCCB1 apresentou índice de aceitabilidade menor que 70%, valores entre 57,78 a 64,77%.

Observa-se que nos atributos considerados (sabor, textura, aparência) a formulação LCCB1, que representa uma formulação da linguiça cuiabana original, recebeu os menores valores médios, o que confirma a tendência do mercado com a relação à preferência popular.

É importante ressaltar que antigamente a linguiça cuiabana era processada apenas com carne bovina (alcatra, contra filé) e não tinha adição de queijo, entretanto, nos dias de hoje, encontramos no comércio variações nas formulações destes produtos, como tipo de carne e adição de queijo.

CONCLUSÃO

O levantamento histórico da linguiça cuiabana nos permitiu resgatar e registrar fatos históricos. Em relação aos

Tabela 02. Resultados das análises microbiológicas, das amostras de linguiças tipo cuiabana de carne bovina (LCCB1 e LCCB2), frango (LCCF), suína (LCCS), processadas em laboratório (logo após o processamento (t_0) e com sete dias de vida de prateleira (t_7))

Amostras		Clostrídios sulfito redutores (sem choque térmico) (UFC/g)	Clostrídios sulfito redutores (com choque térmico) (UFC/g)	<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/g)	Coliformes totais (NMP/g)	Coliformes termotolerantes (NMP/g)	<i>Escherichia coli</i> (-/+)	<i>Salmonella</i> spp. (-/+)
LCCB1	t_0	< 10 ^a	< 10 ^a	1,7 x 10 ^{3a}	3,3 x 10 ^{4a}	2,6 x 10 ^{2a}	(+)	(-)
	t_7	< 10 ^a	< 10 ^a	3,6 x 10 ^{3a}	8,3 x 10 ^{2a}	1,0 x 10 ^{1b}	(+)	(-)
LCCB2	t_0	< 10 ^a	< 10 ^a	3,5 x 10 ^{2a}	1,2 x 10 ^{3a}	1,3 x 10 ^{1a}	(+)	(-)
	t_7	< 10 ^a	< 10 ^a	8,1 x 10 ^{2a}	3,3 x 10 ^{2b}	< 10 ^a	(+)	(-)
LCCF	t_0	9,2 x 10 ^{1a}	< 10 ^a	1,8 x 10 ^{3a}	7,2 x 10 ^{3a}	1,2 x 10 ^{2a}	(+)	(-)
	t_7	< 10 ^a	< 10 ^a	3,3 x 10 ^{3a}	5,9 x 10 ^{2b}	2,6 x 10 ^{3b}	(+)	(-)
LCCS	t_0	1,8 x 10 ^{1a}	< 10 ^a	3,0 x 10 ^{3a}	9,7 x 10 ^{4a}	2,1 x 10 ^{3a}	(+)	(-)
	t_7	< 10 ^a	< 10 ^a	4,3 x 10 ^{3a}	1,3 x 10 ^{7b}	4,0 x 10 ^{3a}	(+)	(-)
Padrão		máximo	máximo	máximo		máximo		ausência
Federal		3 x 10 ³	3 x 10 ³	5 x 10 ³		5 x 10 ³		em 25 g

(BRASIL, 2001)

*Letras iguais na mesma coluna, para cada tipo de linguiça avaliada, nos dois tempos analisados, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

parâmetros de qualidade físico-química, microbiológica e estabilidade durante o armazenamento, estes atenderam quase todas as exigências. A análise sensorial demonstrou que, das quatro lingüiças cuiabanas, a formulação LCCB1(original) foi a que apresentou menores índices de aceitação pelos provadores. Os resultados mostraram que as variações sofridas ao longo do tempo na formulação das lingüiças cuiabana são fatores positivos.

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Decreto nº 30.691, de 29 de mar. 1952. Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal (RIISPOA). Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 1997. Aprovado pelo decreto n. 30.691, alterado pelos decretos n. 1255 de 25/06/62, 1236 de 02/09/94, 1812 de 08/02/96 e 2244 de 04/06/97. 1997.
2. Marques SC, Boari CA, Breko CC, Nascimento ARP, Piccoli RH. Avaliação higiênico-sanitária de lingüiças tipo frescal comercializadas nos municípios de Três Corações e Lavras – MG. *Ciênc Agrotec*. 2006; 30 (6): 1120-3.
3. Cecchi HM. Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos. Campinas: Ed.Unicamp; 2001.
4. 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, 20 dez. 2000.
5. Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA, Taniwaki MH, Santos RFS, Gomes RAR. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. 3ª ed. São Paulo: Varela; 2007.
6. Minim VPR. Análise sensorial: estudos com consumidores. Viçosa: Ed. UFV; 2006.
7. UNESP - FCAV - Estat 2.0: Sistema para análise estatística (v. 2.0) campus de Jaboticabal- pólo computacional/ departamento de ciências exatas.
8. Lingüiça cuiabana. TV Tem notícias. São José do Rio Preto: TV Tem, 04 de abril de 2009. Programa de TV.
9. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 4, de 31 de março de 2000. Anexo III – Aprova o Regulamento técnico de identidade e qualidade de lingüiça. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 05 de abr. de 2000.
10. Oliveira MJ, Araújo WMC, Borgo LA. Quantificação de nitrato e nitrito em lingüiças do tipo frescal. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2005; 25 (4): 736-42.
11. Pardi MC, Santos IF, Souza ER, Pardi HS. Ciência, higiene e tecnologia da carne. Goiânia: Ed. da UFG; 2001.
12. Ferrari CKB, Torres EAFS. Lipid oxidation and quality parameters of sausages marketed locally in the town of São Paulo (Brazil). *Czech J Food Sci*. 2000; 20 (4): 1-7.
13. Silva WP, Gandra EA, Duval EH, Tessmann C, Lima AS. Qualidade microbiológica de lingüiças mistas do tipo frescal produzidas na cidade de Pelotas (RS). *Bol Ceppa*. 2002; 20 (2): 257-66.
14. Forsythe SJ. Microbiologia da segurança alimentar. São Paulo: Ed. Artmed; 2002.
15. Almeida Filho ES, Sigarini CO. Características microbiológicas de lingüiça frescal, produzida sob inspeção federal é sob condições artesanais, comercializada no município de Cuiabá-MT. *Hig Alim*. 2002; 16 (100): 102-6.
16. Morot-bizot SC, Leroy S, Talon R. Staphylococcal community of a small unit manufacturing traditional dry fermented sausages. *Int J Food Microbiol*. 2006; 108 (2): 210.
17. Dutcosky SD. Análise sensorial de alimentos. Curitiba: Ed.Champagnat; 1996. 123p.

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=&doci>].

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 em los servicios de salud. *Indicadores seleccionados del uso de medicamentos*. Ginebra; 1993. (DAP. 93.1).

Patente:

Larsen CE, Trip R, Johnson CR, inventors: Novoste Corporation, assignee. *Methods for procedures related to eletrophysiology of the heart*. US patent 5,529,067. 1995 Jun 25.

Casos não contemplados nesta instrução devem ser citados conforme indicação do *Committee of Medical Journals Editors (Grupo Vancouver)*, disponível em: <http://www.cmje.org>.

Referências a documentos não indexados na literatura científica mundial, em geral de divulgação circunscrita a uma instituição ou a um evento (teses, relatórios de pesquisa, comunicações em eventos, dentre outros) e informações extraídas de documentos eletrônicos, não mantidas permanentemente em sites, se relevantes, devem figurar no rodapé das páginas do texto onde foram citadas.

2.5 NÚMEROS DE FIGURAS E TABELAS: A quantidade de figuras e tabelas de cada manuscrito deve respeitar a quantidade definida para cada categoria de artigos aceitos pela RIAL. Todos os elementos gráficos ou tabulares apresentados serão identificados como *figura* ou *tabela*, e numerados sequencialmente a partir de um, e não como *quadros*, *gráficos* etc.

A) Tabelas: Devem ser 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.icmje.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 em pdf, ou tif, ou jpeg ou bmp, com resolução mínima 300 dpi.

5. REVISÃO DA REDAÇÃO CIENTÍFICA: Para ser publicado, o manuscrito aprovado é submetido à revisão da redação científica, gramatical e de estilo. A RIAL se reserva o direito de introduzir alterações nos originais, visando a manutenção da homogeneidade e qualidade da publicação, respeitando, porém, o estilo e as opiniões dos autores. Inclusive a versão em inglês do artigo terá esta etapa de revisão.

6. PROVAS: Após sua aprovação pelos editores, o manuscrito será revisado quanto à redação científica. O autor responsável pela correspondência receberá as provas gráficas para revisão por correio eletrônico em formato pdf (*portable document format*). O prazo máximo para a revisão da prova é de dois dias. É importante cumprir os prazos de revisão para garantir a publicação no fascículo programado. Atrasos nesta fase poderão resultar em remanejamento do artigo para fascículos subsequentes.

7. PUBLICAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO: Os artigos serão publicados em ordem cronológica de aprovação. As datas de recebimento e de aprovação do artigo constarão obrigatoriamente no mesmo.

É permitida a reprodução, no todo ou em parte, de artigos publicados na RIAL, desde que sejam indicados a origem e o nome do autor, de conformidade com a legislação sobre os direitos autorais.

A Revista do Instituto Adolfo Lutz é distribuída gratuitamente a entidades governamentais, culturais ou em permuta de periódicos nacionais ou estrangeiros.

ISSN 0073-9855



9 770073 985009