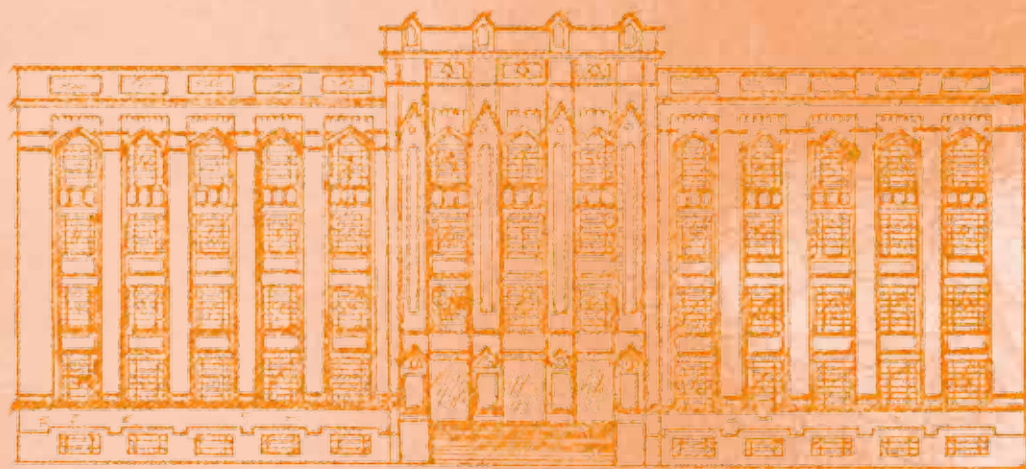


REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

ISSN 0073-9855
RIALA6



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE

Volume 69 número 2, 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 2, 2010
Abril - Junho 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-Araujo, 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(2)

ISSN 0073-9855 CDD18614.07205

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

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

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

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

Acesso on line / on line access. Texto integral / full text. <http://revista.ial.sp.gov.br>
http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_home&lng=pt&nrm=iso

Cartas ao editor:

Endereço / Address

Núcleo de Acervo

Av. Dr. Arnaldo, 355 01246-902 São Paulo/ SP – Brasil

Tel/Fax. + 55 11 3068-2869

E-mail: rial@saude.sp.gov.br

■ ARTIGOS DE REVISÃO/REVIEW ARTICLES

- 1270 **Bacteriófagos para controle de bactérias patogênicas em alimentos**
Bacteriophages for control of bacterial pathogens in foods
LÍVIA PÍCCOLO RAMOS ROSSI, ROGERIA COMASTRI DE CASTRO ALMEIDA.....151-156

■ ARTIGOS ORIGINAIS/ORIGINAL ARTICLES

- 1271 **Implementation of a strategy for improving the serological diagnosis of HIV/AIDS by introducing the internal quality control**
Implantação de estratégia para a melhoria do diagnóstico sorológico de infecção por HIV/AIDS pela introdução de controle de qualidade interno
MÁRCIA JORGE CASTEJÓN, ROSEMEIRE YAMASHIRO, CARMEM APARECIDA DE FREITAS OLIVEIRA, MIRTHES UEDA.....157-164
- 1272 **The ovicidal activity of fungi *Pochonia chlamydosporia* and *Paecilomyces lilacinus* on *Taenia saginata* eggs in laboratory trial**
Atividade ovicida dos fungos *Pochonia chlamydosporia* e *Paecilomyces lilacinus* sobre ovos de *Taenia saginata* em condições laboratoriais
JULIANA MILANI ARAUJO, FABIO RIBEIRO BRAGA, JACKSON VICTOR DE ARAÚJO, LAÉRCIO DOS ANJOS BENJAMIN.....165-169
- 1273 **Avaliação dos níveis de hemoglobina glicada em pacientes com nefropatia diabética**
Assessment of glycated hemoglobin rates in patients with diabetic nephropathy
FRANCIELEN ANVERSA DIMER, ANA CLÁUDIA CIRNE BERNDT, SÍLVIA JULIANE PIVA, RAFAEL NOAL MORESCO.....170-174
- 1274 **Sementes de pitanga (*Eugenia uniflora* L.): potencial antioxidante e perfil de ácidos graxos**
Pitanga (*Eugenia uniflora* L.) seeds: antioxidant potential and fatty acids profile
DÉBORA MARIA MORENO LUZIA, BRUNA JORGE BERTANHA, NEUZA JORGE.....175-180
- 1275 **Formulação, análises microbiológicas, composição centesimal e aceitabilidade de empanados de jundiá (*Rhamdia quelen*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tilápia (*Oreochromis niloticus*)**
Formulation, microbiological analyses, centesimal composition and acceptability of breaded catfish (*Rhamdia quelen*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*)
João de Paula CORTEZ NETTO, Wilson Rogério BOSCOLO, Aldi FEIDEN, Marcia Luzia Ferrarezi MALUF, Jakeline Marcela Azambuja de FREITAS, Márcia Regina SIMÕES.....181-187
- 1276 **Determinação da fração da fibra alimentar solúvel em raiz e farinha de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) pelo método enzimático-gravimétrico e cromatografia líquida de alta eficiência**
Determination of the soluble dietary fiber fraction in yacon (*Smallanthus sonchifolius*) root and flour by enzymatic-gravimetric method and high pressure liquid chromatography
CHRISTIANE MILEIB VASCONCELOS, CASSIANO OLIVEIRA DA SILVA, LUCIANO JOSÉ QUINTÃO TEIXEIRA, JOSÉ BENÍCIO PAES CHAVES, HÉRCIA STAMPINI DUARTE MARTINO.....188-193

- 1277 **Comparação de metodologias para detecção de fungos em arroz irradiado**
Comparison of methodologies for detecting fungi in gamma-ray irradiated rice
ÍVINA CATARINA DE OLIVEIRA GUIMARÃES, JOELMA PEREIRA, VANDA MARIA DE OLIVEIRA CORNÉLIO,
LUÍS ROBERTO BATISTA, ROSEANE MARIA EVANGELISTA, ERIC BATISTA FERREIRA.....194-200
- 1278 **Atividade do *Lactobacillus plantarum* na preservação da anchoita (*Engraulis anchoita*) fermentada**
Activity of *Lactobacillus plantarum* on the fermented anchoita (*Engraulis anchoita*) preservation
NÁDIA CARBONERA, MILTON LUIZ PINHO ESPÍRITO SANTO.....201-207
- 1279 **Avaliação da qualidade microbiológica de alimentos prontos para consumo servidos em escolas atendidas pelo Programa Nacional de Alimentação Escolar**
Microbial quality assessment of ready-to-eat foods served at schools supported by the National Scholar Food Supply Program
RYZIA DE CASSIA VIEIRA CARDOSO, ROGÉRIA COMASTRI DE CASTRO ALMEIDA, ALAÍSE GIL GUIMARÃES, JOSÉ
ÂNGELO WENCESLAU GÓES, AÍSI ANNE CARVALHO SANTANA, SUELI ALVES DA SILVA, PERMÍNIO OLIVEIRA VIDAL
JÚNIOR, LARISSA BRITO HUTTNER, KARLA VILA NOVA DE ARAÚJO FIGUEIREDO.....208-213
- 1280 **Influência dos procedimentos de fabricação nas características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas de queijo de coalho**
Influence of the production procedures on the physic-chemical, sensory and microbiological characteristics of *coalho* cheese
MARIA CRISTINA DELGADO DA SILVA, ALÉCIA CRISTINNE SANTOS RAMOS, IZILDINHA MORENO,
JULIANA DE OLIVEIRA MORAES.....214-221
- 1281 **Avaliação das boas práticas de fabricação em linha de processamento de queijos Minas frescal e ricota**
Evaluation of good manufacturing practices in the processing line of fresh Minas and Ricotta cheeses
VIDIANY APARECIDA QUEIROZ SANTOS, FERNANDO LEITE HOFFMANN.....222-228
- 1282 **Avaliação físico-química da qualidade de água de poços e minas destinada ao consumo humano**
Physico-chemical evaluation of drinking water quality from wells and springs for human consumption
MARIA ANITA SCORSÁFAVA, ARLETE DE SOUZA, MONICA STOFER, CLAUDETE AZEVEDO NUNES,
THAÏS VALÉRIA MILANEZ.....229-232
- 1283 **Compostos bioativos e potencial antioxidante do pólen apícola produzido por abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.)**
Bioactive compounds and antioxidant potential of bee pollen produced by africanized bees (*Apis mellifera* L.)
JEANE DENISE DE SOUZA MENEZES, LEONARDO FONSECA MACIEL, MARIA SPINOLA MIRANDA,
JANICE IZABEL DRUZIAN.....233-242
- 1284 **Análise das proteínas e estudo reológico dos isolados proteicos das amêndoas da faveleira (*Cnidoscopus phyllacanthus* (Mart.) Pax. et K. Hoffm.) com e sem espinhos**
Analysis on rheological properties of proteins isolated from nuts from *faveleira* trees (*Cnidoscopus phyllacanthus* (Mart.) Pax. et K. Hoffm.) with and without thorns
MÔNICA TEJO CAVALCANTI, PUSHKAR SINGH BORA.....243-251

COMUNICAÇÃO BREVE/BRIEF COMMUNICATION

- 1285 **Ocorrência de parasitas e comensais intestinais em crianças da comunidade da Vila Inglesa, em São Paulo, SP, Brasil**
Occurrence of intestinal parasites and commensals among children of Vila Inglesa, community of São Paulo, State of Sao Paulo, Brazil
LÚCIA MARA LOPES, EMERSON DA SILVA SANTOS, THAÍ DE LIMA SAVEGNAGO, FÁBIA ANDRÉA SALVADOR,
ERIKA RENATA RIBEIRO-BARBOSA.....252-254
- 1286 **Estudo sensorial e nutricional da merenda escolar de uma escola da cidade de Lauro de Freitas-BA**
Sensorial and nutritional study on scholar lunches served at a school in Lauro de Freitas city, Bahia, Brazil
ADRIANA LÚCIA DA COSTA SOUZA, MARIA EUGÊNIA OLIVEIRA MAMEDE.....255-260

1287	Qualidade microbiológica de alimentos servidos em restaurantes <i>self-service</i> Microbiological quality of food from <i>self-service</i> restaurants KARINNA CHOUMAN, ELISA HELENA GIGLIO PONSANO, APARECIDA DE FÁTIMA MICHELIN.....	261-266
■ NOTA CIENTÍFICA/SHORT COMMUNICATION		
1288	Pesquisa de bacteriófagos em água suspeita de contaminação por vírus da hepatite A Study of bacteriophages in water suspected of contamination by hepatitis A virus ANA MARIA RAMALHO DE PAULA, GISELLE IBETTE LOPEZ LOPES, HARUMI SAKUMA, ANA PAULA DE SOUZA, CHRISTIANE ASTURIANO RISTORI, RUTH ESTELA GRAVATO ROWLANDS, MARLI UEDA, MARIA LUISA BARBOSA, MIYOKO JAKABI.....	267-269
■ INSTRUÇÕES AOS AUTORES.....		271

Bacteriófagos para controle de bactérias patogênicas em alimentos

Bacteriophages for control of bacterial pathogens in foods

RIALA6/1270

Lívia Pícolo Ramos ROSSI^{1*}, Rogeria Comastri de Castro ALMEIDA²

*Endereço para correspondência: ¹Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano - IFBAIANO, *Campus* Catu-BA, 1ª Trav. Arnaldo Lopes da Silva, 74, apto 1103 - Edf. Mar Caribe - Bairro: Stiep - CEP: 41770-160 Salvador-BA, Brasil, Tel.: (71) 3342-2552 (71) 9981-9112 - e-mail: liviapr@hotmail.com

²Universidade Federal da Bahia, Escola de Nutrição, Departamento de Ciência dos Alimentos

Recebido: 30.10.2009 – Aceito para publicação: 03.05.2010

RESUMO

Nos últimos anos, um grande número de estratégias para minimizar a contaminação microbiana de alimentos tem sido explorado. Problemas com aceitabilidade e alteração nas características organolépticas dos alimentos, decorrentes de tratamentos físicos como o emprego do calor e da luz ultravioleta, têm sido descritos. Além disso, os consumidores estão buscando cada vez mais os alimentos naturais, isto é, isentos de conservantes químicos. Uma abordagem que tem sido objeto de interesse crescente é a utilização de bacteriófagos, que são vírus que infectam e matam as bactérias. Os bacteriófagos são componentes da microbiota natural da produção de alimentos, desde o campo até a comercialização; são estáveis nesses ambientes e são prontamente recuperados do solo, da água, de efluentes, das fezes e dos próprios alimentos. Os estudos para o controle de micro-organismos patogênicos em alimentos com o uso de bacteriófagos são promissores, mas ainda necessitam ser aperfeiçoados. O sucesso dessa metodologia dependerá da aceitação do consumidor dentre outros fatores. Por esta razão, é prudente considerar cuidadosamente a fonte de qualquer bacteriófago antes deste ser aplicado nos alimentos.

Palavras-chave. bacteriófago, bactérias patogênicas, alimentos.

ABSTRACT

Over the last few years, a number of strategies to minimize the microbial load in raw products have been explored. Problems with the acceptability and deterioration of organoleptic properties have been described after physical treatments such as steam, dry heat and UV light. Moreover, consumers are looking for more natural foods, i.e. free from chemical preservatives. An approach that has been the object of growing interest is the use of bacteriophages, which are viruses that infect and kill bacteria. Bacteriophages are components of the natural microflora in the food production continuum from the farm to the retail outlet; they are stable in these environments and are readily recovered from soil, sewage, water, farm and processing plant effluents, feces, and retail foods. Studies on pathogens control in foods by using bacteriophage are promising, however they have to be improved. The success of this methodology will depend on the consumer's acceptance. In this way, it is recommended to carefully consider the origin of the phage before introducing it into foods.

Key words. bacteriophages, bacterial pathogens, foods.

INTRODUÇÃO

Bacteriófagos são vírus que invadem a célula bacteriana e, no caso de fagos líticos, destroem o metabolismo bacteriano e levam à lise celular da bactéria¹. Possuem atributos que são atrativos para aqueles que buscam novos modos para controlar os patógenos de origem alimentar e micro-organismos deterioradores². São as unidades mais abundantes de autorreplicação no ambiente, e estão presentes em quantidades significativas na água e nos mais diversos tipos de alimentos, particularmente nos fermentados³. Além do mais, os fagos também são organismos comensais normais do homem e dos animais, e são abundantes, especialmente no trato gastrointestinal⁴.

Com o advento dos antibióticos, as pesquisas envolvendo fagos foram abandonadas na maioria dos países do ocidente⁵. Entretanto, mesmo que lentamente, as pesquisas estão sendo retomadas e alguns estudos^{2,3,6} resumem o *status* atual do uso de fagos para o controle de bactérias indesejáveis, exceto em terapia de doenças em humanos e animais. O potencial dos fagos para controle de patógenos de origem alimentar é citado em estudos com *Salmonella* spp.⁷⁻¹¹, *Campylobacter* spp.^{7,12}, *Campylobacter jejuni*¹³, *Escherichia coli*^{14,15} e *Listeria monocytogenes*^{12,16,17,18}.

Bacteriófagos como agentes antimicrobianos

Em 1915, Frederick W. Twort, na Inglaterra publicou uma nota descrevendo a destruição infecciosa de colônias de micrococcos por um agente que parecia ser viral porque atravessava os filtros que retinham bactérias. Estes eram inativados por aquecimento a 60°C durante 1 hora e não podiam proliferar de forma autônoma. Em 1917, Felix d'Herelle, no Instituto Pasteur, em Paris, estudou o fenômeno de maneira independente e demonstrou a natureza da partícula o qual denominou de *bacteriófago*, que significa “comedor de bactérias”^{10,19}. A partir destas observações o fenômeno foi denominado *fenômeno Twort-d'Herelle*^{10,19}. E, na década de 1930, o caráter viral do bacteriófago foi confirmado pelo trabalho de Burnet e de Schlsinger^{10,19}.

Como todos os vírus, os bacteriófagos são compostos de DNA ou RNA recobertos por uma capa de proteína chamada capsídeo. O ácido nucleico pode ser de fita simples ou dupla e em alguns bacteriófagos o capsídeo é coberto por uma cauda contendo lipídios que

desempenham, provavelmente, a função da aderência do bacteriófago à parede das células hospedeiras. Muitos bacteriófagos possuem elementos estruturais na parte distal de sua cauda, alguns formam uma placa basal com uma a seis fibras, enquanto outros bacteriófagos contêm proteínas e ácidos não-nucleicos em seus capsídeos. Variam em forma e tamanho, podendo conter de seis a mais de 100 genes¹⁰.

Os bacteriófagos contendo DNA fita dupla (dsDNA) são provavelmente o grupo numericamente abundante de organismo similar na biosfera, e aproximadamente 4.500 bacteriófagos dsDNA são capazes de infectar uma grande diversidade de hospedeiros bacterianos. A classificação de bacteriófagos pelo seu grupo hospedeiro, morfologia ou avaliação de ciclos de vida tem conduzido para conclusões conflitantes a respeito de sua origem e evolução¹¹.

Os bacteriófagos não possuem metabolismo próprio, pois dependem da bactéria hospedeira na qual se multiplica. Exibem uma larga faixa de hospedeiros, tendo como alvo usualmente linhagens específicas⁴. O ciclo de reprodução fágica tem como primeiro passo o reconhecimento por um receptor primário da célula hospedeira, seguido pela adsorção em um segundo receptor. A primeira adesão é reversível – a célula pode não estar viva. A segunda adesão é irreversível, e subsequentemente, o DNA fágico circulariza e a bactéria inicia a produção de proteínas fágicas. Essas proteínas sequestram a célula hospedeira por inteiro e forçam a mesma a produzir exclusivamente novos bacteriófagos. Após a reunião da progênie fágica, duas proteínas fágicas promovem a quebra do envelope celular (lise), resultando na liberação de novos bacteriófagos, prontos para iniciar o novo ciclo. A especificidade extremamente alta dos bacteriófagos para um hospedeiro distinto é atribuída a cada passo no processo, que requer o sistema bacteriófago/hospedeiro para ser compatível. A capacidade de reconhecer os diferentes receptores da parede celular é útil se a informação genética do bacteriófago não puder ser “lida” pelo hospedeiro. Também, cada bactéria certamente tem seu próprio complemento de bacteriófagos especializados com os quais se completa, e bacteriófagos não especializados que serão inefetivos. Na ausência da bactéria alvo, os bacteriófagos se desintegram em partículas comuns biológicas que são naturalmente absorvidas de volta ao ambiente⁵.

A temperatura e o tipo de hospedeiro podem influenciar o número de progênie fágica gerada e em

geral todo o ciclo, mas para aplicação em alimentos, é importante lembrar que o sucesso da infecção inevitavelmente leva a célula à morte. A partir do momento em que a aplicação dos bacteriófagos em alimentos é concebida, com o objetivo de remover uma bactéria contaminante, a célula terá que encontrar um bacteriófago. Esse encontro resulta na infecção e conseqüentemente na lise bacteriana. Em termos ecológicos, a população fágica apenas aumentará quando existir número suficiente de células hospedeiras, mas esse não é o objetivo da aplicação de bacteriófagos em alimentos. O objetivo é a erradicação do patógeno como um modo apropriado de prevenir um futuro aumento indesejável do mesmo. Esse somente estará em baixos números se as condições de higiene forem adotadas no processamento de alimentos, o que significa que um número suficiente de bacteriófago tem que ser aplicado para a interação bacteriófago/hospedeiro tornar-se viável⁵.

Considerações em uma estratégia de biocontrole com bacteriófago

O uso de bacteriófagos como agente antimicrobiano e como ferramenta para detecção de patógenos em alimentos e produtos alimentícios vem aumentando em várias partes do mundo. Os campos de aplicação compreendem desde a segurança da água e alimentos ao emprego na agricultura e saúde animal. Um exemplo é a recente aprovação pela “US Environmental Protection Agency” do produto comercial “Agriphage” para o controle de bactéria patogênica em ambientes. Na indústria de produção de alimentos, a “Food and Drug Administration” (FDA) aprovou em 2006 a utilização de um “pool de bacteriófagos” denominado bacteriófago P100 (Listex™P100) para o controle de *Listeria monocytogenes* em carnes e queijos¹.

O biocontrole com bacteriófagos tem as vantagens exclusivas de se tratar de um reagente natural, que se automultiplica e é altamente específico²⁰. Outra qualidade valiosa é a notável estabilidade dos bacteriófagos em alimentos²¹. Bacteriófagos de *Campylobacter* podem sobreviver aos procedimentos de abate de aves¹², uma característica necessária para assegurar a sua capacidade de controlar as bactérias durante a vida útil dos alimentos.

Em um estudo toxicológico em ratos, uma preparação purificada do bacteriófago P100 foi utilizada

para investigar a sua segurança e tolerância, e nenhuma mudança histopatológica, mortalidade ou morbidade relacionada ao P100 foi observada pelos autores²². Outros estudos anteriores da aplicação do bacteriófago em animais também não reportaram qualquer efeito adverso ou inesperado do vírus de bactérias^{23,24}. Paralelo a esses resultados, um estudo com voluntários humanos recebendo o bacteriófago T4 indicou que o mesmo é seguro para a administração oral; e nenhum bacteriófago ou anticorpos específicos do bacteriófago puderam ser detectados²⁵.

Apesar destas vantagens excepcionais, alguns autores têm desenvolvido argumentos questionando a eficácia de bacteriófagos como agentes antimicrobianos^{26,27}. A transdução dos bacteriófagos pode transferir características indesejáveis, tais como genes virulentos, de um organismo para outro, e a conversão lisogênica pode produzir células bacterianas que não são mais suscetíveis a ataques. Bacteriófagos por si só podem sofrer mutações de bacteriófagos líticos virulentos para bacteriófagos temperados, que geralmente formam uma associação não lítica com as bactérias hospedeiras, resultando em lise de apenas uma pequena proporção da população²⁸. Portanto, para serem usados em qualquer aplicação de biocontrole, os bacteriófagos devem ser cuidadosamente caracterizados para determinar se eles podem executar transdução generalizada, ou se eles carregam qualquer gene de virulência que poderia ser expresso no hospedeiro antes da morte².

Carlton et al²², ao sequenciarem o genoma do bacteriófago P100, não encontraram nenhuma similaridade em qualquer um dos 174 produtos dos genes preditos do P100 para qualquer toxina conhecida ou suspeita, ou outro fator envolvido na regulação da virulência e/ou patogenicidade de *Listeria* ou outros organismos.

A utilização de misturas de bacteriófagos de distintas famílias pode vir a ajudar a resolver os problemas relacionados com a resistência bacteriana^{16,27,29}. Em uma investigação de controle da contaminação por *E. coli* O157:H7 através de bacteriófagos, O’Flynn et al³⁰ concluíram que os bacteriófagos KH1, KH4 e KH5 são específicos para o sorotipo O157, considerando o fato de que esses bacteriófagos lisaram todas as linhagens de *E. coli* O157 testadas e não lisaram as linhagens que não eram de *E. coli* ou de *E. coli* O157, ou linhagens de *E. coli* O157 mutante deficiente. Segundo os autores, a infecção fágica foi dependente da natureza do lipopolissacarídeo (LPS) O157 presente e que o complemento de *E. coli*

O157-mutante deficiente, *E. coli* F12 (pF12), que produz um O157 LPS truncado, foi resistente à infecção. Consistente com essa ideia, os autores afirmam que resultados preliminares indicam que nas linhagens *E. coli* O157:H7 resistentes aos bacteriófagos existem significativas alterações no comprimento ou na regulação da produção do LPS. Tanji et al²⁹ conduziram um estudo do mecanismo de resistência do bacteriófago em *E. coli* O157:H7 e verificaram que o uso de coquetéis de fagos utilizando receptores celulares distintos reprimia o aparecimento da resistência.

Uma das mais importantes vantagens do biocontrole de bactérias patogênicas por bacteriófagos é a especificidade por um hospedeiro particular. A afinidade bem sucedida de um bacteriófago para com o seu hospedeiro exige vínculo entre receptores específicos na superfície celular e antirreceptores no fago². Os receptores típicos incluem a membrana externa que transporta proteínas, lipopolissacarídeos, carboidratos, e estruturas especializadas como os flagelos. Alguns fagos podem se ligar a vários receptores ou a mais de um receptor simultaneamente³¹. Consequentemente, um patógeno como *E. coli* O157:H7 pode ser infectada por um bacteriófago em particular, mas sorovares não patogênicos estreitamente relacionadas podem permanecer inalterados.

A especificidade dos bacteriófagos com o hospedeiro sugere que a infecção de células humanas é improvável². O uso medicinal extensivo de terapia com bacteriófagos na antiga União Soviética e nos países da Europa Oriental sugere que as preparações de bacteriófagos podem ser ingeridas com segurança³². Trabalhadores e seus familiares ingeriram preparações de bacteriófagos antes da avaliação clínica com o intuito de comprovar sua segurança³³. As experiências com animais demonstraram que a dose oral para o hospedeiro não adaptado ao bacteriófago, mesmo quando elevada, não desencadeou a presença de bacteriófagos no sistema circulatório²⁴. Mesmo quando bacteriófagos são utilizados em doses terapêuticas, há pouca evidência em seres humanos sobre graves reações imunes aos bacteriófagos. Algumas leves reações adversas foram relatadas em menos que 0,5% dos pacientes com terapia, mas os efeitos foram facilmente revertidos²⁴. Entretanto, um grande problema que pode advir do uso de bacteriófagos é a liberação de toxinas bacterianas oriundas da lise dessas células, mas isto também é observado com outras práticas usadas para o controle do crescimento bacteriano.

Outro fator em alguns sistemas alimentares é a presença de um número significativo de células bacterianas não hospedeiras. Nesse caso, a eficiência dos bacteriófagos como agentes de biocontrole é limitada por uma dependência em relação à difusão passiva do transporte de partículas infecciosas para o hospedeiro².

Sobrevivência do bacteriófago em alimentos e nas instalações do processamento

Considerações sobre a estabilidade de bacteriófagos em alimentos são importantes porque, para se ter sucesso com o uso de bacteriófagos como agentes de biocontrole, eles precisam ser estáveis sob as condições físico-químicas (por exemplo, o pH e a atividade de água) dos alimentos a que serão aplicados².

Matriz do alimento: A concentração do bacteriófago deve ser alta o bastante para permitir o contato das partículas virais com a célula hospedeira no alimento, em um dado tempo e de acordo com a limitação espacial. Em alimentos líquidos isto não se traduz em problema, devido ao fato de que as partículas fágicas podem se difundir mais livremente. Entretanto, a situação é diferente em alimentos sólidos onde a habilidade da superfície para absorver líquido da suspensão fágica se constitui em parâmetro decisivo³⁴.

Tolerância ao pH: A investigação do efeito lítico de bacteriófagos específicos para *Salmonella* na redução da população do micro-organismo em fatias de melão fresco e maçã, contaminados experimentalmente, indicou que o baixo pH das fatias de maçã (pH 4,2 versus pH 5,8 para as fatias de melão) pode ter contribuído para a ineficácia do tratamento com o bacteriófago. Outro estudo conduzido posteriormente pelos autores, também com fatias de melão e maçã frescos, inoculados experimentalmente com *L. monocytogenes*, demonstrou resultados semelhantes, ou seja, o título do "pool" de bacteriófagos declinou consideravelmente nas fatias de maçã, resultando na ineficácia do tratamento¹⁶. Uma vez que o pH do alimento não se encontra na faixa crítica, a inativação das partículas fágicas pode ser devida secundariamente a compostos presentes naturalmente em alimentos, conhecidos por inativar vírus e bacteriófagos, tais como os ácidos orgânicos e taninos³⁴.

Termotolerância: O efeito do estresse térmico sobre os bacteriófagos pode ser variável. A sobrevivência

de bacteriófagos termotolerantes ao processo de pasteurização é um importante ponto de entrada para os bacteriófagos em laticínios. O exame de bacteriófagos de *Lactobacillus helveticus* por Quiberoni et al³⁵ revelou que a termotolerância foi dependente do bacteriófago e do meio utilizado, com alguns isolados inativados em temperaturas de pasteurização de 63 a 72°C e outros exigindo tratamento a 90°C. Bacteriófagos isolados a partir de soro de queijo e iogurte requereram aquecimento a 90°C durante 5 minutos para reduzir os números de 10^6 - 10^7 UFP/mL para menos de 10 UFP/mL³⁶. Estudo mais recente conduzido por Avsaroglu et al³⁷ demonstra que o tratamento com o uso de pressão de 350 MPa/5min. e calor a 71,7°C/3min. foi efetivo na inativação de bacteriófagos específicos para bactérias lácticas. Assim, os bacteriófagos podem ser mais resistentes ao calor do que a maioria das bactérias vegetativas, podendo sobreviver a tratamentos térmicos aplicados rotineiramente para alguns alimentos.

Luz visível e ultravioleta: A maioria dos efeitos inativadores parece ser devido aos danos acumulados nos ácidos nucleicos. Em sistemas aquáticos, a luz solar (em especial UV-B) parece ser o principal fator no declínio do número de bacteriófagos³⁸.

Sanitizantes: Estudos em laticínios demonstraram que o hipoclorito de sódio (100 ppm de cloro livre) e o ácido peracético inativaram bacteriófagos do leite dentro de 5 a 10 min³⁵. O uso de etanol a 75% (v/v) foi efetivo contra bacteriófagos, enquanto o isopropanol não foi tão eficaz. Como os bacteriófagos são em geral mais capazes de resistir às mudanças ambientais do processamento de alimentos que as bactérias, eles podem persistir em locais que não sejam limpos e sanitizados adequadamente²¹.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As técnicas para controle de bactérias patogênicas não devem alterar as propriedades sensoriais e nutricionais dos alimentos. Elas devem ser seguras, de baixo custo e aceitas pela população. Atualmente, nenhuma técnica atende a todos esses critérios, embora uma ampla gama de metodologias tem sido proposta para o controle de patógenos e micro-organismos deterioradores em alimentos. Estratégias de intervenção focalizando o início da cadeia produtiva têm sido usadas, entretanto essas medidas são caras e difíceis de serem mantidas.

A aplicação de bacteriófagos virulentos para o controle de micro-organismos patogênicos em alimentos representa uma alternativa para as abordagens tradicionais à preservação e segurança alimentar. Infelizmente, a maioria dos dados disponíveis na literatura é relacionada a estudos utilizando alimentos inoculados artificialmente. A tecnologia deve ser transferida para o campo para avaliar o potencial do biocontrole com bacteriófago em bactérias contaminantes naturais em condições práticas de produção de alimentos, processamento e armazenamento. De todos os fatores com potencial para limitar a eficácia do controle de bactérias através dos bacteriófagos, a preocupação mais significativa é a gama restrita de hospedeiros em relação à diversidade de bactérias susceptíveis que habitam os alimentos. Uma abordagem mais gratificante e prática seria gerar bacteriófagos com uma gama mais extensa de hospedeiros e, em seguida, montar um “pool” de bacteriófagos com atividades complementares. Além do mais, os bacteriófagos também poderiam ser usados como um componente adicional, onde eles poderiam agir sinergicamente quando aplicados com um agente antimicrobiano compatível, como por exemplo, uma bacteriocina.

O árbitro final do sucesso da aplicação de bacteriófagos em alimentos será, contudo, o consumidor. Por esta razão, é prudente considerar cuidadosamente a fonte de qualquer bacteriófago a ser aplicado aos alimentos.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. García P, Martínez B, Obeso JM, Rodríguez A. Bacteriophages and their application in food safety. *Lett App Microbiol*. 2008; 47:479-85.
2. Hudson JA, Billington C, Carey-Smith G, Greening G. Bacteriophages as biocontrol agents in food. *J Food Prot*. 2005; 68(2):426-37.
3. Sulakvelidze A, Barrow P. Phage therapy in animals and agribusiness. In: Kutter, E, Sulakvelidze A. *Bacteriophages: biology and applications*. Boca Raton: CRC Press; 2005. p.335-80.
4. Breitbart M, Hewson I, Felts B, Mahaffy JM, Nulton J, Salamon P et al. Metagenomic analysis of an uncultured viral community from human feces. *J Bacteriol*. 2003; 185(20):6220-23.

5. Hagens S, Offerhaus ML. Bacteriophages – New weapons for food safety. *Food Technol*. 2008; 62(4): 46-54.
6. Greer GG. Bacteriophage control of foodborne bacteria. *J Food Prot*. 2005; 68(5):1102-11.
7. Goode D, Allen VM, Barrow PA. Reduction of experimental *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of chicken skin by application of lytic bacteriophages. *Appl Environ Microbiol*. 2003; 69(8):5032-6.
8. Leverentz B, Conway WS, Alavidze Z, Janisiewicz WJ, Fuchs Y, Camp MJ et al. Examination of bacteriophage as a biocontrol method for *Salmonella* on fresh-cut fruit: a model study. *J Food Prot*. 2001; 64(8):1116-21.
9. Whichard JM, Sriranganathan N, Pierson FW. Suppression of *Salmonella* growth by wild-type and large-plaque variants of bacteriophage Felix O1 in liquid culture and on chicken frankfurters. *J Food Prot*. 2003; 66(2):220-5.
10. Pelczar JR, Chan ECS, Krieg NR. *Microbiologia – conceitos e aplicação*. 2ª ed. São Paulo: Makron; 1997. 525p.
11. Moselio S, Engleberg CN, Barry I. *Microbiologia*. 3a ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2002. 664p.
12. Atterbury RJ, Connerton PL, Dodd CE, Rees CE, Connerton IF. Application of host-specific bacteriophages to the surface of chicken skin leads to a reduction in recovery of *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol*. 2003; 69(10):6302-6.
13. Loc Carrillo C, Atterbury RJ, El-Shibiny A, Connerton PL, Dillon E, Scott A et al. Bacteriophage therapy to reduce *Campylobacter jejuni* colonization of broiler chickens. *Appl Environ Microbiol*. 2005; 71(11): 6554–63.
14. Huff WE, Huff GR, Rath NC, Balog JM, Donoghue AM. Alternatives to antibiotics: utilization of bacteriophage to treat colibacillosis and prevent foodborne pathogens. *Poul Sci*. 2005; 84(4):655-9.
15. Toro H, Price SB, McKee S, Hoerr FJ, Krehling J, Perdue M et al. Use of bacteriophages in combination with competitive exclusion to reduce *Salmonella* from infected chicken. *Avian Dis*. 2005; 49(1):118-24.
16. Leverentz B, Conway WS, Camp MJ, Janisiewicz W, Abuladze T, Yang M et al. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages and a bacteriocin. *Appl Environ Microbiol*. 2003; 69(8):4519-26.
17. Leverentz B, Conway WS, Janisiewicz W, Camp MJ. Optimizing concentration and timing of a phage spray application to reduce *Listeria monocytogenes* on honeydew melon tissue. *J Food Prot*. 2004; 67(8):1682-6.
18. Hendrix RW, Margareth CM, Smith R, Burns N, Ford ME, Hatful AG. Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: All the world's a phage. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 1999; 19, 2192-97.
19. Joklik WK, Willente HP, Amos DB, Wilfert, CM. *Zinsser microbiología*. 20a ed. Bogotá: Panamericana; 1994.
20. Modi R, Hirvi Y, Hill A, Griffiths MW. Effect of phage on survival of *Salmonella Enteritidis* during manufacture and storage of Cheddar cheese made from raw and pasteurized milk. *J Food Prot*. 2001; 64(7):927-33.
21. Kennedy JEJ, Bitton G. Bacteriophages in foods. In: Goyal SM, Gerba CP, Bitton G, editors. *Phage ecology*. New York: John Wiley & Sons; 1987. p.286-316.
22. Carlton RM, Noordman WH, Biswas B, Meester ED, Loessner MJ. Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: Genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application. *Reg Toxic Pharmacol*. 2005; 43(3):301-12.
23. Chibani-Chennoufi S, Bruttin A, Dillmann ML, Brüssow H. Phage-host interaction: an ecological perspective. *J Bacteriol*. 2004; 186:3677-86.
24. Merrill CR, Biswas B, Carlton R, Jensen NC, Creed GJ, Zullo S et al. Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 1996; 93:3188-92.
25. Bruttin A, Brüssow H. Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49(7):2874-78.
26. Joerger RD. Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. *Poult Sci*. 2003; 82(4):640-7.
27. Sklar IB, Joerger RD. Attempts to utilize bacteriophage to combat *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infection in chickens. *J Food Saf*. 2001; 21(1):15-29.
28. Ackermann HW, Greer GG, Rocourt J. Morphology of *Brochothrix thermosphacta* phages. *Microbios*. 1988; 56(226):19-26.
29. Tanji Y, Shimada T, Yoichi M, Miyanaga K, Hori K, Unno H. Toward rational control of *Escherichia coli* 0157:H7 by a phage cocktail. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2004; 64(2):270-4.
30. O'Flynn G, Ross RP, Fitzgerald GF, Coffey A. Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for biocontrol of *Escherichia coli* 0157:H7. *Appl Environ Microbiol*. 2004; 70:3417-21.
31. Goldberg EL, Griuius L, Letellier L. Recognition, attachment, and injection. In: Karam JD. *Molecular biology of bacteriophage T4*. Washington, D.C.: American Society for Microbiology; 1994. p.347-56.
32. Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JGJ. Bacteriophage therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; 45(3):649-59.
33. Summers WC. Bacteriophage therapy. *Annu Rev Microbiol*. 2001; 55:437-51.
34. Guenter S, Huwyler D, Richard S, Loessner MJ. Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Appl Environ Microbiol*. 2009; 75(1):93-100.
35. Quiberoni A, Suarez VB, Reinheimer JA. Inactivation of *Lactobacillus helveticus* bacteriophages by thermal and chemical treatments. *J Food Prot*. 1999; 62(8):894-98.
36. Binetti AG, Reinheimer JA. Thermal and chemical inactivation of indigenous *Streptococcus thermophilus* bacteriophages isolated from Argentinian dairy plants. *J Food Prot*. 2000; 63(4):509-15.
37. Avsaroglu MD, Bozoglu F, Mustafa Akçelik M, Bayindirli A. Effect of high pressure on lactococcal bacteriophages. *J Food Saf*. 2009; 29:26-36.
38. Sinton LW, Hall CH, Lynch PA, Davies-Colley RJ. Sunlight inactivation of fecal indicator bacteria and bacteriophages from water stabilization pond effluent in fresh and saline waters. *Appl Environ Microbiol*. 2002; 68(3):1122-31.

Implementation of a strategy for improving the serological diagnosis of HIV/AIDS by introducing the internal quality control

Implantação de estratégia para a melhoria do diagnóstico sorológico de infecção por HIV/AIDS pela introdução de controle de qualidade interno

RIALA6/1271

Márcia Jorge CASTEJÓN^{1*}, Rosemeire YAMASHIRO¹, Carmem Aparecida de Freitas OLIVEIRA¹, Mirthes UEDA²

*Corresponding author: ¹Center of Immunology, Central Laboratory, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo – SP, Brazil. E-mail: mcastejon@ial.sp.gov.br, marciajcastejon@gmail.com

²Associate Scientific Investigator, Central Laboratory, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo – SP, Brazil

Recebido: 13.04.2010 – Aceito para publicação: 24.05.2010

RESUMO

No presente estudo estão descritos os resultados das primeiras análises feitas quanto ao desempenho das unidades componentes da Rede de Laboratórios de Diagnóstico de HIV/AIDS do Estado de São Paulo, que concordaram em participar da implantação do controle de qualidade interno para o diagnóstico sorológico da infecção pelo HIV (CQI-HIV) nos respectivos serviços referentes à detecção de anticorpos anti-HIV. De abril de 2009 a fevereiro de 2010 foram distribuídos os painéis de soro CQI-HIV para 37 laboratórios da sub-rede do Estado de São Paulo. Desses, 27 (73,0%) enviaram ao IAL Central os formulários com os resultados obtidos no CQI-HIV para EIA/ELISA. Entre os 22 (59,5%) laboratórios que realizam também o ensaio de IFI HIV-1 na rotina diagnóstica, 11 (50,0%) executaram o sistema CQI para esse teste. Em vista dos laboratórios participantes terem apresentado idênticos dados na determinação de reatividade ideal das amostras do painel para os conjuntos diagnósticos procedentes de mesmas firmas produtoras e de diferentes lotes, pode-se inferir que os laboratórios seguiram os procedimentos preconizados, o que demonstra a adequada execução da conduta padronizada. Ademais, a análise dos resultados obtidos indica que os conjuntos diagnósticos utilizados pela rede de laboratórios são de boa qualidade e de boa reprodutibilidade. **Palavras-chave.** controle de qualidade, infecção HIV, sorodiagnóstico AIDS, anticorpos anti-HIV.

ABSTRACT

The present study reports the data resulted from the first evaluation on the performance of the laboratory units of the HIV/AIDS Diagnosis Laboratory Network of the State of São Paulo, which have agreed to participate in the Internal Quality Control scheme for HIV antibody testing (HIV-IQC) at the respective routine diagnostic services. From April 2009 to February 2010, the HIV-IQC serum panels were distributed to 37 laboratories of the Sub-Network of São Paulo State. Of these, 27 (73.0%) sent the forms back to the IAL-Central Lab with the achieved results from the IQC in HIV EIA/ELISA kits. Among 22 (59.5%) laboratories, which perform additional HIV antibody testing by indirect immunofluorescence-based assay (HIV-IFA), 11 (50.0%) carried out the HIV-IFA IQC. As identical data were reported from procedures by employing the IQC samples in different batches of EIA/ELISA kits from the same manufacturers, it may be inferred that the laboratories have complied with the recommended procedures, and that the standardized conduct has been followed. Furthermore, the analyses on reported results indicated that the majority of commercial diagnostic kits used for routine HIV antibody testing at the Network laboratories show good quality and reproducibility.

Key words. quality control, HIV infection, AIDS serodiagnosis, anti-HIV antibodies.

INTRODUCTION

HIV infection and AIDS have currently been diagnosed by means of laboratory methodologies for determining the circulating anti-HIV antibodies (HIV Ab testing), the circulating HIV antigens, the related immunologic markers, HIV viral load, HIV DNA PCR, HIV genotyping, drug resistance, HIV presumptive recent infection assay¹⁻⁶, and in Brazil these tests have been conducted by specific Laboratory Networks, being the HIV Ab testing Network the largest one, mainly in São Paulo State.

At any of these strategies, the HIV Ab testing laboratory network faces a primary challenge over the quality control issue. The excellence in the analytical quality of the employed diagnostic reagent kits and the accurate performance of serology tests are critical for producing high quality laboratory outcome. Thereby, the quality system implementation is a highly relevant strategy and it is demanded at all of laboratory units that carry out any activities linked to HIV/AIDS programs⁷.

The Brazilian Ministry of Health defined and regulated the Laboratory Sub-Network linked to the National Bureau for STD, AIDS and viral hepatitis, and the Analytical Quality Control Program for HIV Diagnostic Laboratory (HIV AQCP) was established, through Decree 59 MS/GM of January 28th 2003⁸, having in mind to implement the specific actions for improving upon and to guarantee the laboratory diagnoses quality.

The HIV AQCP focused on holding Technical Training Workshops for the public regional and municipal reference laboratory network of the São Paulo State, which was designed to provide technical skills to laboratory professionals in setting up the São Paulo State quality scheme to monitor the analytical variations in HIV antibodies serologic assays performance⁹.

Being the Internal Quality assessment scheme one of the requisites for evaluating the laboratories of State Sub-Network, the use of this strategy by the State Reference Laboratory (IAL-Central Lab) has turned feasible to qualify them for conducting HIV AQCP, aiming at increasing awareness of the quality of results generated from laboratory testing.

In order to assess the serologic tests performance whether the results are within the pre-defined tolerance limits, an appropriate QC sample should be included in every test run, in conjunction with patients' samples in analysis and control samples inserted in the commercial

test kits in use. HIV positive internal control samples should be individually titrated at each laboratory and by each laboratory, and these serum samples panels used for monitoring the assays performances are named IQC^{3,7,10-13}.

The present study reports the formally approved procedures and the specific activities developed for accomplishing the HIV IQC implementation steps, and the data generated from the first analyses done on performance of participant units of the HIV/AIDS Diagnostic Laboratory Network of the São Paulo State.

PROJECT APPROACH/METHODS

Organization and structure of internal quality control system

For subjecting to regulation the use of plasma samples discarded by blood screening laboratory center and to be donated for being employed as sera source to prepare samples panels, the IAL-Central Lab wrote up a guideline outlining the procedures for standardizing and organizing the transfer flow of plasma bags from hemotherapy service network, and for the processed product to be available to the HIV Diagnostic Laboratory Network of São Paulo State. These procedures were written down in compliance with effective legislation criteria and sanitary authority approval for exclusive use of donated plasmas for producing IQC serum samples for HIV Ab testing in São Paulo State. Under these circumstances, a team-work was instituted by Resolution SS-94/2006¹⁴, for standardizing the pertinent technical and administrative procedures. This group was comprised of professionals linked to the Diseases Control Coordination (including Instituto Adolfo Lutz-Central Lab – IAL, Sanitary Surveillance Center – CVS and STD/AIDS Reference and Training Center – CRT), and linked to the Science, Technology and Health Strategic Supplies Coordination (incorporated by Blood, Components and Derivatives Group – *Hemorrede*), all of them linked to the São Paulo State Secretary of Health. The technical manual was written for establishing the criteria and rules on the use of plasma samples provided by blood bank and hemotherapy network¹⁵. At the initial phase of this task, a formal agreement was made between IAL and *Hemorrede* by means of a specific pact document¹⁵, in order to IAL be responsible for conducting the technical activities in receiving, shipping, tracing assurance for plasma bags, and their exclusive usage for preparing materials for HIV ICQ.

In accordance with the mentioned agreement, there was an official approval to supply IAL with the HIV positive plasma bags and the plasma bags negative for serologic markers as ruled by *Resolução da Diretoria Colegiada* n. 153 of June 14th, 2004¹⁶, or by that comes to replace it, for preparing the specific samples.

Preparation and technical skill building

Workshops, trainings, and meetings on ICQ establishment for HIV diagnostic routine testing were organized for providing information on general principles and consensus process to implement the analytical quality system at all laboratories of the São Paulo State Sub-Network, including the public laboratories and those private ones with a pact settled with the Brazilian Unique Health System (*SUS*), which had previously applied to HIV AQCP^{17,18}. In Brazil, the participation in the quality control program is not mandatory to any of laboratory units or institutions; nonetheless the participant laboratories were required to sign the agreement and responsibility form, and to send the official request for getting the specific serum panel. The respective technicians were also informed that before including the serum panel into routine test run, the IQC samples should be titrated in order to determine the suitable using dilution to get the optimal reactivity. In addition, the laboratories were instructed to report the assay kit in use, the lot number, the test manufacturer, the dilutions determined on the IQC samples, enclosing the recorded control chart on which the observed results were plotted. The reports on these data were made in a standardized form for further technical evaluation by IAL. Computer-assisted results assessment program (Microsoft Office Excel - Microsoft Corp., Redmont, WA, USA), set up at IAL, was employed for delineating the control chart with the results sent by those laboratories without plotting them in a control graph.

Preparation of serum panels

The supplied plasma bags were stored at -20° C until being processed; the plasma samples presenting lipemic or apparent turbidity aspects were discarded. In order to guarantee the samples tracking, all information on the received plasma bags were recorded in a proper registration book. The conversion of plasma into serum was carried out by means of thrombin technique^{15,19} following the methodology recommended by WHO¹⁹,

with modification. After the frozen plasma being kept overnight at 2°–8°C, the lyophilized human thrombin (1000 U/mL-Sigma, Steinheim, Germany), previously reconstituted with sterile deionized distilled water and stabilized for 120 min, was added into the plasma at a concentration of 1.25 IU/mL. After incubating overnight at 2°–8°C, the supernatant (corresponding to serum sample) was recovered after centrifuging at 12,400xg (Beckman Instruments, Inc. Palo Alto, CA, USA) for 30 min at 4°C. Then, 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxane – BCIP (bronidox L, Cognis, Jacaré, SP, Brazil) was added into the serum at a final concentration of 0.05%. Two serum aliquots were separated for performing the sample characterization and sterility test, respectively²⁰. The serum panels were prepared following the specific Standard Operating Procedure (SOP) set out at HIV/AIDS Laboratory – IAL, and in accordance with the Good Manufacturing Practice for fractioning samples in aliquots, product packing and labeling procedures^{21,22}. Before assembling the samples into the serum panels at IAL, the HIV Ab reactivity was certified by means of EIA/ELISA, Western blot technique and indirect immunofluorescence assay (HIV-1 IFA) on those samples previously characterized as HIV positive and on those sera negative for pertinent serologic markers¹⁶. HIV negative sera were characterized by HIV-1 IFA for selecting those specimens showing ideal negative staining, that is “red bricks” colour. For the sterility testing, one of the stored serum aliquots derived from each plasma bag was cultured onto chocolate agar, blood agar, BHI, Sabouraud agar, and agar-agar²⁰. The serum samples were distributed into 2 mL-freezing vials, which were labeled and stored at -20°C in cryogenic storage boxes.

Distribution of HIV IQC serum panels

After receiving the official request from the respective participant laboratories, the IAL delivered the serum panels, based on the following criteria (i) laboratory previously applied for HIV AQCP/SP; (ii) respective technician(s) who had previous technical training by attending workshops held in April and November, 2008; (iii) responsibility term previously settled and sent back to IAL^{15,23}. The samples, either plasma or serum, were delivered in thermal boxes (Styrofoam cooler) containing dry ice, a thermometer to check the temperature maintenance at ≤ -20°C, and the concerned document¹⁵. Each serum panel was set up accordingly to the day-to-day HIV serology routine testing carried out at respective

participant laboratory¹⁵. Thus, each laboratory received HIV IQC serum panel in a sufficient volume for being used for six to twelve months. Technical instruction manual and the forms to be filled in with obtained IQC results on every diagnostic test kit were sent with the panel.

HIV IQC serum panel use in the routine diagnostic testing runs

Before using the HIV IQC serum panel routinely, the participant laboratories calibrated the respective control sera to determine the appropriate dilution producing the optimal reactivity in HIV Ab testing kits as EIA/ELISA, microparticle enzyme immunoassay (MEIA), chemoluminescent (CMIA) and indirect immunofluorescence assay (IFA), routinely employed at each participant laboratory. For establishing the optimal reactivity of HIV-positive control serum to EIA/ELISA, MEIA, and/or CMIA, a 10-fold dilution of sample serially diluted from 1:10 to 1:100000 in negative serum was employed. Each serum dilution was tested in the respective HIV Ab assays kits available at respective laboratory. The best serum dilution to be employed as IQC sample corresponded to that showing an optimal optical density (OD) value at the range from 1.5 to 4.5 times the test cut-off (CO) rate. If more than one dilution of HIV positive IQC serum produced the ideal reactivity OD range, the dilution with the lowest OD value was chosen. However, if the optimal OD value was observed between two dilutions (e.g., between 1:1000 and 1:10000), the intermediate 2-fold dilutions were prepared from the most concentrated one (1:1000). Then, these serum dilutions were assayed in the same diagnostic test kit for finding that one presenting the optimal OD. In order to validate the prepared HIV IQC, 16 aliquots of this serum were set up on three runs (six aliquots at the first run, five at the second, and five at the third), recording the OD values and the respective CO. The OD/CO ratio values of 16 runs were calculated, and if they were within the acceptable variation range, the mean of sum total of OD/CO ratios was calculated and this was the base for drawing the quality control chart, plotting the finding data on the x-axis. From the fixed reference point (the mean value) on the chart, the superior and the inferior control limits for acceptable variations ($\pm 25\%$) were established, which were delineated on the graph. Each laboratory calculated its own mean value and control limits of each control sample in use. The data resulting from the HIV positive IQC serum were plotted

on the control chart, and comparing with the previously established acceptable limits, the results dispersion was indicated around the mean value¹³. For validating the HIV IFA in the routine test run using the HIV IFA-IQC negative and positive (reactive at 1:16) sera, the expected reactivity pattern was remarked. The assay was rejected if any reactivity pattern variations on IQC sera occurred, not even the control sera from diagnostic test kit showed the expected reactivity. In this case, the potential reasons were investigated, and the respective correcting actions were applied before repeating the assay¹³.

RESULTS

Production of serum panels for HIV IQC scheme

After establishing the pact¹⁵ in October 2007, 43 plasma bags were supplied by the Beneficent Association for Blood Collection (COLSAN) of São Paulo to IAL, and the resulting seronegative samples were distributed into 3,787 aliquots (2.0mL/vial) and the HIV positive sera into 198 aliquots (2.0mL/vial), in accordance with the Technical Guide Manual²⁴. The sterility testing of IQC sera demonstrated satisfactory results, which indicated the good quality of the prepared product.

Participant laboratories

A total of 109 professionals, from laboratories linked to São Paulo State Laboratory Sub-Network, were technically trained by IAL in April and November, 2008. Professionals from at least one laboratory of each Regional Health Department (*Departamento Regional de Saúde-DRS*) were trained. From May 2008 to February 2010, of 80 trained laboratories 44(55.0%) joined in the responsibility pact with the IAL-Central Lab; of 44 laboratories, 37(84.1%) requested the HIV IQC serum panels.

Application of HIV IQC scheme

From April 2009 to February 2010, the IAL provided the HIV IQC serum panels to 37 units of Laboratory Sub-Network. Twenty-seven (73.0%) out of 37 participant laboratories processed the HIV IQC serum panels following the recommended methodology of diagnostic test kits used in their routine work. They filled in the pertaining forms with obtained data in ELISA/EIA, MEIA and/or CMIA, and sent them back to HIV/

AIDS Laboratory of IAL. Of 27 participant laboratories, seven (25.9%) returned the complete information and the delineated quality control chart. Nine (33.3%) units did not draw the quality graph, but they sent all of the results from processing HIV IQC sera during day-to-day routine trials. Based on these data the respective control chart graphs were drawn by IAL-HIV/AIDS Laboratory staff. The other 11 (40.7%) units informed only the suitable dilution and the respective OD value of HIV positive IQC serum which was found in the used HIV Ab test kits; owing to the lack of these validation data, no control chart graph could be drawn by the IAL staff. Among those 37 participants laboratories, 22(59.5%) also perform HIV IFA in their routine testing, nevertheless 11 (50.0%) units only set up the IQC scheme for HIV IFA. Commercial HIV Ab assays of varied methodology and test formats employed by participant laboratories are shown in the Table. The optimal OD values for HIV IQC positive sera to ELISA/EIA, MEIA and for CMIA, and also the optimal dilution of HIV positive IQC sera in HIV-1 IFA are shown in the Table.

Assessing the HIV IQC scheme set up at participant laboratories

All participant laboratories received the respective serum panel containing the HIV positive samples that were processed from one plasma bag. The participant laboratories found either an identical optimal dilution for HIV IQC sera or a difference in one dilution, by using HIV diagnostic tests kits based on ELISA/EIA, MEIA and/or CMIA from the same manufacturers and from the same or different batch numbers (Table). Every quality control chart, drawn with results from the respective HIV IQC sera, was analyzed in accordance with the following parameters: (i) checking whether the IQC values were fallen within the acceptable limits, that is, whether the plotted measurement values were close to the fixed reference point – the mean value, indicating an adequate analytical performance and that the run was deemed valid as the measurements were not affected by variables; (ii) checking whether the daily IQC values were distant or spread in relation to the mean line, or they fell out of the acceptable variation interval; that is, whether the plotted values exceeded $\pm 25\%$ of arithmetic mean. These systematic errors were informed to the technicians of respective laboratory for correcting them which might be induced by some factors. In analyzing those 16 HIV

positive IQC control chart curves (seven delineated by the respective laboratories and nine graphs plotted by IAL staff based on the informed OD/CO ratios data from daily runs), two of the last nine control graphs indicated the ideal values for HIV IQC serum within acceptable variation range, but the plotted results were in a spreading pattern, being alternately close to the superior and inferior limits as shifts or trends away from the mean value. The IAL staff kept in contact with those two laboratories to help them in improving the serologic testing practice and procedures, and to take corrective measures.

During the HIV IQC setting up in the routine testing of participant laboratories, they were individually monitored by the IAL-HIV/AIDS Laboratory staff, and the technical support was provided on how to develop and to operate the IQC methodology. Also the contact was maintained with the technicians to advise them in carrying out every step of the pertaining procedures.

DISCUSSION

Numerous variables may affect the quality of final results, which may be caused by diverse errors at every step of HIV serologic testing, such as: biological samples erroneously identified or mislabeling, contaminated samples, clinical specimens data input error, test reagents mishandling, alteration in testing technique, inadequately calibrated equipments, misinterpretation of test results, result transcription errors, and unsatisfactory supervision²⁴. Laboratory performance improves after introducing the IQC scheme into routine testing run. This system is helpful in identifying the majority of variables that affect the quality of final results, although some random errors are difficult to be elucidated and eliminated^{24, 25}.

The use of the IQC scheme during the analytical phase of every serologic assay run provides additional parameters for validating the test and to identify the variations in the every batch of diagnostic reagents kits in use. These measures produce good quality laboratory outcomes by monitoring both random and systematic errors, which could not be detected when only those kit control sera provided by the manufacturer are employed²⁶⁻²⁸.

Random errors are difficult to be eliminated, though they can be minimized by training and technical supervision; the repetition also reduces the effects of random errors. The errors occur in an unpredictable manner, yet by introducing IQC into diagnostic routine work they might be significantly reduced.

Table. Optimal dilution for HIV IQC sera panel samples on anti-HIV antibody ELISA/EIA, MEIA and IFA tests kits determined by participant laboratories

Laboratories	Diagnostic test kits	Lot number	Serum dilution
1	Axsym HIV 1/2 gO – Abbott	71346LF00	1:8000
	Vironostika HIV Uni-Form Plus O - Biomérieux	A49MA	1:10000
	IFA – HIV-1 - BioManguinhos	080VH027Z	1:32
2	Axsym HIV 1/2 gO - Abbott	74406LF00	1:10000
	Axsym HIV 1/2 gO - Abbott	73274LF00	1:10000
3	Murex HIV 1.2.O - Abbott	L159110	1:80000
	IFA – HIV-1 - BioManguinhos	093VH003Z	1:32
4	Anti-HIV Tetra ELISA – Diasorin	3829051	1:2 000
	Vironostika HIV Uni-form Plus O – Biomérieux	A49HC	1:10000
	IFA – HIV-1 - BioManguinhos	097VH010Z	1:8
5	Vironostika HIV Uni-form Plus O - Biomérieux	A49MA	1:10000
6	Anti-HIV 1/2 Dade – Behring	38595	1:1000
7	Anti- HIV 1/2 SYM - Symbiosis	1000100210	1:1000
	Geenscreen Ultra HIV Ag-Ab - Bio-Rad	8K0572	1:10000
	IFA – HIV-1 - BioManguinhos	093VH002Z	1:16
8	Axsym HIV 1/2 gO - Abbott	74406LF00	1:10000
9	Axsym HIV 1/2 gO - Abbott	76367LF01	1:10000
	Vironostika HIV Uni-form Plus O Biomérieux	A49LA	1:10000
10	Anti-HIV Tetra ELISA - Diasorin	3819071	1:1000
	Vironostika HIV Uni-form Plus O Biomérieux	040AB	1:10000
	IFA – HIV-1 - BioManguinhos	096VH009Z	1:8
11	Anti- HIV 1/2 SYM - Symbiosis	1000000370	1:1000
	Detect HIV 1/2 (V.4) - Adaltis	11089	1:10000
12	Axsym HIV 1/2 gO – Abbott	76367LF01	1:10000
	Anti-HIV Tetra ELISA – Diasorin	3839071	1:1000
	Vironostika HIV Uni-form Plus O - Biomérieux	049MA	1:10000
	IFA – HIV-1 - BioManguinhos	099VH016Z	1:16
13	Anti-HIV Tetra ELISA - Diasorin	3827041	1:1000
	IFA – HIV-1 - BioManguinhos	090VH018Z	1:8
14	Anti-HIV Tetra ELISA - Diasorin	3839071	1:1000
	Vironostika HIV Uni-form Plus O - Biomérieux	A49MA	1:10000
	IFA – HIV-1 - BioManguinhos	096VH009Z	1:32
15	Axsym HIV 1/2 gO – Abbott	73448lf02	1:10000
	Vironostika HIV Uni-form Plus O - Biomérieux	A49MA	1:10000
16	Axsym HIV 1/2 gO – Abbott	76376LF00	1:8000
	Murex HIV 1.2.O - Abbott	L252110	1:40000
	IFA – HIV-1 - BioManguinhos	096VH008Z	1:16
17	Vironostika HIV Uni-form Plus O – Biomérieux	A40AB	1:8000
	IFA – HIV-1 - BioManguinhos	098VH012Z	1:8
18	Axsym HIV 1/2 gO – Abbott	76367LF01	1:8000
	Anti-HIV Tetra ELISA - Diasorin	3527041	1:1000
	Vironostika HIV Uni-form Plus O - Biomérieux	040AB	1:10000
19	Axsym HIV 1/2 gO – Abbott	76367LF01	1:10000
	Anti-HIV Tetra ELISA - Diasorin	3827041	1:2000
20	Vironostika HIV Uni-form Plus O - Biomérieux	040AB	1:10000
	Architect HIV Ag/Ab Combo – Abbott	76452HN00	1:8000
21	IFA – HIV-1 - BioManguinhos	093VH027Z	1:4
	Vironostika HIV Uni-form Plus O – Biomérieux	A49MC	1:10000
22	Vironostika HIV Uni-form Plus O – Biomérieux	A40AB	1:10000
23	Architect HIV Ag/Ab Combo – Abbott	75843HN00	1:10000
24	HIV Combi - Roche	154645	1:40000
25	Axsym HIV 1/2 gO – Abbott	81241LF00	1:10000
	Vironostika HIV Uni-form Plus O - Biomérieux	A40FB	1:10000
26	Axsym HIV 1/2 gO – Abbott	81241 LF 00	1:10000
27	Architect HIV Ag/Ab Combo – Abbott	75843HN00	1:8000
	Vironostika HIV Uni-form Plus O - Biomérieux	A40AB	1:8000

Laboratory test reliability is one of the most concerning components within the scope of medical care, moreover the procedures for monitoring analytical performance and the good quality of diagnostic testing are the essential requisites for any clinical laboratory for achieving reliable final results. In fact, the use of HIV IQC in the daily diagnostic routine work helps laboratories to be on the alert to scrutinize and to review every step of performed procedures for correcting the identified errors, for improving the daily work and for continuing improvement of diagnostic processes.

In view of the identical optimal dilutions of positive IQC sample found by the participant laboratories on diverse HIV Ab kits from the same manufacturers and from different batches, it might be inferred that the laboratories adequately followed the procedure described in the Technical Guideline Manual¹⁵, also in correctly carrying out the HIV Ab testing in accordance to the manufacturers' recommendations. The HIV Ab test kits mostly available at the participant laboratories (Table) seemed to be of good quality and of significant reproducibility. Regarding to HIV IQC-IFA positive serum, whose titer was 16, among 11 laboratories one laboratory only reported as positive at dilution 1:4, indicating that it could not manage to get the adequate reactivity equal to 1:16 or \pm one dilution (Table). The IAL staff advised this laboratory to make arrangements to ask for a technical assistance for the fluorescence microscopy in use at that laboratory.

The technology applied by IAL-Central Lab for producing the HIV IQC serum panels is a low-cost process and no complex equipment is required. Introduction of an internal quality control scheme is needed for assuring that valid results obtained from IQC sera continue to be effective. It implies that systematically use of internal control samples, both at every test run and on each batch of diagnostic test kits, ought to evidence the reproducibility of final results, and that the methodology presents accuracy in detecting the specific analyte on each sample in analysis. When the test is in control, these acceptable limits define the range in which the results are expected to fall. In this context, the individual control graph drawing at each laboratory for monitoring the accuracy of test results enables to identify and to correct the systematic and random variables.

The present work developed at the HIV/AIDS Laboratory of IAL-Central Laboratory has contributed to strengthening the institutional role. The activities in

progress provide the technology development, which improve the technical skill of participant professionals, and consequently the quality of HIV/AIDS serologic testing. With the purpose of establishing proceedings on serologic assays, quality improvement, inter-assay standardization of commercial immunoassay kits, the laboratories of the São Paulo State HIV Ab testing Sub-Network have been motivated to join the HIV/SP AQCP in order to introduce the HIV IQC scheme into the respective laboratory routine work. Therefore, several units that perform HIV Ab testing and take part in the São Paulo State Laboratory Sub-Network have already applied to HIV AQCP. And to those units which have not done the application yet, they have been asked to apply to the respective program by assessing the site www.ial.sp.gov.br.

Stability studies are in progress to ensure that the properties of samples components of HIV IQC serum panels are long-standing. The samples stability test is assayed from the sera aliquot preparation step to the anticipated expiration date.

ACKNOWLEDGMENT

This study was supported by the Central Laboratory of Instituto Adolfo Lutz, Diseases Control Coordination of São Paulo State Secretary of Health.

We thank both André Rodrigues Campos and Maria Cristina Sartorato of Instituto Adolfo Lutz Central Lab – Serology Department, for excellent technical help in conducting this study. We are indebted to the members of Technical Group instituted for accomplishing the “Technical Guide for implementing the Internal Quality Control in laboratory procedures for HIV infection serologic diagnosis in State of São Paulo”. We could not have done the present study without publishing the respective Manual.

Special thanks to Dr. José Augusto Barreto and to the Beneficent Association for Blood Collection (COLSAN), São Paulo-SP for their support in providing the discarded plasma bags.

Many thanks to the participant laboratories for joining in the IQC scheme activities.

REFERENCES

1. Centers for Disease Control (CDC). Current trends update: Serologic testing for antibody to human immunodeficiency virus. *MMWR*. 1988; 36(52): 833-45.

2. Hehlmann R. Human Retroviruses. In: Manning S & Thorp D, eds. Mosby Year Book. Human Virology, 2nd ed., Belshe RB, St. Louis, 1990. cap. 9. p. 274-306.
3. Constantine NT, Callahan JD, Watts DM. HIV testing and quality control: A guide for laboratory personnel. Durham, North Carolina, USA: Family Health International. 1991. 170 pp.
4. World Health Organization – WHO. HIV testing methods. Technical update. UNAIDS, 1997.
5. World Health Organization - WHO. Guidelines for using HIV testing technologies in surveillance. UNAIDS 01.22E, 2001.
6. Constantine NT, Zink H. HIV testing technologies after two decades of evolution. *Indian J Med Res*. 2005; 121:519-38.
7. Gray JJ, Wreghitt TG, McKee TA, McIntyre P, Roth CE, Smith DJ et al. Internal quality assurance a clinical virology laboratory. II Internal quality control. *J Clin Pathol*. 1995; 48:198-202.
8. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 59, de 28 de janeiro de 2003. Especifica a sub-rede de laboratórios do Programa Nacional de DST e Aids. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 30 jan. 2003. Seção 1, p.87.
9. World Health Organization - WHO. Strengthening of quality assurance in HIV and viral hepatitis in blood banks. Report of regional consultation. 2003.
10. Kudlac J, Hanan S, Mckee GL. Development of Quality Control Procedures for Human Immunodeficiency Virus Type 1 Antibody Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J Clin Microbiol*. 1989; 27 (6) p.1303-6.
11. Cura E, Wendel S. Manual de procedimientos de control de calidad para los laboratorios de serología de los bancos de sangre. Washington, DC: PAHO/HPC/HCT 94.21, 1994.
12. The Joint United Nations Programme on HIV/Aids (UNAIDS). HIV testing methods: UNAIDS Technical Update, 1997.
13. Brasil. Ministério da Saúde. Coordenação Nacional de DST e Aids. Controle de qualidade interno de testes sorológicos. Brasília: Ministério da Saúde, CN DST e Aids (Série TELELAB), 1998.
14. São Paulo (Estado). Gabinete do Secretário de Estado da Saúde. Resolução SS-94, de 28 de novembro de 2006. Dispõe sobre a criação do Grupo Técnico Transferência de Plasma como Matéria-prima para utilização em pesquisa, produção de reagentes ou painéis de controle de qualidade sorológica da Saúde de São Paulo. *Diário Oficial Estado de São Paulo*. São Paulo, SP, 29 nov.2006. Seção 1, p.30.
15. São Paulo. Secretaria de Estado da Saúde. Coordenadoria de Controle de Doenças. Manual técnico para implementação do controle de qualidade interno nos procedimentos laboratoriais para diagnóstico sorológico da infecção pelo HIV no estado de São Paulo. São Paulo: IAL; 2007.
16. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RDC nº 153, de 14 de junho de 2004. Determina o regulamento técnico para os procedimentos hemoterápicos. Disponível em: [<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php>].
17. Castejón MJ, Yamashiro R, Carraro KMSA, Coelho LPO, Oliveira CAF, Ueda M. Avaliação da oficina de trabalho para capacitação de profissionais da sub-rede de laboratórios do Estado de São Paulo para implementação do controle de qualidade interno (CQI) no diagnóstico sorológico da pelo HIV. *BEPA*. 2008; 5(54): 13-6.
18. Castejón MJ, Yamashiro R, Carraro KMSA, Cabral GB, Coelho LPO, Ueda M. Avaliação da II oficina de trabalho para capacitação de profissionais da sub-rede de laboratórios do Estado de São Paulo para implementação do controle de qualidade interno (CQI) no diagnóstico sorológico da infecção pelo HIV. *BEPA*. 2009; 6(62): 20-4.
19. World Health Organization - WHO. Guidelines for organizing national external quality assessment schemes for HIV serological testing. UNAIDS 96.5, 1996.
20. World Health Organization – WHO. General requirements for sterility of biological substances (Annex 4). Requirements for biological substances nº 6, 1973.
21. Kirkwood, TBL. Predicting the stability of biological standards and products. *JSTOR: Biometrics*. 1977; 33(4): 736-42.
22. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 686, de 27 de agosto de 1998. Determina o cumprimento das diretrizes estabelecidas das boas práticas de fabricação e controle em estabelecimentos de produtos para diagnóstico *in vitro*. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/686_98.htm].
23. Castejón MJ, Yamashiro R, Oliveira CAF, Campos AR, Sartorato MC, Cabral GB, Ueda M. Implementação de Controle de Qualidade Interno (CQI) nos ensaios sorológicos anti-HIV. Produção e distribuição de painéis de soro pelo Instituto Adolfo Lutz Central. *BEPA*. 2009; 6(65): 30-2.
24. Lock RJ. My approach to internal quality control in a clinical immunology laboratory. *J Clin Pathol*. 2006; 59:681-4.
25. Wasley GD. Internal quality control in serological tests for syphilis. *Genitourin Med*. 1985; 61:88-94.
26. Snell JJS, Supran EM, Tamashiro H. WHO international quality assessment scheme for HIV antibody testing: results from the second distribution of sera. *Bulletin of the World Health Organization*. 1992; 70 (5): 605-13.
27. Fearon M. The laboratory diagnosis of HIV infections. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2005; 16 (1): 26-30.
28. Park H, Oh E, Park Y, Han K, Yang CW. Failure of systematic error detection with internal quality control program. *Ann Clin Lab Sci*. 2008; 38 (4): 410-3.

The ovicidal activity of fungi *Pochonia chlamydosporia* and *Paecilomyces lilacinus* on *Taenia saginata* eggs in laboratory trial

Atividade ovicida dos fungos *Pochonia chlamydosporia* e *Paecilomyces lilacinus* sobre ovos de *Taenia saginata* em condições laboratoriais

RIALA6/1272

Juliana Milani ARAUJO, Fabio Ribeiro BRAGA*, Jackson Victor de ARAÚJO, Laércio dos Anjos BENJAMIN

*Endereço para correspondência: Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, MG, Brazil. Av. Ph Rolfes s/n, 36570-000 Viçosa, MG. Telefone e Fax: 55 31 3899-1464. E-mail: fabioribeirobraga@hotmail.com

Recebido: 17.01.2010 – Aceito para publicação: 10.06.2010

RESUMO

A atividade ovicida (efeito tipo 3) dos fungos *Pochonia chlamydosporia* (isolados VC1 e VC4) e *Paecilomyces lilacinus* (PL1) sobre os ovos de *Taenia saginata* foi investigada, em condições laboratoriais. Os ovos de *T. saginata* foram colocados em placas de Petri contendo o meio agar-água 2% (AA 2%) com os isolados fúngicos e, também, em placas de Petri sem fungos, como controle. A atividade ovicida desses fungos foi avaliada depois de 5, 10 e 15 dias de incubação. Ao final do experimento, os fungos *P. chlamydosporia* (VC1 e VC4) e *P. lilacinus* (PL1) demonstraram atividade ovicida ($p < 0,05$) quando comparados com o controle. Contudo, aos 15 dias de incubação o fungo *P. lilacinus* demonstrou maior atividade ovicida (efeito do tipo 3) em relação ao *P. chlamydosporia*. Este estudo demonstrou que os fungos *P. chlamydosporia* (VC1 e VC4) e *P. lilacinus* (PL1) possuem a capacidade de destruir os ovos de *T. saginata* e, portanto, podem ser considerados como potenciais candidatos no controle biológico deste cestoda.

Palavras-chave. Fungos nematófagos, *Pochonia chlamydosporia*, *Paecilomyces lilacinus*, Controle biológico, *Taenia saginata*.

ABSTRACT

The ovicidal activity (type 3 effect) of fungi *Pochonia chlamydosporia* (VC1 and VC4 isolated) and *Paecilomyces lilacinus* (PL1) on *Taenia saginata* eggs was compared in an experimental trial. *T. saginata* eggs were fixed onto Petri dishes containing 2% water-agar (2% WA) and fungal isolates, and onto Petri dishes without fungus as control. The ovicidal activity of these fungi was evaluated after being incubated for 5, 10 and 15 days. From the beginning of the interaction to the end of the trial, both *P. chlamydosporia* (VC1 and VC4) and *P. lilacinus* (PL1) fungi demonstrated ovicidal activity ($p < 0,05$) when compared to the control. However, after 15 days of incubation the *P. lilacinus* fungus showed higher ovicidal activity (effect of type 3) when compared to *P. chlamydosporia*. This study showed that both fungi *P. chlamydosporia* (VC1 and VC4) and *P. lilacinus* (PL1) are capable in killing eggs of *T. saginata*, therefore these fungi might be considered as potential candidates for biological control of this cestoda.

Key words. Nematophagous fungi, *Pochonia chlamydosporia*, *Paecilomyces lilacinus*, Biological control, *Taenia saginata*.

INTRODUCTION

Helminth infections are still an important problem for public health, especially regarding zoonosis¹. Among these infections, there is taeniasis/cysticercosis complex, affecting about 45 million of people worldwide².

The taeniasis/cysticercosis complex developed by *Taenia saginata* has a cosmopolitan distribution and is widespread in most of countries where there is cattle raising. However, Brazil is in a privileged situation in the world scenario in bovine raising, since it is the biggest producer of commercial cattle in the world³.

The *T. saginata* cycle implies two hosts, one definitive and one intermediate, and a free phase. The only definitive host is human, in whose small intestine it lodges. In its turn, intermediate *T. saginata* host is bovine. Three phases regarding the population of these parasites are known: adult in the definitive host, eggs on environment and larval phase in the intermediate host⁴. According to Gemmell and Lawson⁵ some factor might favorably contribute for the dispersion of *T. saginata* eggs in the environment and among them is the fecal contamination of soil.

Humans can be infected through the ingestion of raw or undercooked meat with cysticerci and the disease, taeniasis, can present itself in an asymptomatic way, but in some cases changes in appetite, nausea, vomiting, abdominal pains, diarrheas, loss of weight, irritability and fatigue can coexist^{6,7}.

To fight the taeniasis/cysticercosis complex, several measures can be employed, but the main strategy consists in the interruption of the parasite life cycle⁸. On the other hand, one of the main factors that condition the development and permanence of this parasite's eggs in the soil and its destruction are the antagonistic organisms, such as ovicidal nematophagous fungi⁹. However, studies on the natural processes of destruction of geohelminth eggs are still in initial stages, but they represent an interesting alternative that, used in combination other prophylactic measures, can contribute to the control of species of epidemiological importance.

Nematophagous fungi comprehend different type of fungi, divided into predators, endoparasites and ovicidal, are cosmopolitan, occurring in natural soils, croplands and all types of organic material in decomposition¹⁰. The eggs of the parasite fungi group consists of saprophytic and, therefore, are independent from the presence of helminth eggs in the soil for its survival, in addition of being easily

isolated and cultured in lab. These fungi colonize the egg content, resulting in its destruction^{11,12}.

Among the promising species of this group, there is fungi *Pochonia chlamydosporia* and *Paecilomyces lilacinus*. These fungi have wide distribution and have been successfully used in lab conditions in the biological control of several gastrointestinal parasites of nematode genus^{13,14}. However, its ovicidal activity (type 3 effect) was never compared in lab conditions over eggs of gastrointestinal helminth parasites¹⁵.

Araújo et al¹⁰ mention that the biological control, in practice, does not act on internal stages of the parasite. It acts on intermediate hosts, paratene, vectors and infective stages (infective larvae and embryonated eggs), thus decreasing the source of infection to final hosts and causing less negative effects in the environment.

The objective of this research was to compare the ovicidal activity (type 3 effect) of ovicidal fungi *Pochonia chlamydosporia* (VC1 and VC4 isolated) and *Paecilomyces lilacinus* (PL1) over eggs of *Taenia saginata*.

MATERIAL AND METHODS

Fungi

Two isolates of the nematophagous fungus *P. chlamydosporia* (VC1 and VC4) and one isolate of the nematophagous fungus *P. lilacinus* (PL1) were used. These isolates are from soil of Brazil, in the location of Viçosa, in Minas Gerais, latitude 20°45'20"S, longitude 42°52'40" W, at 649 m from sea level. Fungi were kept in assay tubes at 4°C with corn-meal-agar 2% and in dark for 10 days.

After the growth of isolates, new culture discs of 4 mm diameter were transferred to Petri dishes 9.0 cm diameter with 20 mL of 2% water-agar (2% WA) for 10 days.

Obtaining *Taenia saginata* eggs

T. saginata eggs were recovered from proglottids dissecting of an adult specimen spontaneously donated by a human patient diagnosed with taeniasis. Following, the eggs were morphologically analyzed as for integrity on optical microscope in 10x objective¹⁶.

Assay

T. saginata eggs were fixed on the surface of Petri dishes of 9.0 cm diameter with the 2% WA medium with grown fungal isolates for 10 days and without fungus as control, being 25 repetitions per each group performed.

In treatments, each plate had a thousand *T. saginata* eggs with only one fungal isolate. On intervals of 5, 10 and 15 days, one hundred eggs were removed from each plate with the isolate and control without fungus according to the technique described by Araújo et al¹⁷, being assessed in 40x objective according to parameters established by Lysek et al¹⁸: type 1, physiological effect without morphological harm to the eggshell, where hyphae are noticed adhered to the shell; type 2, lytic effect with morphological change of egg shell and embryo, without hyphae penetration through the shell, and type 3, lytic effect with morphological change of embryo and shell, and also hyphae penetration and internal colonization of the egg.

Data of each studied interval were submitted to nonparametric Friedman's test with 5% of probability¹⁹. Statistic analyses were performed with aid of BioEstat 3.0 software.

RESULTS

Percentage results of type 1, 2 and 3 effects presented by fungi *P. chlamydosporia* (VC1 and VC4) and *P. lilacinus* (PL1) throughout the experimental test of 5, 10 e 15 days are represented in Table 1.

Isolate VC1 had type 1, 2 and 3 effects throughout the studied intervals. For ovicidal activity (type 3 effect) this isolate had percentage values of 12.8%, 18.2% and 9.7% at 5, 10 and 15 days, respectively. In the same way, isolate VC4 had all type 1, 2 and 3 effects and at the end of the experimental test showed percentage of ovicidal activity of 2.3%, 7.0% and 8.0% in the same studied intervals.

Fungus *P. lilacinus* (isolate PL1) has also shown all type 1, 2 and 3 effects on *T. saginata* eggs throughout the studied intervals. However, for type 3 effect this fungus had 23.8%, 25.4% and 24.8% in intervals 5, 10 and 15 days, respectively.

Through light microscopy, 40x objective, *T. saginata* eggs were observed, destroyed by fungi *P. chlamydosporia* and *P. lilacinus*, characterizing its ovicidal activity (type 3 effect).

DISCUSSION

According to Lysek et al¹⁸, the main characteristic of an ovicidal fungus is to have type 3 effect during the infection process of eggs. In this work, this effect was demonstrated by isolates VC1, VC4 and PL1 on *T. saginata* eggs.

Table 1. Percentages and standard deviations of the ovicidal activity (effects of type 1, 2 and 3) of the nematophagous fungi *Pochonia chlamydosporia* (VC1 and VC4), *Paecilomyces lilacinus* (PL1) and the control group without fungi on *Taenia saginata* eggs in the intervals of 5, 10 and 15 days of interaction

Isolates	Effect at 5 days		
	Effect at Type 1*	Effect at Type 2**	Effect at Type 3***
VC1	23.9 ^a ± 6.3	21.7 ^a ± 17.9	12.8 ^a ± 11.6
VC4	18.4 ^a ± 6.0	9.9 ^b ± 5.4	2.3 ^b ± 1.9
PL1	24.8 ^a ± 10.8	26.5 ^a ± 9.5	23.8 ^c ± 11.8
Control	0 ^b ± 0	0 ^c ± 0	0 ^d ± 0
Isolates	Effect at 10 days		
	Effect at Type 1*	Effect at Type 2**	Effect at Type 3***
VC1	24.0 ^a ± 8.3	24.2 ^a ± 8.5	18.2 ^a ± 9.3
VC4	17.5 ^a ± 4.9	12.3 ^b ± 5.4	7.0 ^b ± 3.8
PL1	24.2 ^a ± 7.8	25.5 ^a ± 7.8	25.4 ^a ± 8.1
Control	0 ^b ± 0	0 ^c ± 0	0 ^c ± 0
Isolates	Effect at 15 days		
	Effect at Type 1*	Effect at Type 2**	Effect at Type 3***
VC1	22.3 ^a ± 8.4	22.2 ^a ± 8.4	9.7 ^a ± 5.7
VC4	17.2 ^a ± 5.7	17.2 ^b ± 6.3	8.0 ^a ± 4.0
PL1	25.3 ^a ± 11.2	29.0 ^a ± 8.7	24.8 ^b ± 8.0
Control	0 ^b ± 0	0 ^c ± 0	0 ^c ± 0

Percentages followed by the same capital letter in the same column do not present any statistical differences (P>0.05) – Friedman test. Physiological and biochemical *effect, without morphological damage to the egg shell, where the hyphae are observed adhered to the shell. **effect lithic with morphological alteration of the egg shell and the embryo, without the penetration of the hyphae through the shell. *** effect Lithic with morphological alteration of the shell and the embryo, besides the penetration of hyphae and egg internal colonization.

No difference (P>0.05) between VC1 and VC4 for type 1 effect was observed. For type 2 effect, the action of isolate VC1 was higher than isolate VC4, with statistical difference (P<0.05) in all time intervals noticed. For type 3 effect, on 5th and 10th days of interaction, difference (P<0.05) in the ovicidal activity between VC1 and VC4 was noticed, where the action of isolate VC1 was higher. However, it is discussed that the action of fungal isolates (VC1 and VC4) against intestinal helminth eggs has not shown differences (p> 0.01)²⁰. Therefore, the use of both *P. chlamydosporia* isolates in the biological control of gastrointestinal helminth eggs can be suggested.

Literature reports that, even though there is difference in the ovicidal activity, both isolates VC1 and VC4 could be successfully used in the destruction of eggs

of several genus of gastrointestinal helminth, since they have type 3 effect. Araujo et al⁹ recorded difference for the ovicidal activity between isolates VC1 and VC4, but showing the destruction of *T. saginata* eggs parasitized at the end of the experimental test. In the other hand, Braga et al¹¹ assessed the efficacy of isolates VC1 and VC4 on *Fasciola hepatica* eggs and did not observed difference ($P > 0.01$) in percentage results for the type 3 effect between them. Similarly, these authors in another work, assessing the action of these isolates over *Schistosoma mansoni* eggs, did not record any difference ($P > 0.01$) for the type 3 effect throughout the studied intervals¹².

On the other hand, *P. chlamydosporia* has other characteristics required for used as biological control agents of domestic animal gastrointestinal helminthiasis. The production of chlamydo-spores, for instance, which are resistant structures that enhances the fungus survival in the soil and helps its passage through the gastrointestinal tract of domestic animals. In addition, this fungus is harmless to animals, humans and the environment¹¹.

This information is interesting because it determines that fungus *P. chlamydosporia* is promising.

Regarding time of interaction of fungus over parasitized eggs (5-, 10- and 15-day intervals) in the present work, it was noted that the ovicidal action of VC1 and VC4 is similar to the results presented in other works^{11,12}. These authors have shown the efficacy of VC1 and VC4 over *F. hepatica* and *S. mansoni* eggs at the end of 21 days. This demonstrates that this fungus has efficacy in short time window.

Fungus *P. lilacinus* was compared with two fungal isolates of the species *P. chlamydosporia* (VC1 and VC4). When compared to type 1 effect, both do not have statistical difference ($P > 0.05$), but when compared regarding type 2 effect, the isolate *P. lilacinus* had difference ($P < 0.05$) from isolate VC4 in all observed days, where *P. lilacinus* had greater efficacy, unlike what was assessed with isolate VC1, which had no statistical difference ($P > 0.05$) for isolate *P. lilacinus*. Regarding type 3 effect, fungus *P. lilacinus* had difference ($P < 0.05$) for isolate VC1 at 5 and 15 days, not being noticed difference in the 10th reading day. For isolate VC4, fungus *P. lilacinus* had statistical difference ($P < 0.05$) throughout all reading days.

However, all isolates were efficient on destroying *T. saginata* eggs. The action of *P. lilacinus* as potential biological controller of cestodas eggs has been mentioned in other works^{14,15}. On the other hand, this fungus is also effective on destroying nematodes eggs¹⁷.

T. saginata eggs are resistant in the environment, to conventional sewage treatment and remains viable for up to 12 months, since they have a protective shell called embryophor²¹. In this way, alternative measures that can be employed to fight the environmental dissemination of this and other gastrointestinal parasites and their infective forms are important. Among them, biological control by ovicidal fungi that spread in the fecal environment¹⁵.

On the other hand, the penetration mechanism of ovicidal fungi in parasitized eggs is not yet fully clear. However, it is acknowledge that physical and mechanical activity, followed by enzymatic activity is one of the main compounds in the process and attack and penetration through eggs. In addition, there is the need of comparison of ovicidal activity of ovicidal nematophagous fungi on eggs of gastrointestinal helminth parasites⁹.

CONCLUSION

In this work, the efficacy in action of fungi *P. chlamydosporia* and *P. lilacinus* in destroying *T. saginata* eggs was evidenced. Although there was statistical difference among isolates, all of them can be used in biological control of eggs of this cestoda.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank FAPEMIG, CAPES, FINEP Pró-equipamentos and CNPq for financial support.

REFERENCES

1. Jongwutiwes S, Putaporntip C, Chantachum N, Sampatanukul P. Jejunal perforation caused by morphologically abnormal *Taenia Saginata* infection. *J Infect*. 2004; 49:324-8.
2. Lateef M, Zagar SA, Khan AR, Nazir M, Shoukat A. Successful treatment of niclosamide- and praziquantel-resistant beef tapeworm infection with nitazoxanide. *Int J Infect Dis*. 2008; 12:80-2.
3. Pereira MAVC, Schwanz VS, Barbosa CG. Prevalência da cisticercose em carcaças de bovinos abatidos em matadouros-frigoríficos do estado de Rio de Janeiro, submetidos ao Controle do Serviço de Inspeção Federal (SIF-RJ), no período de 1997 a 2003. *Arq Inst Biol*. 2006; 73:83-7.
4. Acha P, Szifre B. Zoonosis y enfermedades trasmisible comunes al hombre y a los animales. p. 989, 2006.

5. Gemmell MA, Lawson JR. Ovine cysticercosis: an epidemiological model for the cysticercosis. I. Free-living egg fase. In: Flisser A. Cysticercosis: present stage of knowledge and perspectives. New Cork. 1986;87-98.
6. Carrada-Bravo T. Teniasis-cisticercosis como problema de salud pública. Boletín Médico del Hospital Infantil del México. 1987; 44:427-34.
7. Rey L. Bases da Parasitologia Médica. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro; 2008.
8. Organización Panamericana de La Salud. Epidemiologia y control de la teniasis/cisticercosis en America Latina: 1994, Washington.
9. Araujo JM, Araújo JV, Braga FR, Carvalho RO, Silva AR, Campos AK. Interaction and ovicidal activity of nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* on *Taenia saginata* eggs. Experiment Parasitol. 2009; 121:338-41.
10. Araújo JV, Mota MA, Campos AK. Controle biológico de helmintos parasitos de animais por fungos nematófagos. Rev Bras Parasitol Vet. 2004; 13:165-70.
11. Braga FR, Araújo JV, Campos AK, Araujo JM, Carvalho RO, Silva AR et al. *In vitro* evaluation of the effect of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium sinense* and *Pochonia chlamydosporia* on *Fasciola hepatica* eggs. World J Microbiol Biotechnol. 2008a; 24:1559-64.
12. Braga FR, Araújo JV, Campos AK, Araujo JM, Silva AR, Carvalho RO et al. *In vitro* evaluation of the effect of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium sinense* and *Pochonia chlamydosporia* on *Schistosoma mansoni* eggs. World J Microbiol Biotechnol. 2008b; 24:2713-16.
13. Araújo JV, Braga FR, Araujo JM, Silva AR, Tavela AO. *In vitro* evaluation of the effect of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium sinense* and *Pochonia chlamydosporia* on *Ascaris suum* eggs. Parasitol Res. 2008; 102:787-90.
14. Braga FR, Araújo JV, Araujo JM, Carvalho RO, Silva AR. Efeito do Fungo *Paecilomyces lilacinus* sobre ovos de *Taenia saginata*. Rev Soc Bras Med Trop. 2008c; 41:686-8.
15. Braga FR, Araújo JV, Carvalho RO, Silva AR, Araujo JM, Tavela AO et al. Ovicidal effect of nematophagous fungi on *Taenia taeniaeformis* eggs. World J Microbiol Biotechnol. 2008d; 25: 533-5.
16. Urquhart GM, Armour J, Duncan JL, Dunn AM, Jennings FW. Parasitologia Veterinária, 2nd ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro: 1998.
17. Araújo JV, Santos MA, Ferraz S. Efeito ovicida de fungos nematófagos sobre ovos embrionados de *Toxocara canis*. Arq Bras Med Vet Zootec. 1995; 47:37-42.
18. Lysek H, Fassatiová O, Pineda NC, Hernández NL. Ovicidal fungi in soils of Cuba. Folia Parasitol. 1982; 29:265-70.
19. Ayres M, Ayres JRM, Ayres DL, Santos AS. Aplicações estatísticas nas áreas de ciências biológicas. 290pp. Brasília, 2003.
20. Braga FR, Ferreira SR, Araújo JV, Araujo JM, Silva AR, Carvalho RO et al. Predatory activity of *Pochonia chlamydosporia* fungus on *Toxocara* (syn. *Neoscaris*) *vitulorum* eggs. Tropic Animal Health Product. 2009; 42:309-14.
21. Silva AVM. Teniase e Cisticercose. In Neves DP, Melo AL, Linardi PM. Parasitologia Humana. 11 ed. Atheneu: São Paulo; 2005.

Avaliação dos níveis de hemoglobina glicada em pacientes com nefropatia diabética

Assessment of glycated hemoglobin rates in patients with diabetic nephropathy

RIALA6/1273

Francielen Anversa DIMER¹, Ana Cláudia Cirne BERNDT², Sílvia Juliane PIVA^{1,3}, Rafael Noal MORESCO^{1,3*}

*Endereço para correspondência: ¹Laboratório de Bioquímica Clínica, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil. Avenida Roraima 1000, Prédio 26, Sala 1402, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. Telefone: (55) 32208941; Fax: (55) 32208018. E-mail: rnmoresco@yahoo.com.br

²Laboratório de Análises Clínicas Pasteur, Santa Maria, RS, Brasil

³Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil

Recebido: 19.01.2010 – Aceito para publicação: 14.06.2010

RESUMO

A nefropatia diabética (ND) é uma complicação comum do diabetes mellitus (DM), sendo que a hiperglicemia está associada ao desenvolvimento das lesões glomerulares observadas na ND. Neste estudo foram avaliados os níveis de HbA_{1c} em pacientes diabéticos com e sem nefropatia. Foram determinados os níveis de glicose, colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol, triglicérides, creatinina, taxa de filtração glomerular (TFG), HbA_{1c} e microalbuminúria em pacientes diabéticos tipo 2 sem nefropatia (n=50) e com nefropatia (n=57). Os valores de HbA_{1c} nos pacientes dos grupos sem nefropatia e com nefropatia foram, respectivamente, de 6,4 ± 0,1% e 7,0 ± 0,1%. O grupo de pacientes com nefropatia apresentou níveis mais elevados de microalbuminúria do que o grupo sem nefropatia (62,7 ± 7,3 mg/L *versus* 7,4 ± 0,7 mg/L, *P*<0,001), e a TFG obtida no grupo com nefropatia foi significativamente menor do que a observada no grupo sem nefropatia (67,9 ± 2,5 mL/min/1,73 m² *versus* 77,4 ± 2,3 mL/min/1,73 m², 0,01). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos quanto aos níveis de glicose e perfil lipídico. Os valores de hemoglobina glicada foram mais elevados nos pacientes com nefropatia, o que evidencia o papel deste marcador no controle do diabetes e na prevenção de risco para o desenvolvimento das complicações crônicas da doença.

Palavras-chave. diabetes, nefropatia, microalbuminúria, hemoglobina glicada, creatinina.

ABSTRACT

Diabetic nephropathy (DN) is a common renal disease associated with diabetes mellitus (DM), and hyperglycemia is associated with the development of glomerular lesions. This study evaluated the rate of HbA_{1c} in patients with nephropathy and in those without nephropathy. Glucose, total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, triglycerides, creatinine, glomerular filtration rate (GFR), HbA_{1c} and urinary albumin contents were determined in 50 diabetic type 2 patients without nephropathy and in 57 patients with nephropathy. The HbA_{1c} in patients without and with nephropathy were 6.4 ± 0.1% and 7.0 ± 0.1%, respectively. In addition, the urinary albumin contents were higher in ND group (62.7 ± 7.3 mg/L *versus* 7.4 ± 0.7 mg/L, *P*<0.001), while GFR values were lower in ND patients than in patients without nephropathy (67.9 ± 2.5 mL/min/1.73 m² *versus* 77.4 ± 2.3 mL/min/1.73 m², *P*<0.01). No significant differences were observed for glucose and lipid profile. The highest rates of HbA_{1c} were detected in patients with DN, and these findings support the use of this biomarker for diabetes control and for monitoring the patients and to prevent them from getting diabetes-associated diseases.

Key words. diabetes, nephropathy, urinary albumin, glycated hemoglobin, creatinine.

INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) não é uma única doença, mas um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que têm em comum a hiperglicemia. Essa hiperglicemia é o resultado de defeitos na ação da insulina, na secreção de insulina ou em ambos¹. O DM acomete cerca de 7,6% da população brasileira entre 30 e 69 anos de idade, sendo que, em Porto Alegre, capital do Rio Grande do Sul, Brasil, esse número cresce para 8,89%². Cerca de 50% dos pacientes desconhecem o diagnóstico e 24% dos pacientes reconhecidamente portadores de DM não fazem qualquer tipo de tratamento³. As complicações crônicas do DM são as principais responsáveis pela morbidade e mortalidade. As doenças cardiovasculares representam a principal causa de morte (52%) em pacientes com DM tipo 2⁴. O DM do tipo 2 está associado a vários fatores de risco cardiovasculares, incluindo hipertensão arterial sistêmica (HAS), obesidade, resistência à insulina, microalbuminúria e anormalidades nos lipídios e lipoproteínas plasmáticas^{1,5}. As dosagens de glicose e de hemoglobina glicada (HbA_{1c}) são parâmetros importantes para o monitoramento e controle do DM. Os resultados de HbA_{1c} refletem a glicemia média no intervalo de dois a três meses precedente à coleta, enquanto a dosagem de glicose reflete a glicemia unicamente no momento da coleta da amostra de sangue⁶. A HbA_{1c} constitui um preditor das complicações crônicas do DM, sendo que intervenções que acarretam redução ou normalização da HbA_{1c} resultam em diminuição do risco de desenvolvimento de tais complicações^{7,8,9}. Recentemente, a *American Diabetes Association* passou a utilizar a HbA_{1c} como critério diagnóstico do diabetes¹⁰.

A nefropatia diabética (ND) ocorre em 20 a 40% dos pacientes com diabetes e é uma das complicações crônicas do DM, estando associada a um importante aumento de mortalidade, principalmente relacionado à doença cardiovascular^{10,11}. No Rio Grande do Sul, Brasil, no ano de 1996, a doença renal primária foi atribuída ao DM em 26% dos casos admitidos em programas de diálise¹². A ND apresenta-se em três estágios evolutivos: nefropatia incipiente ou fase de microalbuminúria, nefropatia clínica ou fase de macroalbuminúria e insuficiência renal terminal (uremia)¹³. A albuminúria é definida como a taxa de excreção urinária de albumina, e tem sido considerada como um preditor do desenvolvimento da ND¹⁴. A hiperglicemia, observada em pacientes com DM, é essencial para o desenvolvimento das lesões glomerulares

observadas na ND. Essas lesões podem ser prevenidas ou bastante reduzidas em sua intensidade pela obtenção de valores glicêmicos próximos aos normais. Considerando que a ND é uma das principais causas da insuficiência renal crônica em pacientes que ingressam nos programas de diálise em países desenvolvidos¹ e a importância do controle glicêmico na prevenção do desenvolvimento da ND, o objetivo deste estudo foi avaliar os níveis de HbA_{1c} em pacientes diabéticos com e sem nefropatia.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram avaliados retrospectivamente 107 pacientes adultos com DM tipo 2 oriundos do Laboratório de Análises Clínicas Pasteur, localizado em Santa Maria-RS, no período de maio a novembro de 2008. Os pacientes foram organizados em dois grupos: DM sem nefropatia (n=50) e DM com nefropatia (n=57). O grupo DM sem nefropatia foi constituído por 36 mulheres e 14 homens, enquanto o grupo DM com nefropatia foi composto por 33 mulheres e 24 homens, com idades de $60,3 \pm 13,2$ anos e $59,8 \pm 12,9$ anos, respectivamente. Dentre os 57 pacientes com ND, 52 apresentavam-se no estágio de nefropatia incipiente e 5 no estágio de nefropatia clínica. A nefropatia foi definida com base nos resultados de microalbuminúria maiores que 17 mg/L¹⁵. Este protocolo de pesquisa foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria-RS (n° 23081.006117/2008-13).

Foram avaliados os seguintes parâmetros laboratoriais: colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol, triglicérides, creatinina, glicose de jejum, HbA_{1c} e microalbuminúria. Os níveis de colesterol total, HDL-colesterol, triglicérides, creatinina e glicose foram obtidos no sistema automatizado Labmax Pleno[®] (Diconex, Argentina) por métodos colorimétricos automatizados previamente validados. Os níveis de HbA_{1c} foram obtidos pelo método de resina de troca-iônica, sendo mensurados no equipamento Labquest[®] (Bioplus, Brasil). Os níveis de microalbuminúria foram mensurados por turbidimetria no equipamento Bayer Express 550[®] (Bayer Diagnostics, New Jersey, EUA). Os níveis de LDL-colesterol foram obtidos a partir do método de Friedewald¹⁶. A taxa de filtração glomerular (TFG) foi estimada através da fórmula de MDRD¹⁷.

Os resultados estão expressos em média e erro padrão da média, sendo que os mesmos foram analisados estatisticamente através do teste *t* de Student no software

Graphpad Prism for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), sendo considerados estatisticamente significativos $P < 0,05$.

RESULTADOS

Os níveis de glicose, colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol e triglicérides não variaram significativamente entre os grupos de pacientes diabéticos estudados, conforme demonstrado na Tabela 1. No entanto, o grupo de pacientes com nefropatia apresentou níveis séricos mais elevados de creatinina.

Tabela 1. Parâmetros bioquímicos observados nos pacientes do estudo

	DM sem nefropatia	DM com nefropatia
Glicose (mg/dL)	149,0 ± 8,4	162,0 ± 9,9
Creatinina (mg/dL)	0,85 ± 0,02	1,03 ± 0,06*
Colesterol total (mg/dL)	182,9 ± 5,1	194,2 ± 5,0
HDL-colesterol (mg/dL)	48,9 ± 1,5	48,3 ± 1,5
LDL-colesterol (mg/dL)	101,6 ± 4,1	110,3 ± 4,8
Triglicérides (mg/dL)	161,6 ± 9,2	178,3 ± 12,1

Resultados expressos em média ± erro padrão da média. * $P < 0,05$

Os níveis de HbA_{1c} observados nos grupos sem nefropatia e com nefropatia foram, respectivamente, $6,4 \pm 0,1\%$ e $7,0 \pm 0,1\%$, conforme apresentado na Figura 1. Além disso, o grupo de pacientes com nefropatia apresentou níveis mais elevados de microalbuminúria do que o grupo sem nefropatia ($62,7 \pm 7,3$ mg/L versus $7,4 \pm 0,7$ mg/L, $P < 0,001$), conforme demonstrado na Figura 2. A TFG obtida no grupo com nefropatia foi significativamente menor do que a observada no grupo sem nefropatia ($67,9 \pm 2,5$ mL/min/1,73 m² versus $77,4 \pm 2,3$ mL/min/1,73 m², $P < 0,01$), conforme ilustrado na Figura 3.

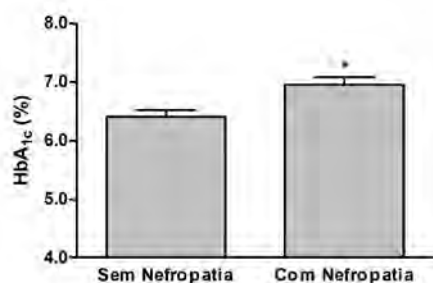


Figura 1. Níveis de hemoglobina glicada observados nos grupos de pacientes com DM tipo 2 sem nefropatia e com nefropatia * $P < 0,01$

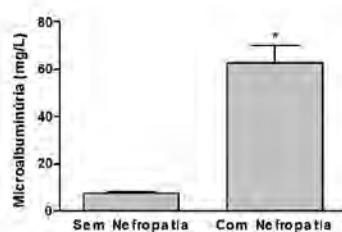


Figura 2. Níveis de microalbuminúria observados nos grupos de pacientes com DM tipo 2 sem nefropatia e com nefropatia * $P < 0,001$

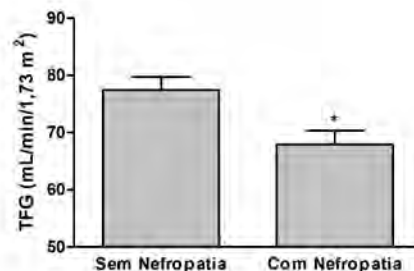


Figura 3. Avaliação da taxa de filtração glomerular (TFG) nos grupos de pacientes com DM tipo 2 sem nefropatia e com nefropatia * $P < 0,01$

DISCUSSÃO

O desenvolvimento de microalbuminúria persistente é um marcador já estabelecido para a ND¹⁰, além de ser também um marcador de risco independente para cardiopatia isquêmica e para o aumento da mortalidade¹⁸. Um terço dos portadores de DM podem desenvolver microalbuminúria e cerca de 15% a 20% desenvolvem macroalbuminúria em 20 anos do diagnóstico do DM^{19,20}. Os nossos resultados demonstraram que os pacientes DM com nefropatia apresentaram valores elevados de albumina urinária, quando comparado àqueles sem nefropatia. Além disso, dentre os pacientes com ND, 8,8% já se encontravam no estágio de nefropatia clínica. O achado de microalbuminúria parece, portanto, refletir, a nível renal, um estado generalizado de disfunção endotelial, sendo ainda o melhor diagnóstico para nefropatia. No entanto, Caramori et al²¹ recentemente questionaram o valor da microalbuminúria como preditivo isolado de ND, sugerindo a busca de marcadores complementares.

Em nosso estudo foram observados valores mais elevados de HbA_{1c} nos pacientes com nefropatia, além deste grupo apresentar níveis mais elevados de microalbuminúria e uma menor TFG, evidenciando uma associação entre o controle inadequado da glicemia e a presença de nefropatia. O controle glicêmico é uma das principais medidas para se controlar o DM e a maioria dos estudos relaciona a presença de ND com

controle glicêmico inadequado em longo prazo^{22,23}. Dados de estudos randomizados demonstraram que qualquer redução da HbA_{1c} implica na redução do risco de complicações, e a redução de 1% da HbA_{1c} associa-se à diminuição significativa do risco para qualquer desfecho relacionado ao DM em 21%, e em 37% para complicações microvasculares²⁴. Os níveis de creatinina foram significativamente elevados nos pacientes com nefropatia em comparação àqueles sem nefropatia, ainda que dentro dos valores de referência. Nossos resultados estão de acordo com os achados de Piccirillo et al¹⁴, os quais demonstraram que os níveis de creatinina também foram significativamente maiores nos microalbuminúricos quando comparados aos normoalbuminúricos.

Em nosso estudo não foram observadas diferenças significativas no perfil lipídico entre os grupos. A associação entre a nefropatia diabética e a doença cardíaca já é bem documentada¹⁵. A doença cardíaca em pacientes diabéticos é usualmente atribuída à isquemia miocárdica decorrente de um processo aterosclerótico coronário mais acelerado e mais extenso. Pacientes diabéticos são mais predispostos a desenvolverem insuficiência cardíaca congestiva, independentemente da presença de hipertensão arterial ou doença coronariana¹⁵. A aterosclerose é uma doença crônica de origem inflamatória que está associada à ativação das células endoteliais, estresse oxidativo e acúmulo de leucócitos na parede das artérias, sendo esta doença exacerbada nos pacientes com diabetes^{5,25,26}.

CONCLUSÃO

Diante do observado, é possível dizer que a ND é uma complicação crônica relativamente frequente nos pacientes com DM, especialmente naqueles que apresentam um controle glicêmico inadequado. Desta forma, é possível concluir que os níveis de hemoglobina glicada foram mais elevados nos pacientes com nefropatia, o que evidencia o papel deste marcador no controle do diabetes e no estabelecimento de risco para o desenvolvimento das complicações crônicas da doença.

REFERÊNCIAS

1. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes. [acesso 2008 dez 13]. Disponível em: [http://www.diabetes.org.br].

2. Indicadores e Dados Básicos - Brasil - 2007. [acesso 2009 mar 25] Disponível em: [http://www.datasus.gov.br].
3. Malerbi D, Franco LJ. The Brazilian Cooperative Group on the Study of Diabetes Prevalence. Multicenter Study of the Prevalence of Diabetes Mellitus and Impaired Glucose Tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 years. *Diabetes Care*. 1992;15:1509-16.
4. Nathan DM, Meigs J, Singer DE. The epidemiology of cardiovascular disease in type 2 diabetes mellitus: how sweet it is ...or is it? *Lancet*. 1997;350 (Suppl 1):4-9.
5. Kaefer M, Piva SJ, De Carvalho JAM, Da Silva DB, Becker AM, Coelho AC et al. Association between ischemia modified albumin, inflammation and hyperglycemia in type 2 diabetes mellitus. *Clin Biochem*. 2010;43:450-4.
6. Burtis CA, Ashwood ER. Fundamentos de Química Clínica. 4 ed. Guanabara Koogan (Rio de Janeiro); 1998.
7. Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1993;329:977-86.
8. Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The relationship of glycemic exposure (HbA_{1c}) to the risk of development and progression of retinopathy in the diabetes control and complications trial. *Diabetes*. 1995;44:968-83.
9. UK Prospective Diabetes Study Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes. *Lancet*. 1998;352:837-53.
10. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes-2010. *Diabetes Care*. 2010;33:S11-61.
11. Valmadrid CT, Klein R, Moss SE, Klein BE. The risk of cardiovascular disease mortality associated with microalbuminuria and gross proteinuria in persons with older-onset diabetes mellitus. *Arch Intern Med*. 2000;160:1093-1100.
12. Gross JL, Bruno RM. Prognostic factors in Brazilian diabetic patients starting dialysis: a 3.6-year follow-up study. *J Diabetes Complications*. 2000;14:226-71.
13. Murussi M, Murussi N, Campagnolo N, Silveiro SP. Early detection of diabetic nephropathy. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2008;52:442-51.
14. Piccirillo LJ, Gonçalves MF, Clemente EL, Gomes MB. Markers of inflammation in type 1 diabetic patients. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2004;48:253-60.
15. Gross JL, Silveiro SP, Canani LH, Friedman R, Leitão CB, De Azevedo MJ. Nefropatia diabética e doença cardíaca. *Arq Bras Endocrinol*. 2007;51:244-56.
16. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*. 1972;18:499-02.
17. Levey AS, Coresh J, Greene T, Marsh J, Stevens LA, Kusek JW et al. Expressing the Modification of Diet in Renal Disease Study equation for estimating glomerular filtration rate with standardized serum creatinine values. *Clin Chem*. 2007;53:766-72.
18. Mattock MB, Morrish NJ, Viberti G, Keen H, Fitzgerald AP, Jackson G. Prospective study of microalbuminuria as predictor of mortality in NIDDM. *Diabetes*. 1992;41:736-41.

19. Hovind P, Tarnow L, Rossing P, Jensen BR, Graae M, Torp I et al. Predictors for the development of microalbuminuria and macroalbuminuria in patients with type 1 diabetes: inception cohort study. *Brit Med J*. 2004;328:1105-08.
20. Dahlquist G, Stattin EL, Rudberg S. Urinary albumin excretion rate and glomerular filtration rate in the prediction of diabetic nephropathy; a long-term follow-up study of childhood onset type-1 diabetic patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2001;16:1382-6.
21. Caramori ML, Fioretto P, Mauer M. The need for early predictors of diabetic nephropathy risk: is albumin excretion rate sufficient? *Diabetes*. 2000;49:1399-408.
22. Tryggvason G, Indridason OS, Thorsson AV, Hreidarsson AB, Palsson R. Unchanged incidence of diabetic nephropathy in Type 1 diabetes: a nation-wide study in Iceland. *Diabetic Med*. 2005;22:182-7.
23. Svensson M, Sundkvist G, Arnqvist HJ, Björk E, Blohmé G, Bolinder J et al. Signs of nephropathy may occur early in young adults with diabetes despite modern diabetes management: results from the nationwide population-based Diabetes Incidence Study in Sweden (DISS). *Diabetes Care*. 2003;26:2903-09.
24. Stratton IM, Adler AI, Neil HA, Matthews DR, Manley SE, Cull CA et al. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *Brit Med J*. 2000;321:405-12.
25. Libby P. Changing concepts of atherogenesis. *J Int Med*. 2000;247:349-58.
26. Muhlestein JB, May HT, Jensen JR, Horne BD, Lanman RB, Lavasani F et al. The reduction of inflammatory biomarkers by statin, fibrate, and combination therapy among diabetic patients with mixed dyslipidemia: the DIACOR (Diabetes and Combined Lipid Therapy Regimen) study. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48:396-01.

Sementes de pitanga (*Eugenia uniflora* L.): potencial antioxidante e perfil de ácidos graxos

Pitanga (*Eugenia uniflora* L.) seeds: antioxidant potential and fatty acids profile

RIALA6/1274

Débora Maria Moreno LUZIA¹, Bruna Jorge BERTANHA², Neuza JORGE^{1*}

*Endereço para correspondência: Departamento de Engenharia e Ciência dos Alimentos, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista - UNESP. Rua Cristóvão Colombo, 2265, CEP: 15054-000, São José do Rio Preto/SP, Tel.: (17) 3221-2257. E-mail: njorge@ibilce.unesp.br

¹Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista - UNESP. São José do Rio Preto/SP

²Departamento de Engenharia de Alimentos, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

Recebido: 28.08.2009 – Aceito para publicação: 17.03.2010

RESUMO

As sementes de pitanga foram analisadas quanto à composição centesimal, bem como o potencial antioxidante e o perfil dos ácidos graxos. Para a obtenção do extrato, as sementes desidratadas e trituradas foram extraídas com álcool etílico por 30 minutos, na proporção de 1:3 de sementes:álcool etílico, sob agitação contínua à temperatura ambiente. Em seguida, a mistura foi filtrada e o sobrenadante submetido ao rotoevaporador a 40°C com vistas a determinar, por pesagem direta, o rendimento em matéria seca do extrato. De acordo com os resultados obtidos, as sementes de pitanga demonstraram elevado teor de carboidratos totais, além de apresentarem relevante atividade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais. No óleo das sementes de pitanga destacou-se maior porcentagem de ácidos graxos insaturados, sendo o oleico o principal componente.

Palavras-chave. *Eugenia uniflora* L., compostos fenólicos, DPPH, cromatografia gasosa.

ABSTRACT

The purpose of the present investigation was to characterize the pitanga seeds on centesimal composition, and also to evaluate its antioxidant potential and fatty acid profile. For obtaining the extract, the dehydrated and ground seeds were treated with ethyl alcohol for 30 minutes, at a proportion of 1:3 of seeds:ethyl alcohol, under continuous agitation at room temperature. Afterwards, the mixture was filtered and the supernatant was placed into a rotoevaporator at 40°C for determining the extract's dry matter yield, by direct weighing. According to the results, the seeds of cherry showed high amounts of carbohydrates, and offer relevant content and antioxidant activity of phenolic compounds. In the seed oil, cherry high lighted a higher percentage of unsaturated fatty acids, oleic being the main component.

Key words. *Eugenia uniflora* L., total phenolic compounds, DPPH, gas chromatography.

INTRODUÇÃO

As frutas, além de fornecerem componentes importantes para desempenharem funções básicas do organismo como, por exemplo, ácido ascórbico, β -caroteno e ácido fólico, são fontes de antioxidantes naturais¹. Entre os mais importantes antioxidantes estão os compostos fenólicos (flavonoides, ácidos fenólicos e taninos), compostos nitrogenados (alcaloides, aminoácidos, peptídeos, aminas e derivados da clorofila), carotenoides, tocoferóis e ácido ascórbico².

Muitos subprodutos de origem agroindustrial contêm compostos fenólicos com potencial aplicação como antioxidante em alimentos^{3,4}. Alguns compostos antioxidantes têm sido identificados em sementes de frutas, entretanto, existem poucos estudos relatando a atividade antioxidante de sementes de frutas tropicais e subtropicais^{5,6}.

Existem diversos métodos utilizados para a identificação e quantificação destes antioxidantes naturais, dentre eles podem ser citados o método TBA (valor do ácido tiobarbitúrico), a determinação dos compostos fenólicos totais, o sistema do β -caroteno/ácido linoleico, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), e os métodos de detecção de sequestradores de radicais livres, como o 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) e o 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)⁷.

No teste do DPPH, a ação do radical DPPH é acompanhada pelo monitoramento da diminuição da absorvância a 515 nm, que ocorre devido a sua reação com algum antioxidante ou com algum radical livre. O DPPH é um radical livre, estável à temperatura ambiente, que produz uma coloração violeta quando em contato com etanol. Este radical é reduzido na presença de uma molécula de antioxidante doador de hidrogênio. O DPPH captura os hidrogênios mudando a coloração de violeta para amarelo, passando para sua forma estável DPPH-H. O radical DPPH mostra forte banda de absorção em 515 nm⁷.

Alguns estudos demonstraram que a interação entre antioxidante e DPPH depende de sua conformação estrutural. O número de moléculas de DPPH reduzidas está relacionado com o número de grupos hidroxilas disponíveis no composto antioxidante⁸.

Os compostos fenólicos têm recebido atenção nos últimos anos por sua ação antioxidante, inibindo a peroxidação lipídica e a lipoxigenase *in vitro*. Estes compostos desempenham um papel importante, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo⁹.

Antioxidantes fenólicos funcionam como sequestradores de radicais livres, doando um átomo de hidrogênio a um radical lipídico, e algumas vezes como quelantes de metais. Os produtos intermediários, formados pela ação destes antioxidantes, são relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático apresentado por estas substâncias¹⁰. A eficiência do antioxidante fenólico é determinada pelos grupos funcionais presentes e pela posição que ocupam no anel aromático. O antioxidante com grupo etila ou butila na posição *para*, por exemplo, tem maior atividade do que o antioxidante com o grupo metila. A presença de grupos de cadeias longas ou ramificadas reduz a atividade antioxidante devido ao impedimento estrutural¹¹.

Pesquisas vêm sendo realizadas visando também grande interesse médico e nutricional sobre os ácidos graxos ômega-3 e ômega-6 em alimentos. A composição em ácidos graxos dos alimentos é de grande importância, principalmente os poli-insaturados das famílias ômega-3 e ômega-6, aos quais se atribuem numerosos benefícios ao organismo humano. A família ômega-3 (PUFA n-3) compreende o ácido graxo essencial α -linolênico (C18:3, n-3), do qual, por alongamento e dessaturação, são gerados os ácidos eicosapentaenoico (EPA – C20:5 n-3) e docosahexaenoico (DHA – C22:6 n-3)⁶. A família ômega-6 compreende o ácido graxo essencial linoleico, que pode originar o ácido araquidônico.

Epidemiologicamente, os ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 mostram efeito benéfico na prevenção de vários tipos de câncer¹². Os ômega-6 exercem importante papel fisiológico como potentes mediadores da inflamação e efeito benéfico sobre o sistema imune¹³.

Em estudo realizado por Jardim e Mancini-Filho¹⁴, o perfil de ácidos graxos do óleo extraído das sementes de romã apresentou elevada quantidade de ácidos linoleico e oleico, perfazendo um total de 70,09% de ácidos graxos insaturados.

O estudo detalhado da composição das sementes de pitanga contribuirá com os profissionais da área de alimentos para uma adequada orientação dietética, bem como na obtenção de dados que possam ser utilizados em tabelas de composição centesimal e de ácidos graxos de sua fração lipídica. A obtenção de dados referentes à composição de alimentos brasileiros tem sido estimulada com o objetivo de reunir informações atualizadas, confiáveis e adequadas à realidade nacional.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi determinar a composição centesimal, o potencial antioxidante e o perfil dos ácidos graxos de sementes de pitanga.

MATERIAL E MÉTODOS

Matéria-prima

As frutas maduras colhidas diretamente da árvore de pitanga, adquiridas em novembro de 2007, foram provenientes de plantas localizadas no município de São José do Rio Preto/SP, região de clima tropical. Foram desprezadas as frutas que continham rachaduras, danificadas por insetos e/ou ataques de animais ou aves. Depois de selecionadas, as sementes foram lavadas ligeiramente com água destilada para remover resíduos de polpas e açúcares solúveis e, em seguida, foram colocadas em estufa a 35°C por um período de 24 horas para redução do teor de umidade e homogeneizadas para análises posteriores, realizadas em triplicata.

Obtenção do extrato de sementes de pitanga

As sementes desidratadas e trituradas em moinho de faca foram extraídas com álcool etílico por 30 minutos, sob intensa agitação, na proporção de 1:3 (P/V) de sementes:álcool etílico à temperatura ambiente. Em seguida, a mistura foi filtrada e o sobrenadante submetido ao evaporador rotativo sob pressão reduzida a 40°C com vistas a determinar, por pesagem direta, o rendimento em matéria seca do extrato.

Métodos analíticos

Determinação da composição centesimal

As determinações analíticas de umidade, lipídios e cinzas nas sementes foram realizadas de acordo com os métodos oficiais da AOCS¹⁵. As proteínas foram determinadas pelo método de Kjeldahl descrito pela AOAC¹⁶ e os carboidratos totais foram quantificados pela diferença do valor obtido pela somatória de umidade, lipídios, proteínas e cinzas.

Medida da capacidade de sequestrar radicais livres (DPPH)

Este procedimento foi descrito por Brand-Williams et al.⁸. Preparou-se uma solução etanólica com concentração de 500 µg.mL⁻¹ de extrato de sementes de pitanga. Cada amostra desta solução (0,3 mL) foi adicionada a 2,7 mL de solução de DPPH (40 µg.mL⁻¹) em diferentes concentrações (5, 10, 25, 50, 125 e 250 µg.mL⁻¹). Após o tempo de reação de

30 minutos, a absorbância foi lida em 515 nm e convertida em porcentagem de atividade antioxidante (AA) por meio da seguinte fórmula:

$$AA (\%) = 100 - \left\{ \frac{(\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}}) \times 100}{\text{Abs}_{\text{controle}}} \right\}$$

Um controle foi feito com 2,7 mL de DPPH e o branco realizado com 0,3 mL de solução etanólica do extrato e 2,7 mL de etanol, para cada concentração.

Compostos fenólicos totais

A quantificação de compostos fenólicos totais foi determinada por espectrofotometria, por meio do reagente de Folin-Ciocalteu, segundo a metodologia descrita por Singleton e Rossi¹⁷.

Neste procedimento, pipetou-se 100 µL da solução de extrato natural em tubos de ensaio e adicionou-se 500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu. Em seguida, adicionou-se 1,5 mL de solução saturada de carbonato de sódio 20% e 6 mL de água destilada.

Essa mistura permaneceu em repouso por 2 horas em temperatura ambiente, e a absorbância foi determinada a 765 nm em cubetas de vidro, tendo como “branco” o metanol e todos os reagentes, menos o extrato. O teor de fenóis totais (FT) foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico (10 a 500 mg.mL⁻¹) e expressos como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por g de extrato. A equação da curva de calibração do ácido gálico foi $C = 0,0013A + 0,0127$, onde C é a concentração do ácido gálico, A é a absorbância a 765 nm e o coeficiente de determinação $R^2 = 0,9985$.

Perfil de ácidos graxos por cromatografia gasosa

Os ésteres metílicos dos ácidos graxos presentes nos óleos foram obtidos segundo procedimento descrito por Hartman e Lago¹⁸.

Para a análise cromatográfica de ácidos graxos, utilizou-se um cromatógrafo a gás marca Varian (Walnut Creek, USA), modelo GC 3900, equipado com detector de ionização de chama, injetor *split* e amostrador automático. Os compostos foram separados em coluna capilar de sílica fundida CP-Sil 88 de 50 m de comprimento, com diâmetro interno de 0,25 mm e espessura do filme de 0,20 mm.

A programação de temperatura da coluna foi iniciada em 50°C por 2 minutos, aquecida a 4°C.min⁻¹ até 240°C e mantida em isoterma durante 20,5 minutos. As temperaturas utilizadas no injetor e no detector foram 230

e 250°C, respectivamente. As amostras foram injetadas no volume de 1 mL, adotando-se a razão de divisão de 1:30. O gás de arraste foi o hidrogênio com velocidade linear de 30 mL.min⁻¹.

Os ácidos graxos foram identificados pela comparação dos tempos de retenção de padrões puros de ésteres metílicos de ácidos graxos com os componentes separados das amostras e a quantificação foi feita por normalização de área (%). Utilizou-se como padrão uma mistura composta de 37 ésteres metílicos de ácidos graxos (Supelco, Bellefonte, USA), de C4:0 a C24:1, com pureza entre 99,1 e 99,9%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Composição centesimal

A composição centesimal ou percentual exprime de forma geral, o valor nutritivo de um alimento e corresponde à proporção dos grupos homogêneos de substâncias presentes em 100 g do alimento considerado. Os grupos de substâncias considerados homogêneos são aqueles que se encontram em todos os alimentos, a saber: umidade, lipídios ou extrato etéreo, proteínas, fibras, cinzas e glicídios, quando determinado por diferença.

Na Tabela 1 estão apresentadas as médias \pm desvio padrão da composição centesimal das sementes de pitanga. De acordo com os resultados obtidos, as sementes apresentaram 6,41% de umidade, uma vez que foram previamente secas. Embora tenham demonstrado baixo valor de lipídios 3,20%, verificou-se elevada quantidade de carboidratos totais (79,56%).

Tabela 1. Composição centesimal das sementes de pitanga, expressa em porcentagem

Macronutrientes	1	2	3	Média	DP*
	(%)	(%)	(%)	(%)	
Umidade	6,23	6,87	6,12	6,41	0,41
Lipídios	2,80	3,32	3,49	3,20	0,36
Proteínas	7,96	8,48	8,30	8,25	0,26
Cinzas	2,55	2,58	2,62	2,58	0,04
Carboidratos totais	80,46	78,75	79,47	79,56	0,39

*DP, desvio-padrão das médias

Atividade antioxidante

Os antioxidantes podem ser divididos em duas classes: com atividade enzimática e sem essa atividade. Na primeira, estão os compostos capazes de bloquear a iniciação da oxidação, ou seja, as enzimas que removem as espécies reativas ao oxigênio. Na segunda classe, estão moléculas que interagem com as espécies radiculares e são consumidas durante a reação. Nesta classificação, incluem-se os antioxidantes naturais e sintéticos como os compostos fenólicos.

Tabela 2. Determinações de rendimento, atividade antioxidante e compostos fenólicos totais do extrato de sementes de pitanga

Determinações	Extrato Seco
Rendimento (%)	21,12
AA _{máxima} (%)	92,15
EC ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	30,72
Compostos fenólicos totais (mg.g ⁻¹)*	75,64

EC₅₀ é definido como a concentração suficiente para obter 50% do efeito máximo, estimado em 100%

*mg de equivalentes de ácido gálico por g de extrato

AA = atividade antioxidante

A Tabela 2 apresenta o rendimento porcentual, bem como a porcentagem máxima de atividade antioxidante (AA_{máxima}), o valor de EC₅₀ (µg.mL⁻¹), o teor de compostos fenólicos totais (mg.g⁻¹) do extrato de sementes de pitanga.

O rendimento em extrato seco foi de 21,12% em função do solvente utilizado. Segundo Fernandes et al¹⁹, esta porcentagem pode variar em função da espécie do fruto e da técnica usada para a extração.

A atividade antioxidante dos compostos, dada pelo valor de EC₅₀, é calculada pela redução de 50% da concentração inicial de DPPH. Ressalta-se que quanto menor o valor de EC₅₀, maior a atividade antioxidante do composto analisado.

O valor de EC₅₀, obtido por regressão linear, para o extrato de pitanga, mostrou elevado coeficiente de determinação (R² = 0,9567). Os valores de atividade antioxidante máxima e EC₅₀ atingidos pelo extrato de sementes de pitanga foram de 92,15% e 30,72 mg.mL⁻¹, respectivamente. Santos et al²⁰ encontraram elevado teor de atividade antioxidante para o extrato de sementes de mamão 98,92%.

A concentração de compostos fenólicos totais encontrada foi de 75,64 mg de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato de pitanga. A extração de compostos fenólicos de produtos naturais é fortemente influenciada pelo solvente utilizado. Tem-se observado que quanto maior a polaridade do solvente de extração, maior a quantidade de compostos fenólicos extraídos²¹. Em estudo realizado por Malacrida et al²², empregando sementes de melão, o teor de compostos fenólicos obtido foi de 20,9 mg de ácido gálico por grama de extrato.

Perfil de ácidos graxos

Os ácidos graxos constituem os principais componentes de grande parte dos lipídios presentes na dieta humana. São definidos como cadeias de hidrocarbono terminando em um grupo carboxila numa extremidade e um grupo metil na outra. Geralmente, são cadeias com um número par de carbonos, que variam de 4 a 26 átomos.

A Tabela 3 apresenta os ácidos graxos identificados por cromatografia gasosa, presentes na fração lipídica das sementes, com um conteúdo elevado de ácidos graxos insaturados, com cadeia entre 16 e 18 átomos de carbono. O conteúdo total de ácidos graxos insaturados foi de 58,06%, entre os quais o ácido oleico obteve em média 38,29% e o ácido linoleico uma média de 13,46%. Os dois ácidos majoritários representam 89% dos ácidos insaturados, estando o restante em porcentagens muito inferiores. Entre os ácidos graxos saturados, o ácido palmítico apresentou quantidades significativas (34,09%).

A qualidade e digestibilidade de óleos vegetais comestíveis são determinadas pela quantidade e composição em ácidos graxos insaturados. A presença de ácido linoleico em teores adequados é fundamental, uma vez que se trata de um ácido graxo essencial. Quanto maior a quantidade de ácido linoleico em relação ao oleico, melhor é a qualidade do óleo vegetal em evitar a formação do mau colesterol²³. Conforme a Tabela 3, o óleo de sementes de pitanga apresentou relação ácido oleico/linoleico (Ole/Lin) de 1/0,35 próximo ao valor encontrado por Borges et al²⁴ para o óleo de amendoim (1/0,5).

Com relação ao ácido graxo α -linolênico (C18:3 n-3), o óleo de sementes de pitanga apresentou porcentagens de 2,06%. Levando em consideração a porcentagem de ácido α -linolênico em óleos comuns como milho (1,2%) e soja (6,8%)²⁵, o óleo de sementes de pitanga apresenta quantidade considerável desse ácido graxo.

Tabela 3. Perfil de ácidos graxos presentes na fração lipídica das sementes de pitanga avaliado por cromatografia gasosa

Ácidos graxos (%)	1	2	3	Média	DP*
Palmitico (C16:0)	34,00	34,54	32,74	34,09	1,40
Palmitoleico (C16:1)	2,71	2,90	2,42	2,68	0,24
Estearico (C18:0)	4,65	4,14	4,78	4,52	0,34
Oleico (C18:1 n-9)	38,01	38,03	38,83	38,29	0,84
Linoleico (C18:2 n-6)	13,61	12,88	13,88	13,46	0,52
Araquídico (C20:0)	1,84	1,59	2,20	1,88	0,31
α -linolênico (C 18:3 n-3)	2,11	1,94	2,12	2,06	0,10
Henecosanoico (C20:2)	1,80	1,79	1,83	1,81	0,04
Behênico (C22:0)	0,59	0,58	0,57	0,58	0,01
Lignocérico (C24:0)	0,68	0,62	0,65	0,65	0,03
Saturados	41,96	42,70	41,16	41,94	0,77
Monoinsaturados	40,72	40,93	41,25	40,97	0,27
Poli-insaturados	17,31	16,37	17,58	17,09	0,64
Sat/Insat**	1/1,38	1/1,34	1/1,43	1/1,38	-
Ole/Lin***	1/0,36	1/0,34	1/0,36	1/0,35	-

*DP, desvio-padrão das médias

**Relação entre o total de ácidos graxos saturados e insaturados

***Relação entre o total de ácidos oleico e linoleico

Comparando-se a relação entre o total de ácidos graxos saturados e insaturados analisados neste trabalho (1/1,38) com aquela encontrada por Borges et al²⁴ (1/2,20) para o óleo de sementes de umbu (*Spondias tuberosa* Arr. Cam), verificou-se que estes óleos podem ser utilizados em frituras, uma vez que a instabilidade e rancidez oxidativa estão relacionadas à quantidade de ácidos graxos insaturados²⁴.

CONCLUSÃO

Com a realização deste trabalho foi possível verificar que, dentre os macronutrientes analisados, os

maiores valores encontrados foram para os carboidratos totais. Além disso, o extrato etanólico de sementes de pitanga apresentou relevante atividade antioxidante, bem como elevada quantidade de compostos fenólicos totais. O óleo de sementes de pitanga obteve elevada porcentagem de ácidos graxos insaturados, destacando-se o ácido oleico. Este elevado grau de insaturação favorece seu uso para fins comestíveis, desde que comprovada a ausência de substâncias tóxicas ou alergênicas ou como matéria-prima para as indústrias farmacêutica e oleoquímica.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pela bolsa de Doutorado.

REFERÊNCIAS

1. Faller ALK, Fialho E. Disponibilidade de polifenóis em frutas e hortaliças consumidas no Brasil. *Rev S Publ*. 2009;43(2):211-8.
2. Mélo EA, Lima VLAG, Maciel MIS. Polyphenol, ascorbic acid and total carotenoid contents in common fruits and vegetables. *Braz J Food Technol*. 2006;9 (2):89-94.
3. Torres JL, Varela B, Garcia MT, Carilla J, Matito C, Centelles JJ et al. Valorization of grape (*Vitis vinifera*) byproducts. Antioxidant and biological properties of polyphenolic fractions differing in procyanidin composition and flavonol content. *Agric Food Chem*. 2002;50(26):7548-55.
4. Angelo PM, Jorge N. Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2007;66(1):232-40.
5. Jayaprakasha GK, Singh RP, Sakariah KK. Antioxidant activity of grape seeds (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food Chem*. 2001;73(3):285-90.
6. Belda MCR, Pourchet-Campos MA. Ácidos graxos essenciais em nutrição: uma visão atualizada. *Ciênc Tecnol Aliment*. 1991;11(1):5-35.
7. Miliuskas G, Venskutonis PR, Van Beek TA. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem*. 2004;85(1):231-7.
8. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol*. 1995;28(1):25-30.
9. Sousa CMM, Silva HR, Vieira-Jr. GM, Ayres MCC, Costa CLS, Araújo DS et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quim Nova*. 2007;30(2):351-5.
10. Shaidi F, Janitha PK, Wanasundara PD. Phenolic antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 1992;32(1):67-103.
11. Jadhav SJ, Nimbalkar SS, KulKarni AD, Madhavi DL. Food antioxidants: technological, toxicological, and health perspectives. New York: Marcel Dekker, 1996.
12. Curi R. Entendendo a gordura – os ácidos graxos. 1ª. ed. São Paulo: Manole; 2002.
13. Pompéia C, Procópio J, Curi R. Ácidos graxos e sistema imunológico. *Rev Bras Ciênc Farm*. 1999;35(2):165-94.
14. Jardini FA, Mancini-Filho J. Composição centesimal e perfil dos ácidos graxos da romã (*Punica granatum* L.) cultivada no Brasil. *Hig Aliment*. 2007;21(148):81-5.
15. AOCS. American Oil Chemists' Society. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. AOCS; 1993.
16. AOAC. Association Of Official Analytical Chemists. Official and tentative methods of the AOAC International. Maryland: AOAC; 1995.
17. Singleton VL, Rossi Jr JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic*. 1965;16(3):144-58.
18. Hartman L, Lago RCA. Rapid preparation of fat acids methyl esters. *Laboratory and Practy*. 1973;22:475-6.
19. Fernandes JB, David V, Facchini PH, Silva MF, Filho ER, Vieira PC et al. Extrações de óleos de sementes de citros e suas atividades sobre a formiga cortadeira *Atta sexdens* e seu fungo simbionte. *Quim Nova*. 2002;25(6B):1091-5.
20. Santos AS, Lima LB, Magalhães CEC, Almeida MMB, Silva MG. Avaliação do potencial protéico, mineral e antioxidante de resíduos de indústrias de processamento de frutas do estado do Ceará. 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química; 2006. São Paulo. Anais eletrônicos. São Paulo, 2006. [acesso 2008 fev 14]. Disponível em: [http://www.sec.s bq.org.br/cd29ra/editorial.htm].
21. Gaméz-Meza N, Noriega-Rodríguez JA, Medina-Juárez LA, Ortega-García J, Cázarez-Casanova R, Angulo-Guerrero O. Antioxidant activity in soybean oil of extracts from Thompson grape bagasse. *J Am Oi Chem Soc*. 1999;76(12):1445-7.
22. Malacrida CR, Angelo PM, Andreo D, Jorge N. Composição química e potencial antioxidante de extratos de sementes de melão amarelo em óleo de soja. *Ciênc Agron*. 2007;38(4):372-6.
23. El-Adawy TA, Taha KM. Characteristics and composition of different seed oils and flours. *Food Chem*. 2001;74(1):47-54.
24. Borges SV, Maia MCA, Gomes RCM, Cavalcanti NB. Chemical composition of umbu (*Spondias Tuberosa* Arr. Cam) seeds. *Quim Nova*. 2007;30(1):49-52.
25. Martin CA, Almeida VV, Ruiz MR, Visentainer JEL, Matshushita M, Souza NE et al. Ácidos graxos poliinsaturados omega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. *Rev Nutr*. 2006;19(6):761-70.

Formulação, análises microbiológicas, composição centesimal e aceitabilidade de empanados de jundiá (*Rhamdia quelen*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tilápia (*Oreochromis niloticus*)

Formulation, microbiological analyses, centesimal composition and acceptability of breaded catfish (*Rhamdia quelen*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*)

RIALA6/1275

João de Paula CORTEZ NETTO^{1*}, Wilson Rogério BOSCOLO², Aldi FEIDEN², Marcia Luzia Ferrarezi MALUF², Jakeline Marcela Azambuja de FREITAS², Márcia Regina SIMÕES²

*Endereço para correspondência: ¹Centro de Aquicultura da Unesp (Caunesp), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, CEP 14884-900 Jaboticabal, São Paulo, Brasil. e-mail: joaodepaulacn@hotmail.com

²Grupo de Estudo de Manejo em Aquicultura, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil
Recebido: 29.06.2009 – Aceito para publicação: 18.05.2010

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi de preparar empanados de pescado e avaliar a composição centesimal, os parâmetros microbiológicos e a análise sensorial do produto. Os peixes utilizados foram jundiá (*Rhamdia quelen*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tilápia (*Oreochromis niloticus*). Foram realizadas análises de umidade, proteínas, extrato etéreo dos peixes *in natura* e dos empanados. Foram realizadas análises microbiológicas para *coliformes* a 45°C, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus* coagulase positiva dos peixes *in natura* e dos empanados. Os empanados dos três pescados foram submetidos ao teste de aceitação em relação à aparência, aroma, sabor, textura e impressão global e de pontuação para a intensidade de sabor. As análises microbiológicas e de composição centesimal estavam em conformidade com os parâmetros exigidos pela legislação vigente. No teste de aceitação, os empanados foram estatisticamente iguais ($p \leq 0,05$) para os todos os atributos, menos para o sabor, em que pacu e jundiá apresentaram-se estatisticamente diferentes. Todas as amostras tiveram alta aceitação com notas superiores a 7,13. Pelo teste de pontuação não houve diferença significativa a 5% entre as amostras com relação ao sabor. Quanto à intenção de compra, a tilápia mostrou ser a preferida, contudo há indicação de aceitabilidade dos empanados dos três tipos de peixes no mercado. **Palavras-chave.** empanado de peixe, aceitabilidade, pescado.

ABSTRACT

This study aimed at preparing breaded fishes and evaluating the centesimal characteristics, microbiological parameters, and the products sensorial analysis. Catfish (*Rhamdia quelen*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*), and tilapia (*Oreochromis niloticus*) *in natura* and prepared as breaded fishes were analyzed on humidity, protein and ethereal extract contents. For microbiological analysis in both forms of the investigated fishes included coliforms at 45°C, *Salmonella* spp. and coagulase-positive *Staphylococcus*. The three breaded fishes were assessed on acceptance test as for the appearance, aroma, taste, texture, and on the global and flavor intensity ranking. The microbiological and centesimal composition analyses were in compliance with the parameters required by the current legislation. As to the acceptance test, no significant differences on all the characteristics were shown among the three breaded fishes ($p \leq 0.05$), except for the flavor as pacu and catfish were statistically different. All the samples were highly approved with grades superior to 7.13. The ranking test showed no significant difference at 5% among the samples on the flavor. On the purchase intention by consumer, tilapia ranked first, however, the results indicate that there is a market for all three breaded fishes kinds.

Key words. breaded fish, acceptability, fish.

INTRODUÇÃO

O consumo mundial de peixes passou por mudanças importantes nas quatro últimas décadas, passando de 9,9 kg/hab/ano na década de 60 para 16,4 kg/hab/ano em 2005. Estimativas preliminares para 2006 indicam um ligeiro aumento de consumo per capita de aproximadamente 16,7 Kg/hab/ano. No Brasil o consumo de pescado está em torno de 5 a 10 kg/hab/ano, bem abaixo da média de consumo mundial, por volta de 16,7 Kg/hab/ano, e do consumo de outros países como Japão (>60 kg/hab/ano), Estados Unidos (20 a 30 Kg/hab/ano) e Angola (10 a 20 kg/hab/ano)¹.

O baixo consumo de pescado pelos brasileiros é explicado não somente pela falta de hábito, mas por fatores externos que também corroboram para tal efeito, como problemas de logística (distribuição e comercialização), pouca variedade de pescado ou até mesmo subprodutos do mesmo, produtos de fácil preparo, além do fator socioeconômico².

O jundiá (*Rhamdia quelen*), é uma espécie nativa de água doce, abundantemente distribuída na América do Sul. Apesar de seu elevado potencial para aproveitamento na aquicultura (rusticidade, boas taxas de reprodução, bom rendimento no processamento de surimi), trata-se ainda de uma espécie subutilizada para a obtenção de derivados de pescado³. Esta espécie apresenta boa aceitação pelo mercado consumidor pela carne saborosa e ausência de “espinhas” intramusculares⁴.

O pacu apresenta características, como o elevado valor comercial, a adaptação à alimentação artificial e a facilidade de obtenção de larvas por meio de reprodução induzida, que contribuíram para tornar a espécie *P. mesopotamicus* o segundo peixe nativo mais cultivado no Brasil⁵. Esta espécie nativa é atualmente a mais indicada para cultivo em tanques redes por pescadores, aquicultores no reservatório da Itaipu-Binacional.

A tilápia se destaca no mercado consumidor em relação a outras espécies por apresentar peculiaridades exigidas pelos consumidores, como apresentar carne branca, textura firme, sabor suave, fácil filetagem e ausência de espinhas em “Y”⁶.

O conhecimento da composição química dos pescados é de fundamental importância para a padronização dos produtos alimentares na base de critérios nutricionais, pois fornece subsídios para decisões de caráter dietário, acompanhamento de processos industriais e seleção de equipamentos para otimização econômico-tecnológica⁷.

A composição centesimal também se justifica pela grande variedade de espécies com potencial para extração ou cultivo⁸.

O Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, Instrução Normativa nº 6⁹, define empanados como sendo produtos de origem cárnea industrializada oriundas de diferentes espécimes de animais, que podem conter em sua constituição ingredientes ou até mesmo recheios, podem ser moldados ou não, cru, semicozido, cozido, semifrito, ou frito e revestidos com cobertura que o caracterize. A elaboração de empanado a partir de peixes, favorece o aumento do consumo desta fonte proteica, além de proporcionar uma alternativa para as indústrias pesqueiras, incentivar o consumidor, devido a praticidade no momento do preparo deste produto, além de favorecer o aproveitamento de espécies de baixo valor comercial¹⁰ por agregar valor a carnes de com menor valor comercial.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver *steaks* de tilápia (*Oreochromis niloticus*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e jundiá (*Rhamdia quelen*) e sua caracterização quanto aos parâmetros microbiológicos, centesimal e aspectos sensoriais.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no laboratório de Desenvolvimento de Produtos do Grupo de Estudos de Manejo na Aquicultura (Gemaq) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus Toledo, em novembro de 2008.

Os peixes jundiá, pacu e tilápia utilizados para este experimento foram insensibilizados com água e gelo, filetados, passaram por um processo de moagem (moedor elétrico Beccaro) e posteriormente foram acondicionados em freezer (Freezer Horizontal, 305 L - Consul) a uma temperatura de -18°C.

Todos os ingredientes foram pesados individualmente em uma balança semianalítica (Tecnal), conforme formulações de *steak* apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Composição percentual dos *steaks* elaborados com jundiá, tilápia e pacu

Ingredientes (%)	Matéria Prima		
	Jundiá	Tilápia	Pacu
Peixe	87,1	86,7	80,2
Condimento preparado*	2,0	1,6	2,2
Alho em Pó	2,5	0,3	1,5
Cebola Desidratada	0,3	2,7	3,5
Amido de milho	4,0	4,3	3,5
Isolado proteico de soja	4,0	4,3	4,0
Água	-	-	5,0

*Sal, Cebola desidratada, Cebolinha desidratada, Salsinha desidratada, Páprica, Alho em pó, Glutamato monossódico e Pimenta

O fluxograma para elaboração dos *steaks* foi: Matéria prima moída à Condimento preparado à Cebola desidratada à Adição de água à Isolado proteico de soja à Amido à Homogeneização à Pesagem e moldagem à Pré enfarinhamento (*predust*) à Líquido de empanamento (*batter*) à Farinha de cobertura (*breeding*) à Congelamento (-18°C) à Fritura (180°C por 3 minutos).

Após uma mistura bem homogênea da carne moída de peixe com os condimentos, porções de 100g foram pesadas, separadas e moldadas em uma forma oval (13,2×9,8×1 cm), dando forma aos *steaks*. Posteriormente foi realizado o processo de empanamento (Tabela 2), passando os *steaks* no “*predust*” (a base de milho), em seguida pelo “*batter*” e por fim no “*breeding*” (a base de milho). Após o término do processo, todos os *steaks* foram dispostos (6 na horizontal, 2 na vertical e empilhados no máximo 2) em distintas bandejas plásticas de polietileno brancas, corretamente identificados e congelados a -18°C.

Tabela 2. Formulação do líquido de empanamento

Líquido de Empanamento	
Ingredientes	%
Farinha de Trigo	17,3
Amido	10,4
Leite em pó	1,7
Sal	1,4
Água	69,2

Composição centesimal

As determinações dos teores de umidade, proteína, extrato etéreo e matéria mineral foram realizadas em triplicatas nas amostras do filé *in natura* e do produto final, segundo metodologias preconizadas pela AOAC (2004)¹¹.

Análise microbiológica

A matéria prima e os *steaks* das três formulações foram submetidas às análises microbiológicas. As avaliações de coliformes a 45°C, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus* coagulase positiva foram realizadas segundo Silva et al¹².

Análise sensorial

A análise sensorial foi realizada no Laboratório de Tecnologia do Pescado no bloco de Engenharia de Pesca da UNIOESTE-Toledo/PR com 30 provadores voluntários não treinados do campus. Os *steaks* foram fritos em óleo de soja Cocamar® a uma temperatura de 180°C por 3 minutos, acondicionados em caixas térmicas a uma temperatura de 65°C e servido quente aos provadores.

Teste de aceitação

Para o teste de aceitação os provadores analisaram três amostras distintas, servidas em pratos descartáveis brancos, devidamente identificadas com números aleatórios de três algarismos. Cada amostra foi apresentada de forma monádica aos provadores, segundo escala hedônica de 9 pontos ancorada nos extremos 1 (desgostei muitíssimo) a 9 (gostei muitíssimo).

Teste de ordenação

O teste de ordenação foi utilizado para estabelecer o atributo de intensidade de sabor. A análise dos resultados foi avaliada segundo o teste de Friedman, utilizando a Tabela de Newel e MacFarlane, que relaciona o número de julgadores com o número de amostras a diferentes índices de probabilidade. O teste foi realizado para um nível de 5% de probabilidade.

Análise estatística

Os dados de aceitação foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. As análises foram realizadas utilizando o programa Statistical Analysis System¹³.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Composição centesimal

A composição centesimal da matéria prima e produtos finais dos filés de pacu, jundiá e tilápia, estão apresentados na Tabela 3.

De acordo com Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Instrução normativa nº6⁹, quanto aos regulamentos técnicos de identidade e

qualidade de empanados, os *steaks* do presente estudo enquadram-se na legislação vigente. A mesma legislação, exige no mínimo 10% de proteína para produtos do tipo empanado, sendo permitido o acréscimo de no máximo 4% de proteína não cárnea.

Tabela 3. Análise centesimal dos empanados de pacu, jundiá e tilápia

(%)	Steak Pacu	Pacu <i>in natura</i>	Steak Jundiá	Jundiá <i>in natura</i>	Steak Tilápia	Tilápia <i>in natura</i>	Legislação
Umidade	63,68	69,48	65,84	75,41	67,46	76,62	-
Matéria mineral	2,7	2,8	2,9	1,3	2,7	0,5	-
Extrato etéreo	10,18	10,85	8,23	5,51	4,08	3,57	-
Proteína	20,45	17,02	20,09	16	19,05	17,07	10 (min)

- Não consta na legislação

Segundo o Dietary Reference Intakes¹⁴, a recomendação de consumo de proteína para indivíduos de 4 a 18 anos de ambos os sexos é de 10 a 30%.

Conforme constatado na tabela anterior, o alto valor da proteína pode ser explicado pelo acréscimo de Proteína Isolada de Soja (PIS) e devido a carne do pescado apresentar valores de proteína variando de 15 a 22%, valores próximos à carne bovina, suína e de frango.

O alto valor da proteína convencional de origem animal (bovino, suínos, aves e pescado) tem proporcionado o desenvolvimento de tecnologia que permita utilizá-los com ingredientes não cárneos em suas formulações, como no caso da proteína isolada de soja, que tem alto valor nutricional, além de melhorar a aparência, palatabilidade e a textura do produto.

Entre a composição centesimal do pescado, a umidade é o componente que mais varia, apresentando valores de 53 a 80%, e, segundo Ordóñez et al¹⁵, apresenta uma correlação inversa com o conteúdo de lipídeos. Estes dados estão de acordo com os resultados obtidos no presente estudo, em que, quando constatado um teor elevado de lipídeos, a umidade mostrou-se baixa e vice-versa (Tabela 3).

A carne de pescado é classificada de acordo com o seu teor de gordura¹⁶, onde valores menores que 2% de lipídeos definem um pescado magro, valores que variam de 2 a 5%, definem um pescado moderado - no qual se enquadra a tilápia deste presente estudo, que obteve valor de 3,57% - e, por fim, valores acima de 5% caracterizados pescados gordos, como o caso do pacu e jundiá, cujos valores foram de 10,85 e 5,51%, respectivamente.

Os resultados das avaliações microbiológicas das amostras de filés, *steaks* e os valores de referência, de acordo com a legislação, estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Avaliação microbiológica dos filés e *steaks* de pacu, jundiá e tilápia

Amostras	Coliformes a 45°C (NMP/g)*	<i>Salmonella</i> spp. em 25 g	<i>Staphylococcus coagulase</i> positiva (UFC/g)**
Pacu <i>in natura</i>	7,0	Ausente	<10
Jundiá <i>in natura</i>	1,1x10 ¹	Ausente	Ausente
Tilápia <i>in natura</i>	1,1x10 ¹	Ausente	<10
Legislação <i>in natura</i>	10 ²	Ausente	10 ³
Steak de Pacu	1,1x10 ¹	Ausente	Ausente
Steak de Jundiá	4,0	Ausente	10
Steak de Tilápia	<3,0	Ausente	Ausente
Legislação empanado	10 ²	Ausente	10 ³

*NMP/g: número máximo provável por grama

**UFC/g: unidade formadora de colônia por grama

Análise microbiológica

Conforme a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução RDC n° 12¹⁷, todas as amostras de filés *in natura* e *steaks* dos pescados, enquadram-se na legislação vigente, apresentando todos os parâmetros abaixo do permitido. Simões et al⁷ observaram ausência de *Staphylococcus coagulase* positiva e *Salmonella* spp. em filés de tilápias tailandesa (*Oreochromis niloticus*), mesmo resultado obtido nos três tipos de *steaks* e filés para o parâmetro *Salmonella* do presente estudo, porém, estas amostras apresentaram valores distintos de *Staphylococcus coagulase* positiva.

Ausência de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. e coliformes totais também foram constatado por Gonçalves e Gomes¹⁸ em camarão empanado corte *butterfly*. No presente trabalho também constatamos que os procedimentos sanitários e higiênicos foram corretamente seguidos, desde a captura até a preparação do produto final, de acordo com os resultados observados. A pesquisa de *Salmonella* é muito importante para alimentos, pois ela não existe originalmente no pescado, sendo introduzida durante sua manipulação, por contato com águas superfícies contaminadas e mal higienizadas. A pesquisa de coliformes termotolerantes nos alimentos nos fornece, com maior segurança, informações sobre as

condições higiênicas do produto e é a melhor indicação da eventual presença de enteropatógenos¹⁹. No presente trabalho, os valores observados foram abaixo do máximo permitido pela legislação vigente, portanto, pode-se concluir que os produtos finais encontram-se em condição higiênico-sanitárias favorável ao consumo.

Análise sensorial

Analisando a Tabela 5 verifica-se que, com relação aos atributos aparência, aroma, textura e impressão global, as amostras de *steak* de pacu, tilápia e jundiá foram estatisticamente iguais ($p \leq 0,05$). Com relação ao atributo sabor, as amostras de *steak* de jundiá apresentaram maior pontuação, não diferindo da tilápia ($p > 0,05$). A menor pontuação quanto ao sabor foi observado nos *steaks* de pacu, também não diferindo dos *steaks* de tilápia ($p > 0,05$). Muitos dos provadores comentaram na ficha de avaliação que o *steak* de pacu estava muito gorduroso. Quando fritos, estes produtos adquirem uma quantidade substancial de gordura, oscilando de 3% a 60%²⁰. A quantidade de cobertura aderida a um produto empanado é um aspecto importante para maior absorção de gordura²¹. O processo de fritura e a característica peculiar do pacu de apresentar uma carne gorda, podem ter realçado ainda mais o sabor de fritura. No entanto, todas as amostras apresentaram excelente aceitação, com médias superiores a 7.

Tabela 5. Teste de aceitação das amostras de *steak* de peixe

Amostra	Aparência	Aroma	Sabor	Textura	Impressão Global
Pacu	7,17 ^a	7,20 ^a	7,00 ^b	7,37 ^a	7,13 ^a
Jundiá	7,50 ^a	7,60 ^a	7,93 ^a	7,57 ^a	7,50 ^a
Tilápia	7,43 ^a	7,27 ^a	7,47 ^{ab}	7,30 ^a	7,50 ^a

*letras iguais na mesma coluna correspondem a médias iguais no teste de Tukey a $p \leq 0,05$

Bons resultados sensoriais de produtos elaborados com pescado também foram observados por Marengoni et al²² ao estudarem a caracterização microbiológica, sensorial e centesimal de *fishburgers* de carne de tilápia mecanicamente separada. Obtiveram valores médios para os parâmetros sabor, aroma, maciez e aparência global que variaram entre 7,14 e 7,46 e, portanto, estiveram na faixa de “moderadamente” a “muito aceitas” pelos degustadores.

Nota-se que na intenção de compra (Gráfico 1), se somarmos as notas obtidas nos itens “possivelmente compraria” e “certamente compraria”, as porcentagens observadas seriam de 60%, 73% e 77% para pacu, jundiá e tilápia, respectivamente. Portanto, os produtos com maior porcentagem de intenção de compra foram os *steak* de tilápia e de jundiá.

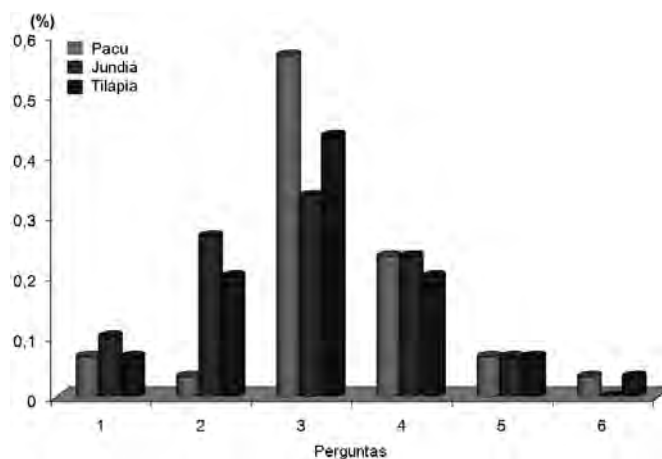


Gráfico 1. 1. Certamente não compraria; 2. Possivelmente não compraria; 3. Talvez comprasse/talvez não comprasse; 4. Possivelmente compraria; 5. Certamente compraria

Segundo Marengoni et al²², as médias das notas para o parâmetro intenção de compra de *fishburgers* de carne de tilápia mecanicamente separada, variaram de 3,86 a 3,98 e apontam resultados entre “talvez comprasse/talvez não comprasse” e “possivelmente compraria o produto”.

Segundo Dasso²³, o consumo de certos produtos, está ligado ao perfil do consumidor, como preferência de marca, idade, local de consumo e padrões culturais. Com relação a atitude de consumo (Gráfico 2), se somarmos as notas obtidas nos itens “Comeria sempre”, “Comeria frequentemente” e “Comeria muito frequentemente”, as porcentagens para os *steaks* seriam de 67%, 70% e 70% para pacu, jundiá e tilápia, respectivamente. Isto indica que se estes produtos estivessem disponíveis no mercado consumidor, todos teriam saída de mercado.

Freitas et al²⁴ ao estudarem a formulação e avaliação sensorial da bolinha de peixe (curimatã) com e sem adição de pimenta, notaram que apenas o atributo sabor apresentou diferença significativa, já que 6,67% dos provadores relataram que as amostras ficariam melhor com uma adição maior de pimenta e 10% recomendaram uma maior concentração de sal. Mesmo assim, ambas

as amostras foram aprovadas pelos provadores que atribuíram valores médios entre 6,90 a 7,43 para as bolinhas de peixe curimatã.

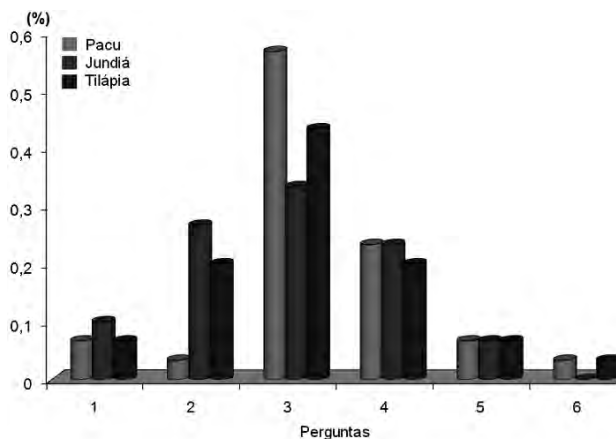


Gráfico 2. 1. Comeria sempre; 2. Comeria muito frequentemente; 3. Comeria frequentemente; 4. Comeria ocasionalmente; 5. Comeria raramente; 6. Comeria muito raramente

No teste de ordenação verificou-se que não existe diferença significativa a 5% entre as amostras com relação ao sabor.

Portanto, além dos *steaks* terem sido bem aceitos na análise sensorial, apresentaram parâmetros microbiológicos e centesimais dentro dos padrões exigidos pela legislação vigente.

CONCLUSÃO

Conclui-se que o jundiá, pacu e tilápia possuem grande potencial na elaboração de produtos diversificados do tipo empanado, agregando valor ao produto, incentivando o crescimento e desenvolvimento do mercado consumidor.

Os empanados do tipo *steak*, elaborados com peixe apresentaram padrões de identidade e características mínimas para consumo humano.

A elaboração de produtos empanados do tipo *steak* mostrou-se viável, obtendo-se um produto de elevado valor nutritivo e com elevada aceitação sensorial entre os provadores, sendo que os tiveram melhor aceitação com relação ao sabor foram os *steak* de jundiá e tilápia. Na intenção de compra a tilápia se sobressai sobre o jundiá e os três tipos de *steaks* teriam consumo se estivessem disponíveis no mercado.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, campus Toledo/PR e ao Grupo de Estudo de Manejo em Aquicultura pela utilização dos laboratórios de microbiologia, bioquímica.

À ITAIPU - Binacional e ao Frigorífico Frigopisces pelas doações dos peixes.

REFERÊNCIAS

1. FAO. The state of world fisheries and aquaculture. FAO Fisheries and Aquaculture Department. Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome, Italy. 162 p.; 2006.
2. Trondsen T, Scholderer J, Lund E, Eggen AE. Perceived barriers to consumption of fish among Norwegian women. *Appetite*, 2003; 41:301-14.
3. Kuhn CR. Avaliação reológica e físico-química da gelificação térmica do surimi de jundiá. *Pesq Agropec Bras*. 2008; 43(12): 1793-98.
4. Lopes PRS, Pouey JLOF, Enke DBS, Martins CR, Timm G. Desempenho de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*) alimentados com diferentes níveis de energia na dieta. *Rev Biodivers Pampeana*. 2006; 4:32-7.
5. Povh JA et al. Monitoramento da variabilidade genética de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) do programa de aumento de estoque do rio Paranapanema. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2009; 61(5):1191-95.
6. Ferreira MW, Silva VK, Bressan MC, Faria PB, Vieira GO, Oda SHI. Pescados processados: maior vida de prateleira e maior valor agregado. [acesso em 2009 mai 15]. Disponível em [http://www.editora.ufla.br/Boletim /pdfextensao/bol_66 pdf].
7. Simões M, Ribeiro CFA, Ribeiro SCA, Park KJ, Murr FEX. Physicochemical and microbiological composition and yield of thai-style tilapia fillets (*Oreochromis niloticus*). *Ciênc Tecnol Alim*. 2007;27(3):608-13.
8. Contreras-Guzmán E S. Bioquímica de pescados e derivados. Jaboticabal: FUNEP; 1994.
9. Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 6, de 15 de fevereiro de 2001. Regulamentos técnicos de identidade e qualidade de paleta cozida, produtos cárneos salgados, empanados, presunto tipo serrano e prato elaborado pronto ou semi-pronto contendo produtos de origem animal. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 19 de fevereiro de 2001.
10. Bonacina M, Queiroz MI. Elaboração de empanado a partir da corvina (*Micropogonias furnieri*). *Ciênc Tecnol Alim*. 2007; 27(3):544-52.
11. AOAC. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemist. EUA; 2004.

12. Silva PPO, Oliveira GA. Contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e enumeração de coliformes totais e fecais, em peixes frescos comercializados no município de Seropédica - RJ. *Hig Aliment*. 2001; 15(88):67-70.
13. SAS - Statistical Analysis Systems. SAS user's guide basics Cary; 1999.
14. Institut of Medicine. Dietary Reference Intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids. Washington (DC): National Academy Press; 2005.
15. Ordóñez Pereda JA, Rodríguez MIC, Álvarez LF, Sanz ML, Minguillón GDGF, Perales LH, Cortecero MDS. *Tecnología de alimentos*. v.2. Alimentos de origem animal. São Paulo: Artmed; 2005. 279p.
16. Pigot G, Tucker B. Sea food effects of technology on nutrition, 1st edit, Edit Marcel Dekker, INC, New York, USA, 1990.
17. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 10 de janeiro de 2001.
18. Gonçalves A, Gomes P. Desenvolvimento de um produto de valor agregado: camarão empanado corte butterfly. *Rev Bras Eng Pesca*. 2008;3(1):62-75.
19. Landgraf M. Microrganismos indicadores. In: Franco BDMG, Landgraf M. *Microbiologia de Alimentos*. São Paulo: Atheneu; 1996.
20. Luvielmo M, Dill D. Utilização da goma metilcelulose para redução da absorção de gordura em produtos empanados. *Semin: Ciências Exatas e da Terra*. 2008; 29(2):107-18.
21. Lemos ALSC. Empanamento: valor agregado e conveniência para produtos cárneos. In: Tópicos especiais: processamento da carne de aves: CTC/ITAL. 2003; 1. p.112-4.
22. Marengoni N, Pozza M, Braga G, Lazzeri D, Castilha L, Bueno G et al. Caracterização microbiológica, sensorial e centesimal de fishburgers de carne de tilápia mecanicamente separada. *Rev Bras S Prod An*. 2009;10(1):168-76.
23. Dasso I. Qué ponemos em juego al degustar um alimento? *La Alimentación Latinoamericana*. 1999;33(229):34-6.
24. Freitas RM, Rocha EMFF, Moura LB, Marques LF, Costa TL, Moura RL et al. Formulação e avaliação sensorial da bolinha de peixe curimatã com e sem adição de pimenta. III Jornada Nacional da Agroindústria; 2008.

Determinação da fração da fibra alimentar solúvel em raiz e farinha de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) pelo método enzimático-gravimétrico e cromatografia líquida de alta eficiência

Determination of the soluble dietary fiber fraction in yacon (*Smallanthus sonchifolius*) root and flour by enzymatic-gravimetric method and high pressure liquid chromatography

RIALA6/1276

Christiane Mileib VASCONCELOS¹, Cassiano Oliveira da SILVA¹, Luciano José Quintão TEIXEIRA², José Benício Paes CHAVES¹, Hércia Stampini Duarte MARTINO^{3*}

*Endereço para correspondência: Departamento de Nutrição e Saúde, Universidade Federal de Viçosa/UFV, Av. P. H. Rolfs s/n., Campus da UFV, CEP. 36570-000, Viçosa/MG, tel: +55 31 3899-3741, email: hercia@ufv.br

¹Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil

²Departamento de Engenharia Rural, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil

³Departamento de Nutrição e Saúde, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

Recebido: 20.01.2010 – Aceito para publicação: 30.04.2010

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo determinar o teor total de fibras alimentares em polpa da raiz (PRY) e de farinha de yacon (FY) pelo método enzimático-gravimétrico segundo AOAC e os frutanos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A FY foi preparada por meio do processo de limpeza, sanitização, branqueamento e a secagem da PRY a 55°C por 48 horas. Foi determinada a composição centesimal da FY e da PRY; o teor de fibras totais correspondeu ao somatório das determinações pelo método enzimático-gravimétrico e HPLC. Encontrou-se elevado teor de fibra alimentar total (matéria seca) nas amostras de PRY e de FY (33,14 e 50,76%, respectivamente), com predomínio de frutooligosacarídeos [FOS] (37,97 e 40,97% respectivamente) e considerável teor de inulina (26,10 e 20,75%, respectivamente). O cromatograma também mostrou elevada concentração de frutose, glicose e sacarose como únicas fontes de carboidratos, além dos frutanos, inulina e FOS. Os métodos enzimático-gravimétricos são considerados os mais apropriados para análises rotineiras de fibras alimentares, contudo estes são ineficazes para determinação de oligossacarídeos com grau de polimerização menor do que 12, como é o yacon. Assim, é necessário efetuar métodos complementares, como HPLC, para quantificar com exatidão o teor total de fibra alimentar dessa raiz.

Palavras-chave. fibras alimentares, raiz de yacon, farinha de yacon, inulina, frutooligosacarídeos.

ABSTRACT

This study aimed at determining the total dietary fiber contents in yacon root pulp (YRP) and yacon flour (YF) by the AOAC enzymatic-gravimetric method, and fructans by high performance liquid chromatography (HPLC). The YF was put through the process of cleaning, sanitizing, bleaching, and YRP was dried at 55 °C for 48 hours. The chemical composition of the YF and YRP was determined, being the total fiber contents the sum of the determinations by enzymatic-gravimetric method and HPLC. High contents of total dietary fiber were detected in the dry mater of both YRP and YF samples (33.14 and 50.76%, respectively), being mostly fructooligosaccharides [FOS] (37.97 and 40.97%, respectively), and substantial inulin contents (26.10 and 20.75%, respectively). The chromatogram also showed high contents of fructose, glucose and sucrose as the sole source of carbohydrates besides fructans, inulin and FOS. The enzymatic-gravimetric methods are considered the most suitable for routine analysis of dietary fibers, but are ineffective for determining oligosaccharides with polymerization degree less than 12, as yacon. Thus, a complementary method, such as HPLC, needs to be carried out to quantify the exacting dietary fiber contents in this root.

Key words. dietary fiber, yacon root, yacon flour, inulin, fructooligosaccharides.

INTRODUÇÃO

Atualmente, o yacon é comercializado como alimento nutracêutico e tem sido descrito como o alimento com maior conteúdo de frutooligosacarídeos (FOS) na natureza. Uma das principais características destes carboidratos é a estimulação do crescimento de bactérias não-patogênicas por meio da fermentação colônica, levando à modulação da composição do ecossistema natural do intestino grosso, sendo assim classificados como constituintes bioativos com alegação prebiótica¹ e, portanto, funcionais.

Em função dos benefícios nutricionais apontados pelo yacon, a farinha de yacon vem sendo desenvolvida e utilizada como ingrediente em alimentos. Tal fato vem permitindo a formulação de produtos com baixo teor de gordura, reduzido valor calórico e elevada concentração de fibra alimentar, podendo propiciar efeito protetor à saúde do consumidor².

Além das propriedades fisiológicas, as fibras alimentares, especialmente as solúveis ou viscosas³, dentre elas inulina e FOS, que estão presentes no yacon, possuem características que permitem sua aplicação em diversas áreas, pois apresentam elevado poder adoçante e solubilidade, não cristalizam, não precipitam e nem deixam sensação de secura ou areia na boca, não são degradadas durante a maioria dos processos de aquecimento e não são calóricas⁴.

Contudo, não há ainda um método de análise capaz de quantificar todo o conteúdo de fibras alimentares existente nos alimentos, especialmente se FOS e inulina estiverem presentes nesses alimentos⁵.

O método fibra bruta, um método químico-gravimétrico que estima o valor da fibra baseado na medida do resíduo após digestão *in vitro* com ácido e álcali, foi amplamente utilizado até 1970, sendo considerado obsoleto desde então, porque subestima em 3 a 5 vezes o valor real da fibra alimentar⁶. O método enzimático-gravimétrico, que atualmente é o método mais amplamente utilizado para análises rotineiras de fibras alimentares, como na rotulagem de alimentos, no controle de qualidade e para o objetivo de certas pesquisas, não fornece informações detalhadas de seus componentes⁷, podendo prover informações incompletas sobre a composição dos carboidratos, se outros açúcares como frutose, glicose e sacarose estiverem também presentes⁸. Além disso, quantifica apenas uma pequena fração da inulina e nenhuma de oligofrutanos presente no alimento^{9,10}.

O método desenvolvido por Quemener et al¹¹ que se baseia no tratamento enzimático de produtos com inulinase (Fructozym), seguido por determinação dos açúcares liberados, permite a quantificação apenas dos frutanos presentes no alimento. Os frutanos são removidos com água fervente e, em seguida, tratados com amiloglicosidase e depois com inulinase. A quantidade de glicose, frutose e sacarose é determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por Pulso Amperométrico (HPLC-PAD) e a concentração de frutanos é calculada pela diferença entre essas determinações^{12,13}.

Herman et al¹⁴ determinaram fibras alimentares em raízes de yacon, utilizando conjuntamente o método de fibra bruta pelo sistema Fibertec e o método baseado na hidrólise ácida da amostra, seguida por HPLC para determinação dos açúcares livres e quantificação indireta de frutanos, encontrando quantidade média de 0,36 g.100g⁻¹ de fibra bruta e 6,2 g.100g⁻¹ de frutanos em base úmida, totalizando 6,56 g.100g⁻¹ de fibras totais. Diferentemente, o estudo de Silva¹⁵ utilizou apenas o método enzimático-gravimétrico para quantificação de fibras alimentares totais, solúveis e insolúveis, obtendo valores médios de 0,920; 0,403 e 0,518 g.100g⁻¹ em base úmida, respectivamente, para raízes de yacon de três diferentes localidades do estado de Santa Catarina.

Diante da escassez de métodos capazes de quantificar todo o conteúdo de fibras alimentares existente nos alimentos e a existência de dados contraditórios, o presente trabalho teve como objetivo determinar a composição centesimal da polpa da raiz e da farinha de yacon, avaliando a quantidade total de fibras alimentares pelos métodos enzimático-gravimétrico e HPLC-PAD, propondo uma alternativa para quantificar na totalidade o conteúdo de fibra alimentar desses produtos.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção da polpa da raiz de yacon

Foram adquiridos 50 kg da raiz de yacon *in natura*, provenientes do comércio local de Viçosa/MG, sendo retirado aleatoriamente cerca de 1 kg para a realização das análises. O restante da raiz foi utilizado para a elaboração da farinha de yacon, sendo posteriormente retirada uma amostra aleatória para as análises.

A raiz de yacon *in natura* foi inicialmente lavada em água corrente a 25°C, imersa durante 15 minutos em

solução de hipoclorito de sódio 2 mL.L⁻¹ e descascadas manualmente para obtenção da polpa. Em seguida, esta foi embalada em sacos de polietileno e armazenada a 5°C.

Obtenção da farinha de yacon

A produção da farinha de yacon baseou-se na metodologia de Ribeiro¹⁶ com modificações. As raízes *in natura* foram lavadas em água corrente, descascadas manualmente e raladas em multiprocessador (marca WALITA, modelo RI7625). Para sanitizar e evitar a oxidação excessiva, as partes raladas do yacon foram imersas durante 15 minutos, primeiramente, em solução contendo hipoclorito de sódio a 2 mL.L⁻¹ de água e depois, em bissulfito de sódio a 0,1% (m.m⁻¹ da raiz descascada). Após esse procedimento, o líquido foi eliminado com auxílio de uma peneira. Em seguida, as partes raladas de yacon foram depositadas em bandejas de polietileno e secadas em estufa com ventilação forçada (marca Nova Ética, modelo 400/D) a 55°C por 48 horas. Posteriormente, o yacon seco foi triturado em um moinho de rotor (marca MARCONI, modelo MA090CFT) para obtenção de um produto com características de farinha, que foi embalado em sacos plásticos de polietileno, vedados e armazenado sob refrigeração.

Composição centesimal da raiz e da farinha de yacon

As análises de composição centesimal da polpa da raiz e da farinha de yacon foram realizadas de acordo com a AOAC¹⁷: umidade, determinada em estufa a 105°C até peso constante; proteínas, pelo método de Kjeldahl, sendo o teor proteico calculado pela multiplicação do teor de nitrogênio pelo fator 6,25; lipídios, pelo método de extração com éter etílico em equipamento Soxhlet; e cinzas, por processo gravimétrico, por meio da carbonização das amostras, seguida de incineração em mufla a 550°C até peso constante.

O teor de fibra alimentar solúvel (FAS) e fibra alimentar insolúvel (FAI) da polpa da raiz e da farinha de yacon foram determinados de acordo com o método enzimático-gravimétrico da AOAC¹⁷, utilizando o kit enzimático da marca Sigma. Esse método está fundamentado na porção não hidrolisada do alimento que resiste à digestão enzimática sequencial com α -amilase, protease e amiloglicosidase.

O teor de FOS e inulina da polpa da raiz e da farinha de yacon foi determinado por Cromatografia Líquida de

Alta Eficiência (HPLC) com coluna HPX 87P marca BIO-RAD (fase estacionária de chumbo), usando água purificada como fase móvel. As amostras foram diluídas (1 g em 100 mL de água destilada), centrifugadas a 12000 rpm, e depois, filtradas em membrana de decafluoreto de polivinil (PVDF) da Millipore com 0,22 μ m de porosidade e 13 mm de diâmetro. Em seguida, as amostras foram injetadas em Cromatógrafo líquido marca VÁRIAN, modelo PRÓ-STAR 410 com detector de índice de refração e injetor automático (AUTO SAMPLER 410), com fluxo de 0,6 mL.min⁻¹ e temperatura da coluna de 85°C, projetando uma sequência de picos que foram comparados com as curvas pré-definidas no equipamento¹⁸.

O teor de fibra alimentar total da polpa de raiz e da farinha de yacon foi obtido por meio do somatório de FAI, FAS, FOS e inulina.

O teor de carboidratos foi determinado por diferença, subtraindo-se de 100 a soma dos valores obtidos de umidade, proteína, lipídios, cinzas e fibras totais conforme AOAC¹⁷.

Os resultados de cada determinação foram expressos como média de três replicatas para cada tipo de amostra, exceto para a análise de fibra alimentar, em que foram realizadas duas replicatas para cada amostra.

O valor calórico da polpa da raiz e da farinha de yacon foi calculado utilizando-se os coeficientes de Atwater que considera 4 kcal.g⁻¹ para proteínas e carboidratos e 9 kcal.g⁻¹ para os lipídios^{19,20}.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição centesimal e o teor de fibra alimentar da polpa da raiz e da farinha de yacon são apresentados na Tabela 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1. Composição química média e valor calórico da polpa da raiz e da farinha de yacon (g.100g⁻¹), em base úmida e seca

Componentes	Polpa da raiz		Farinha	
	Matéria úmida	Matéria seca	Matéria úmida	Matéria seca
Umidade	91,10	-	6,59	-
Proteína	0,13	1,46	2,61	2,79
Lipídios	0,01	0,11	0,27	0,29
Cinzas	0,30	3,37	3,39	3,63
Fibras totais	2,95	33,15	47,42	50,76
Carboidratos	5,51	61,91	39,72	42,52
Valor calórico (Kcal/g ¹)	22,65		171,74	

Tabela 2. Média dos componentes da fração fibra alimentar encontradas na raiz e farinha de yacon (g.100g⁻¹)

Componentes	Polpa da Raiz	Farinha
Método Enzimático-Gravimétrico		
Fibras insolúveis	0,84	15,91
Fibras solúveis	0,22	2,24
HPLC-PAD		
Oligofrutanos	1,12	19,43
Inulina	0,77	9,84
Total	2,95	47,42

Observou-se elevada concentração de água na polpa da raiz de yacon e, em relação aos demais constituintes, os predominantes foram os carboidratos e as fibras alimentares, que representaram 95% da matéria seca da polpa da raiz (Tabela 1). Esses resultados estão de acordo com os achados na literatura, os quais descrevem que as raízes de yacon apresentam principalmente água e carboidratos, sendo que o percentual de água situa-se entre 85 e 90%, e o percentual de matéria seca entre 10 e 14%, representado principalmente por carboidratos (digeríveis e não digeríveis), que correspondem a aproximadamente 90% da matéria seca^{21,22}.

A obtenção da farinha de yacon, por meio do processo de secagem da polpa, aumentou a concentração dos componentes funcionais, como o FOS e a inulina. Tal fato indica a possibilidade de uso da farinha de yacon como ingrediente em uma ampla variedade de produtos, visto que o FOS e a inulina são estáveis a temperaturas superiores a 140°C²³ e a produção de farinha de yacon diminui a degradação enzimática de FOS em glicose e frutose²².

Tanto a polpa da raiz quanto a farinha de yacon apresentaram elevada concentração de fibra alimentar total (33,14 e 50,76% da matéria seca, respectivamente). Entre os componentes da fibra alimentar (Tabela 2), ocorreu o predomínio de FOS, representando 37,97% do total de fibra alimentar da polpa da raiz e 40,97% da farinha de yacon, em base seca. Além de FOS, é possível observar também elevada concentração de inulina em relação ao total de fibra alimentar, em base seca.

O elevado teor de FOS e inulina nos produtos pode conferir à raiz diversos efeitos benéficos à saúde, especialmente na forma de farinha, podendo sugerir alegação de funcionalidade. De acordo com a ANVISA²⁴,

um alimento tem alegação de funcionalidade quando ele é capaz de fornecer no mínimo 3 g de FOS por porção do produto pronto para consumo. Nesse sentido, a ingestão de 15,44 g.dia⁻¹ de farinha de yacon seria suficiente para fornecer a quantidade recomendada de FOS, bem como o consumo de 267,8 g.dia⁻¹ de polpa da raiz.

Os resultados apresentados no presente estudo, entretanto, não corroboraram os estudos de Marangoni²⁵, que encontrou concentrações de 19,12 e 4,56% de fibra alimentar (base seca), e Ribeiro¹⁶, que obteve valores de 10,50 e 12,83% de fibra alimentar (base seca) para polpa da raiz e farinha de yacon, respectivamente. Tal fato provavelmente ocorreu devido aos métodos analíticos utilizados nestes estudos para determinação de fibra alimentar. No estudo de Marangoni²⁵, foi utilizado o método fibra bruta, e no estudo de Ribeiro¹⁶, o teor de fibra alimentar foi determinado pelo método enzimático-gravimétrico.

Os métodos enzimático-gravimétricos são capazes de determinar apenas a fração solúvel da fibra com grau de polimerização (GP) maior ou igual a 12, visto que tais fibras são solúveis em etanol a 78% e possuem baixo peso molecular, sendo então perdidas durante a etapa de filtração do precipitado, acarretando, desta forma, uma subestimação no conteúdo de fibras para aqueles alimentos que contêm esses compostos^{6,7}.

Ohyama et al²⁶, ao analisarem a composição de carboidratos de reserva em yacon, verificaram a presença, em maior quantidade, de um trissacarídeo cuja estrutura do oligofrutano foi analisada por ressonância magnética nuclear (¹³C-NMR). Constataram que os tubérculos de yacon acumulam alta concentração de oligossacarídeos de baixo GP, entre 3 e 10 monômeros.

Portanto, não há como determinar os frutanos da polpa da raiz e da farinha de yacon que possuem GP entre 3 e 10, confirmando a necessidade de utilização de métodos que sejam capazes de determinar o teor de oligofrutanos desses alimentos.

O método HPLC tem sido a técnica mais popularmente utilizada para análises de inulina e oligofrutanos. Tanto as fases polares quanto a coluna de HPLC à base de resina são comumente utilizadas com detector de índice de refração para separação de FOS de diferentes GP²⁷.

O cromatograma das amostras de polpa da raiz e da farinha de yacon, discriminando os perfis de açúcares pode ser observado na Figura 1. Visto que as amostras são obtidas a partir do mesmo alimento, o cromatograma de ambos apresenta um perfil idêntico.

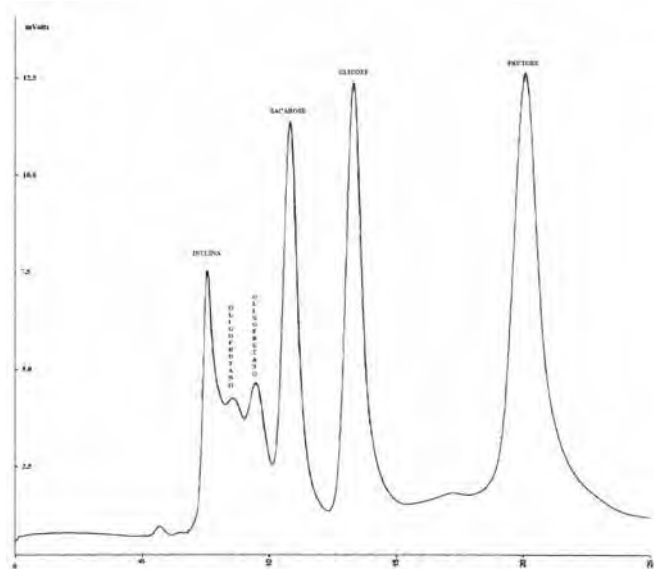


Figura 1. Cromatograma típico da determinação de inulina, oligofrutano, sacarose, glicose e frutose em polpa da raiz de yacon e em farinha de yacon

Observou-se que além de inulina e oligofrutanos, foram encontrados também glicose, frutose e sacarose, o que pode contribuir para a determinação de informações incompletas sobre a composição de fibra alimentar determinados pelo método enzimático-gravimétrico⁷.

CONCLUSÃO

Torna-se necessária a utilização de métodos agrupados para a determinação de fibras alimentares em alimentos ricos em inulina e oligofrutanos como na polpa da raiz e farinha de yacon. Não existem métodos de determinação de fibra alimentar que sejam capazes de quantificar tanto o teor de fibras insolúveis e solúveis em sua totalidade.

Apesar do método enzimático-gravimétrico ser considerado o mais apropriado para análise de fibra alimentar, deve-se atentar para o tipo de alimento, pois este método tende a subestimar a concentração de fibra alimentar solúvel em alimentos ricos em inulina e oligofrutanos, como o yacon e seus produtos. Nestes casos, deve-se associá-lo com outro método que detecta separadamente os monômeros de grau de polimerização (GP) menor que 12.

O presente estudo demonstrou uma eficiente associação da quantificação de fibra alimentar solúvel por meio da utilização do método enzimático-gravimétrico e HPLC, principalmente naqueles alimentos que contêm elevada concentração de inulina e FOS.

REFERÊNCIAS

1. Meier R, Lochs H. Pre and probiotics. *Therapeut. Umschau. Rev Thérapeut.* 2007;64(3):161-9.
2. Rolim PM. Aspectos sensoriais e funcionais de pães com farinha de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) [dissertação de mestrado]. Recife, Pernambuco: Universidade Federal de Pernambuco, 2008.
3. Anderson JW. Dietary fiber and human healthy. *Hortic Sci.* 1990; 25:1488-95.
4. Bornet FRJ. Undigestible sugars in food products. *Am J Clin Nutr.* 1994;59:7635-95.
5. McCleary BV. Dietary Fibre Analysis. *Proceedings of the Nutrition Society.* 2003;62:3-9.
6. Sanchez-Castillo CPS, De Wey PJS, Bourges H, James WPT. Dietary fibre, what it is and how it is measured. *Arch Latinoam Nutr.* 1994;44(2):68-75.
7. Filisetti TMC. Fibra Alimentar - Definições, Componentes e Métodos Analíticos. In: Silva SMCS, Mura JDP. *Tratado de alimentação, nutrição e dietoterapia.* 1ª ed. São Paulo: Ed. Roca; 2007. p.179-98.
8. Capito SMP, Filisetti TMCC. Inulina: um ingrediente alimentar promissor. *Cadernos de Nutrição.* 1999; 18:1-11.
9. Coussement P. Inulin and oligofructose as dietary fiber: analytical, nutritional and legal aspects. In: Cho SS, Prosky L, Dreher M, editores. *Complex Carbohydrates in Foods.* New York: Marcel Dekker; 1999. p.203-12.
10. Sangeetha PT, Ramesha MN, Prapullaa SG. Recent trends in the microbial production, analysis and application of Fructooligosaccharides. *Trends Food Sci Technol.* 2005;16: 442-57.
11. Quemener B, Thibault JF, Coussement P. Determination of inulin and oligofructose in food products, and integration in the AOAC method for measurement of total dietary fiber. *Lebens Wissen Techn.* 1994; 27:125-32.
12. Prosky L, Hoebregs H. Methods to Determine Food Inulin and Oligofructose. *J Nutr.* 1999;129:1418S-23S.
13. IFST. Institute of Food Science & Technology. Dietary Fibre [serial on line]. 2007: 1-10. Disponível em: [http://www.ifst.org/document.aspx?id=117].
14. Hermann M, Freire I, Pazos C. Compositional diversity of the yacon storage root. In: 'Impact on a changing world. CIP Program Report. Lima: Centro Internacional de la Papa; 1998: 425-32.
15. Silva ASS. A raiz de yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepping & Endlicher) como fonte de fibras alimentares, sua caracterização físico-química, uso na panificação e sua influência na glicemia pós-prandial. [tese de doutorado]. Florianópolis, Santa Catarina: Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.
16. Ribeiro JA. Estudo químico e bioquímico do yacon (*Smallanthus sonchifolius*) in natura e processado e influência do seu consumo sobre níveis glicêmicos e lipídios fecais de ratos. [dissertação de mestrado] Lavras, Minas Gerais: Universidade Federal de Lavras, 2008.
17. AOAC. Official Methods of Analysis of the AOAC International. 16th ed. Gaithersburg: 1997.
18. Kaneko T, Kudo T, Horikoshi K. Comparison of CD composition produced by chimeric CGTases. *Agric Biol Chem.* 1990; 54(1):197-01.
19. Torres EAFS, Campos NC, Duarte M, Garbelotti ML, Philippi ST, Rodrigues RSM. Composição centesimal e valor calórico de alimentos de origem animal. *Ciênc Tecnol Aliment.* Campinas. 2000;20(2):145-50.

20. Watt B, Mirrill AL. Composition of foods: raw, processed and prepared. Washington: Consumer and Food Economics Research Divisions/Agricultural Research Service, 1963. 198p. (Agriculture Handbooke, 8).
21. Manrique I, Párraga A, Hermann M. Yacon syrup: Principles and processing. Series: Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos andinos: Una década de investigación para el desarrollo (1993-2003). n. 8B. International Potato Center, Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión, Erbacher Foundation, Swiss Agency for Development and Cooperation. Lima, Peru. 31p.
22. Graefe S, Hermann M, Manrique I, Golombek S, Buerkert A. Effects of post-harvest treatments on the carbohydrate composition of yacon roots in the Peruvian Andes. *Field Crops Res*. 2004; 86:157-65.
23. Moura CP. Aplicação de redes neuronais para a predição e otimização do processo de secagem de yacon (*Polymnia sonchifolia*) com pré-tratamento osmótico. [dissertação de mestrado] Curitiba, Paraná: Universidade Federal do Paraná, 2004.
24. Brasil. Resolução RDC n° 359, de 23 de dez. 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diário Oficial [da] União. Brasília, DF, 26 de dez. 2003. Seção 1, p.28-9.
25. Marangoni AL. Potencialidade de aplicação da farinha de yacon (*Polymnia sonchifolia*) em produtos à base de cereais. [dissertação de mestrado] Campinas, São Paulo: Universidade Estadual de Campinas, 2007.
26. Ohyama T, Ito O, Yasuyoshi S, Iharashi T, Minamizawa K, Kubota M et al. Composition of storage carbohydrate in tubers of yacon (*Polymnia sonchifolia*). *Soil Sci Plant Nutr*. 1990; 36(1):167-71.
27. Prapulla SG, Subhaprada V, Karanth NG. Microbial production of oligosaccharides: A Review. In: Laskin AL, Bennet JW, Gadd G. *Adv Appl Microbiol*. New York: Academic Press; 2000. p. 299-37.

Comparação de metodologias para detecção de fungos em arroz irradiado

Comparison of methodologies for detecting fungi in gamma-ray irradiated rice

RIALA6/1277

Ívina Catarina de Oliveira GUIMARÃES^{1*}, Joelma PEREIRA², Vanda Maria de Oliveira CORNÉLIO³, Luís Roberto BATISTA⁴, Roseane Maria EVANGELISTA¹, Eric Batista FERREIRA⁵

*Endereço para correspondência: ¹Departamento de Ciências dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras - MG, Brasil, (35) 99216671, e-mail: ivinacath@yahoo.com.br; rmeevangelista@hotmail.com

²Laboratório de Grãos e Cereais, Departamento de Ciências dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras - MG, Brasil

³Centro Tecnológico do Sul de Minas – CTSM, Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais - EPAMIG, Campus UFLA, Lavras - MG, Brasil

⁴Laboratório de Microbiologia, Departamento de Ciências dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras - MG, Brasil

⁵Departamento de Ciência Exatas, Universidade Federal de Alfenas - EFOA, Alfenas, MG, Brasil

Recebido: 16.11.2009 – Aceito para publicação: 14.06.2010

RESUMO

O monitoramento da contaminação fúngica do arroz é imprescindível para assegurar a qualidade e segurança desse cereal. Atualmente, para avaliar a qualidade microbiológica dos alimentos, diferentes métodos têm sido propostos. Duas diferentes metodologias, plaqueamento direto e *blotter test*, foram comparadas quanto à eficiência em efetuar a detecção de fungos em arroz branco polido irradiado. Para realizar o *blotter test*, foram utilizadas placas de Petri contendo três folhas de papéis de filtro esterilizados, umedecidas em água destilada esterilizada e acrescidas com 5 mL de ágar água 0,5%. Na técnica de plaqueamento direto, os grãos foram plaqueados em meio de cultura DRBC. As amostras foram incubadas a 25°C por sete dias e analisadas em microscópio estereoscópico. Os gêneros fúngicos presentes no arroz irradiado foram *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium* e *Trichoderma*, com a predominância de *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp., cujas frequências foram, respectivamente, de 5,2% e 5,6% no plaqueamento direto e de 34,5% e 5,6% no *blotter test*. Observou-se que a irradiação gama diminuiu consideravelmente o número de grãos contaminados, sendo 96,7% pela metodologia de plaqueamento direto e até 100% pelo *blotter test*. O *blotter test* possibilitou efetuar maior contagem dos gêneros fúngicos presentes no arroz, constando-se que o método de detecção escolhido pode interferir na quantificação fúngica presente nesse cereal.

Palavras chaves. detecção de fungos, arroz, *blotter test*, plaqueamento direto, fungos, irradiação de alimentos.

ABSTRACT

Monitoring the fungal contamination of rice is essential for ensuring the product quality and safety. Different methods have been proposed for assessing the microbiological quality of foods. Two methodologies based direct plating and blotter test were compared for detecting fungi in irradiated polished white rice. For performing the blotter test, the Petri dishes containing three sterile filter paper sheets were moistened with sterile distilled water, and 5 mL of 0.5% water-agar were added onto them. For carrying out the direct plating technique, the rice samples were plated onto DRBC medium. The samples were incubated at 25°C for seven days, and analyzed under a stereomicroscope. The fungi genera found in irradiated rice were: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium* and *Trichoderma*, being *Penicillium* sp. and *Aspergillus* sp. the mostly predominant, with the prevalence of 5.2% and 5.6% by direct plating and 34.5% and 5.6% by blotter test, respectively. The gamma-ray irradiation significantly decreased the proportions of contaminated grains, being 96.7% by means of direct plating technique and 100% by blotter test. The blotter test showed highest efficiency in fungal genera counting found in rice samples, which evidences that the chosen detection methodology may interfere on quantifying the fungi contaminants in cereals.

Key words. detection of fungi, rice, blotter test, direct plating, fungi, food irradiation.

INTRODUÇÃO

Os fungos estão amplamente distribuídos na natureza e são contaminantes comuns de alimentos, grãos e rações, que, por apresentarem nutrientes como carboidratos, proteínas e lipídeos, constituem um substrato adequado para o desenvolvimento de micro-organismos¹. Determinados fungos contaminantes de produtos agrícolas produzem metabólitos secundários tóxicos denominados micotoxinas, que se ingeridas, podem repercutir em sérios efeitos deletérios à saúde humana, incluindo atividade mutagênica, carcinogênica e teratogênica, além do impacto econômico e social, devido a perdas de vidas humana e animal, despesas com tratamentos médicos e veterinários, perdas na produtividade, e redução da disponibilidade de alimentos^{2,3}.

Os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* são os mais frequentemente associados com micotoxinas que ocorrem naturalmente em cereais, grãos e sementes em níveis que tornam os alimentos impróprios para consumo⁴. De acordo com Santos et al⁵, os países de origem asiática não só consomem o arroz diariamente como dão ênfase ao problema da contaminação fúngica e por micotoxinas neste cereal.

Desta maneira, a caracterização e identificação de fungos contaminantes de alimentos são essenciais para o controle da contaminação por estes micro-organismos e a possível produção de micotoxinas⁶.

A detecção de fungos em alimentos pode ser realizada, de maneira geral, para detecção de todos os fungos presentes, um fungo específico ou um grupo de fungos relacionados⁷.

A quantificação de fungos filamentosos em alimentos geralmente envolve a inoculação da amostra em meios de cultivo sólidos, através de plaqueamento em superfície ou em profundidade⁸. De modo geral, os meios de cultura para avaliação fúngica são altamente seletivos, suprimindo contaminações bacterianas⁹ e limitando o crescimento e disseminação das colônias fúngicas¹⁰. Infelizmente não se dispõe de um único meio que seja satisfatório para detecção ou quantificação de leveduras e fungos filamentosos em todos os tipos de alimentos.

Os meios suplementados com antibióticos e tinturas, como o ágar dicloram rosa de bengala e cloranfenicol¹¹, surgiram como alternativa aos meios acidificados por serem menos inibitórios a células injuriadas, mais efetivos na inibição do desenvolvimento bacteriano e produzirem menor precipitação de partículas de alimento, devido ao pH mais elevado (5-6)¹². Rotineiramente o dicloram e o corante rosa de bengala têm sido aplicados no controle da velocidade

de disseminação de espécies fúngicas, restringindo, principalmente, os zigomicetos de rápido crescimento¹¹.

Dentre as metodologias de testes de sanidade para a detecção de fungos em sementes, os testes com incubação sob condições controladas tem o objetivo de facilitar o crescimento e esporulação dos fungos, o que permite uma identificação rápida e segura do micro-organismo envolvido. Os métodos desenvolvidos nos últimos anos incluem técnicas que variam em grau de complexidade. Dentre os métodos considerados simples cita-se o *Blotter Test*¹³ com suas variações na metodologia. Atualmente, este método é de uso rotineiro em laboratórios de análise por preencher os requisitos de rapidez, simplicidade, baixo custo e permitir o levantamento da microflora associada a diversos tipos de sementes e quantificação do inóculo^{14,15}. Apesar das características favoráveis à sua utilização, não há dados na literatura que reportem sua utilização em análise da sanidade de alimentos.

Embora o plaqueamento direto seja considerado, por Pitt e Hocking¹⁶, a metodologia mais adequada para o isolamento de fungos nos alimentos, uma vez que utiliza meio de cultura padronizado, possibilitando condições mais estáveis para o crescimento e o desenvolvimento fúngico, o *Blotter Test*¹³ é muito utilizado para testes de sanidade em semente, justamente por possibilitar maior contagem fúngica e variedade de espécies, levantando questionamentos sobre o método mais adequado a ser utilizado para este fim.

Assim sendo, o presente trabalho teve por objetivo avaliar dois diferentes métodos usados em laboratório, com a finalidade de selecionar o mais sensível na detecção de fungos em arroz exposto a diferentes doses de irradiação gama.

MATERIAL E MÉTODOS

Caracterização do experimento

Foram selecionadas, para serem submetidas à irradiação, seis amostras comerciais de arroz branco polido, longo fino, tipo 1, que se apresentavam em perfeito estado de integridade física, dentro dos prazos de validade e oriundas de distintas empresas de beneficiamento. Das seis amostras de arroz, três estavam contidas em embalagens de 5kg (adquiriu-se um pacote por amostra), e as outras três, contidas em embalagens de 2kg (adquiriu-se dois pacotes por amostra).

Processo de irradiação

Preparo das amostras

Cada amostra de arroz branco polido foi homogeneizada dentro da própria embalagem e, logo

em seguida, subdividida em cinco subamostras de 500g: uma delas foi reservada como amostra controle (0kGy) e cada uma das outras quatro subamostras foi destinada às respectivas doses de irradiação sob investigação (2,5kGy, 5,0 kGy, 7,5 kGy e 10 kGy). Para conferir condições mais uniformes durante o tratamento, todas as amostras foram acondicionadas em embalagens plásticas de polietileno, devidamente lacradas e identificadas. Todo o procedimento foi executado em capela de fluxo laminar.

Procedimento de irradiação e acondicionamento das amostras

As amostras de arroz branco polido foram irradiadas em irradiador Gammacell panorâmico GB-127, IR-214 (MDS Nordion, Canadá), com fonte de cobalto⁶⁰ (Co⁶⁰) armazenada a seco, localizado no Laboratório de Irradiação Gama (LIG) do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear. As amostras foram dispostas em mesa giratória localizada ao redor da fonte de Co⁶⁰, com distância à fonte mediante às doses empregadas de 2,5kGy, 5kGy, 7,5kGy e 10,0kGy, proporcionando a irradiação simultânea de todas as amostras, com tempo de exposição de 25 min, 50 min, 75 min e 100 min, respectivamente a cada dose. Para a otimização do processo, utilizou-se a taxa de dose 6,0 kGy/hora. O tempo de exposição (dose/distância) para se obter cada uma das doses médias absorvidas foi calculado levando-se em consideração a fonte, sendo todo o controle realizado automaticamente pelo próprio irradiador. Foram mantidas condições de temperatura ambiente, $\pm 25^{\circ}\text{C}$, antes, durante e após o processo de irradiação.

Avaliação Micológica

Isolamento e quantificação dos fungos presentes no arroz

Após o processo de irradiação, as amostras de arroz branco polido foram conduzidas ao Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitopatologia e ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos, localizados na Universidade Federal de Lavras (UFLA), onde se procedeu ao plaqueamento dos grãos e à contagem fúngica, por meio de dois diferentes métodos descritos a seguir.

Blotter Test

Para o isolamento e a contagem fúngica pelo *Blotter Test*¹³, foram analisados, sem desinfecção, 200

grãos de arroz branco polido por amostra, em duas repetições com 100 grãos cada (50 grãos/placa de Petri), conforme Samson et al¹⁷.

O plaqueamento foi realizado em placas de Petri de 15 cm de diâmetro, contendo três papéis de filtro previamente esterilizados, umedecidos em água destilada esterilizada e acrescidos com 5 mL de ágar água 0,5%. Logo após este procedimento, as amostras foram conduzidas para a câmara de incubação a 25°C, onde permaneceram de cinco a sete dias. Após o período de incubação, cada placa foi colocada debaixo do microscópio estereoscópico para contagem e identificação macroscópica dos gêneros fúngicos presentes nos grãos. Os resultados foram expressos em percentagem de grãos contaminados.

Plaqueamento direto

Para o isolamento e a contagem dos fungos por meio do plaqueamento direto¹⁸, foram utilizados 100 grãos de arroz branco polido por amostra¹⁷, plaqueados em placas de Petri (50 grãos/placa de Petri) contendo o meio de cultura DRBC (ágar dicloran rosa de bengala cloranfenicol). Logo após esse procedimento, as amostras foram incubadas a 25°C, permanecendo de cinco a sete dias. Após o período de incubação, cada placa foi colocada debaixo do microscópio estereoscópico para contagem e identificação macroscópica dos gêneros fúngicos presentes nos grãos. Os resultados foram expressos em percentagem de grãos contaminados.

Delineamento experimental e análise dos resultados

O delineamento experimental utilizado nesta pesquisa ocorreu em blocos casualizados (DBC), sendo: tratamentos = doses de irradiação investigadas (0kGy, 2,5kGy, 5,0kGy, 7,5 kGy e 10 kGy); blocos = as seis diferentes amostras de arroz branco polido; e variáveis respostas, a incidência de fungos.

Para a análise dos resultados, considerou-se a percentagem média de fungos presentes nos grãos de arroz branco polido, para cada dose de irradiação gama (Co⁶⁰) investigada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A percentagem média (%) de gêneros fúngicos presentes nos grãos de arroz branco polido, de acordo com dois métodos de detecção utilizados na pesquisa, é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Percentagem média (%) de gêneros fúngicos presentes nos grãos de arroz branco polido (seis amostras), determinados pelo método do plaqueamento direto e *Blotter Test*

Método	Amostras*	Percentagem média (%) de gêneros fúngicos				
		<i>Fusarium</i> sp	<i>Trichoderma</i> sp	<i>Aspergillus</i> sp	<i>Penicillium</i> sp	<i>Cladosporium</i> sp
1	1	4,5	0,0	1,5	10,0	0,5
1	2	1,0	2,0	6,0	2,5	0,0
1	3	0,5	0,0	15,0	10,0	0,0
1	4	1,0	2,5	2,0	4,0	0,0
1	5	2,0	0,0	4,0	4,5	0,0
1	6	0,0	3,0	5,0	0,0	0,0
Média	-	1,5	1,2	5,6	5,2	0,1
2	1	4,5	0,0	11,0	90,0	4,0
2	2	1,0	1,5	17,0	13,0	4,0
2	3	0,5	0,0	18,0	10,0	3,0
2	4	2,0	2,5	5,0	34,0	2,0
2	5	2,0	0,0	4,0	52,0	1,0
2	6	2,0	0,0	24,0	8,0	1,0
Média	-	2,0	0,67	13,2	34,5	2,5

*1 - Plaqueamento direto (média de 100 grãos); 2 - *Blotter Test* (média de 200 grãos)

Os gêneros fúngicos presentes nas amostras de arroz sob investigação foram: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium* e *Trichoderma*. Contudo, o *Penicillium* sp. e o *Aspergillus* sp. foram os gêneros predominantes nas amostras de arroz branco polido, com incidência de 5,2% e 5,6% no plaqueamento direto e 34,5% e 5,6% no *Blotter Test*, respectivamente. A presença dominante desses gêneros no arroz também foi observada por Tonon et al¹⁸, Lima et al¹⁹, Nunes²⁰, Hoeltz²¹ e Carvalho²².

Comparativamente às metodologias utilizadas, o *Blotter Test* possibilitou maior contagem dos gêneros fúngicos presentes no arroz branco polido. Este fato pode estar relacionado com a utilização de papéis de filtro embebidos com água no *Blotter Test*, o que poderia ter possibilitado maior disponibilidade de água livre, fator favorável para o crescimento e o desenvolvimento fúngico. Outra hipótese seria o fato de o escasso conteúdo de substrato do meio de cultura utilizado ter ocasionado um estresse por falta de nutrientes, induzindo um aumento da reprodução de fungos mais resistentes em prol da sobrevivência da espécie. Segundo Castelvechchi²³ os fungos crescem e proliferam quando possuem condições favoráveis

ou desfavoráveis, neste último caso, o estresse extenuante permite seleção natural de espécies mais resistentes que não terão competidores e por isso proliferam.

O efeito das doses de irradiação gama no controle fúngico nos grãos de arroz branco polido é referenciado na Tabela 2.

O *Aspergillus* sp., gênero mais incidente nas amostras de arroz branco polido, indiferente do método de detecção, foi substancialmente eliminado ao longo das doses de irradiação gama.

O gênero *Penicillium*, detectado em todas as seis amostras de arroz branco polido analisadas pelo *Blotter Test*, foi completamente eliminado em cinco amostras com 2,5kGy e, em uma delas, com 5kGy. Pelo plaqueamento direto, as seis amostras de arroz contaminadas apresentaram-se livres deste gênero com a dose de 2,5kGy.

A incidência de *Fusarium* spp., detectado em cinco amostras de arroz branco polido por meio do plaqueamento direto, foi nula com a utilização da dose 2,5kGy. Pelo *Blotter Test*, das seis amostras de arroz contaminadas, três apresentaram ausência deste gênero pela exposição a 2,5kGy e as outras três, com a dose 5kGy.

Tabela 2. Percentagem média (%) de gêneros fúngicos presentes nos grãos de arroz branco polido irradiados com 0kGy, 2,5kGy, 5kGy, 7,5kGy e 10kGy, segundo os métodos de detecção *Blotter Test* e plaqueamento direto

Gêneros fúngicos	Amostras (arroz)	Percentagem média (%) de gêneros fúngicos									
		Doses de irradiação (kGy)/método de detecção*									
		0,0		2,5		5,0		7,5		10,0	
		1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
<i>Aspergillus sp.</i>	1	1,5	11,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Aspergillus sp.</i>	2	6,0	17,0	1,0	0,5	0,0	0,5	1,0	0,5	1,0	0,0
<i>Aspergillus sp.</i>	3	15,0	18,0	0,0	1,0	11,0	0,5	0,0	0,0	3,0	0,0
<i>Aspergillus sp.</i>	4	2,0	5,0	1,0	0,5	0,0	0,5	1,0	0,5	0,0	0,0
<i>Aspergillus sp.</i>	5	4,0	4,0	0,0	3,5	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0
<i>Aspergillus sp.</i>	6	5,0	24,0	0,0	0,5	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Penicillium sp.</i>	1	10,0	90,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Penicillium sp.</i>	2	2,5	13,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Penicillium sp.</i>	3	10,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Penicillium sp.</i>	4	4,0	34,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0	0,0	0,0
<i>Penicillium sp.</i>	5	4,5	52,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Penicillium spp.</i>	6	0,0	8,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Fusarium spp.</i>	1	4,5	4,5	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Fusarium spp.</i>	2	1,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Fusarium sp.</i>	3	0,5	0,5	0,0	0,0	11,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Fusarium sp.</i>	4	1,0	2,0	0,0	1,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Fusarium sp.</i>	5	2,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Fusarium sp.</i>	6	0,0	2,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	1,5	0,0	0,0
<i>Trichoderma sp.</i>	1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Trichoderma sp.</i>	2	2,0	1,5	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0	0,0	1,0	0,0
<i>Trichoderma sp.</i>	3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0
<i>Trichoderma sp.</i>	4	2,5	2,5	1,0	0,5	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Trichoderma sp.</i>	5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Trichoderma sp.</i>	6	3,0	0,0	1,0	0,0	2,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0
<i>Cladosporium sp.</i>	1	0,5	4,0	0,0	0,5	0,0	0,5	0,0	0,5	0,0	0,0
<i>Cladosporium sp.</i>	2	0,0	4,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Cladosporium sp.</i>	3	0,0	3,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Cladosporium sp.</i>	4	0,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Cladosporium sp.</i>	5	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Cladosporium sp.</i>	6	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

*1 - Plaqueamento direto (média de 100 grãos); 2 - *Blotter Test* (média de 200 grãos)

O *Cladosporium* sp., presente em apenas uma amostra de arroz branco polido pelo plaqueamento direto, foi completamente eliminado com a utilização da dose 2,5kGy. No *Blotter Test*, este gênero, detectado nas seis amostras de arroz branco polido, foi eliminado em cinco delas com a utilização de 2,5kGy e em uma, com a exposição a 10kGy.

O gênero *Trichoderma*, presente naturalmente em três amostras de arroz branco polido, segundo o plaqueamento direto, e em uma amostra pelo *Blotter Test*, foi reduzido ou até mesmo completamente eliminado com o emprego de 2,5kGy.

Quanto às doses de irradiação utilizadas na descontaminação dos alimentos, autores sugerem que doses entre 5kGy a 10kGy promovem a completa eliminação de fungos toxigênicos em grãos de café, amendoim e algumas commodities²⁴. Os efeitos nocivos da irradiação sobre os micro-organismos dependem de alguns fatores, tais como a dose total de radiação absorvida, o tamanho e o tipo de micro-organismo envolvido, além do intervalo de tempo de recepção da dose²⁵.

A incidência de fungos, mesmo após exposição a altas doses de irradiação gama, sugere que os mesmos podem apresentar algum mecanismo de resistência a este tratamento ou, até mesmo, colocar em dúvida a vida útil da fonte de Co⁶⁰, taxa de dose utilizada no presente estudo, dentre outras possíveis variáveis desta técnica.

Recentemente, espécies de fungos chamados de radiotróficos foram descobertos vivendo no interior e em torno do reator nuclear de Chernobyl, na Ucrânia, célebre pelo acidente ocorrido na década de 1980. De acordo com Dadachova et al²⁶, a resistência destas espécies à irradiação pode estar relacionada à presença de melanina.

Estudo realizado por Castelvechi²³ mostrou que três fungos melanizados, *Cladosporium sphaerospermum*, *Wangiella dermatitidis* e *Cryptococcus neoformans*, aumentaram sua biomassa e acumularam acetato mais rapidamente quando expostos à irradiação, sugerindo que a irradiação pode alterar as propriedades eletrônicas da melanina, de forma a transformar o pigmento em transdutor de energia utilizada para o crescimento e a sobrevivência das espécies.

Embora a legislação vigente do Ministério da Saúde não estabeleça limites de fungos para o arroz, o gerenciamento desse tipo de contaminação é muito importante. Dessa forma, apesar do *Blotter Test* não ser utilizado em análise de alimentos, ele apresentou maior poder de detecção dos fungos do que o plaqueamento

direto. E isso, do ponto de vista de segurança alimentar, deve ser considerado, uma vez que poderá permear um consumo mais seguro dos alimentos.

CONCLUSÃO

Indiferentemente dos métodos de detecção, os gêneros fúngicos detectados na amostras de arroz branco polido foram de *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium* e *Trichoderma*.

A irradiação gama (Co⁶⁰) diminuiu consideravelmente o número de grãos de arroz branco polido contaminados: 96,7%, segundo metodologia do plaqueamento direto e até 100% pelo *Blotter Test*.

O *Blotter Test* possibilitou maior contagem dos gêneros fúngicos presentes no arroz branco polido, constando-se que o método de detecção escolhido pode interferir na quantificação fúngica presente nesse cereal.

Sugere-se em próximos estudos utilizar paralelamente o DG18 (Agar Dicloran 18% Glicerol), recomendado para alimentos com atividade de água menor que 0,95 e comparação dos resultados.

AGRADECIMENTO

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de mestrado.

REFERÊNCIAS

1. Gourama H, Bullerman LB. Detection of molds in food and feeds: potential rapid and selective methods. *J Food Prot*. 1995;58(12):1389-94.
2. Bennet GA, Richard JL. Liquid chromatographic method for analysis of the naphthalene dicarboxialdehyde derivative of fumonisins. *J Assoc Offic Anal Chem*. 1994; 77(2):501-6.
3. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. *Microorganismos de los alimentos*. 2 ed. Zaragoza: Acribia; 2000.
4. American Public Health Association. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4 ed. Washington: APHA; 2001.
5. Santos AB, Stone LF, Vieira NR. *A cultura do arroz no Brasil*. 2ed. Santo Antonio de Goiás: EMBRAPA Arroz e Feijão; 2006.

6. Meirelles PG, Biazon L, Ono MA, Hirooka EY, Ono EYS. Imunoensaios: uma alternativa para a detecção de fungos toxigênicos em alimentos. *Semina: Ciências Agrárias*. 2006;27(4):617-28.
7. Cousin MA, Dufrenne J, Rombouts FM, Notermans S. Immunological detection of Botrytis and Monascus species in food. *Food Microbiol*. 1990;7:227-35.
8. Beuchat LR. Media for detecting and enumerating yeasts and moulds. *Int J Food Microbiol*. 1992;17:145-58.
9. Skaar I, Stewing H. Malt-Yeast Extract-Sucrose Agar: A suitable medium to enumeration and isolation of fungi from silages. *Appl Environ Microbiol*. 1996;62:3614-9.
10. Bragulat MR, Abarca ML, Castella G, Cabañes FJ. Dyes as fungal inhibitors: effects on colony enumeration. *J Appl Bacteriol*. 1995;79:578-82.
11. King AD, Hocking AD, Pitt JL. Dichloran rose bengal medium for enumeration and isolation of molds from foods. *Appl Environ Microbiol*. 1979;37:959-64.
12. Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC, Filtenborg O. Methods for the detection and isolation of food-borne fungi. In: Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC, Filtenborg O. *Introduction to food-borne fungi*. 5ed. CBS: The Netherlands; 1996.
13. Neergaard P. *Seed pathology*. v.1. London: The Macmillan Press; 1983.
14. Lucca Filho OA. Metodologia dos testes de sanidade de sementes. In: Soave J, Wetzell MMVS. *Patologia de Sementes*. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 276-98.
15. Tanaka MAS. Recentes avanços no desenvolvimento de métodos de detecção de fungos em sementes, no Brasil. *Informativo Abrates*. 2001;11(1):24-31.
16. Pitt JI, Hocking AD. *Fungi and food spoilage*. Weimar: Blackie Academic & Professional; 1999.
17. Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC, Filtenborg O. *Introduction to food and air-borne fungi*. 6ed. Baarn: CBS; 2000.
18. Tonon SA, Marucci RS, Jerke G, Garcia A. Mycoflora of paddy and milled rice produced in the region of Northeastern Argentina and Southern Paraguay. *Int J Food Microbiol*. 1997;37(213):231-5.
19. Lima CAP, Orsi RB, Dilkin P, Corrêa B. Mycoflora and aflatoxigenic in derivatives of milled rice. *Cienc Tecnol Aliment*. 2000;20(1):7-39.
20. Nunes IL. *Micotoxinas, micoflora e seu potencial toxigênico em arroz destinado ao consumo humano*. [dissertação de Mestrado]. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2001. 95pp.
21. Hoeltz M. *Estudo da influência de manejos pós-colheita na incidência de fungos e micotoxinas no arroz (Oryza sativa L.)*. [dissertação de Mestrado]. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2005. 77pp.
22. Carvalho RA. *Incidência de fungos e aflatoxinas em arroz (Oryza sativa L.)* [dissertação de Mestrado]. Lavras (MG): Universidade Federal de Lavras; 2008. 55pp.
23. Castelvechi D. Dark power: pigment seems to put radiation to good use. *Sci News*. 2007;171(21):235.
24. Rodrigues JM, Garzón ES. Control mediante radiaciones gamma de flora fungica presente en alimentos de consumo humano y animal. *Alimentaria: Madrid*. 1993; 95:115-17.
25. Urbain WM. Biological effects of ionizing radiation. In: *Food irradiation*. Orlando: Academic; 1986. p 83-117.
26. Dadachova E, Bryan RA, Huang X, Moadel T, Schweitzer AD, Aisen P et al. Ionizing radiation changes the electronic properties of melanin and enhances the growth of melanized fungi. *Cr Rev Food Sci Nut*. 2007;30(6):403-39.

Atividade do *Lactobacillus plantarum* na preservação da anchoita (*Engraulis anchoita*) fermentada

Activity of *Lactobacillus plantarum* on the fermented anchoita (*Engraulis anchoita*) preservation

RIALA6/1278

Nádia CARBONERA*, Milton Luiz Pinho ESPÍRITO SANTO

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

Recebido: 05.04.2010 - Aceito para publicação: 20.05.2010

RESUMO

A anchoita (*Engraulis anchoita*) foi utilizada para a elaboração de um produto fermentado com qualidade sensorial e segurança do alimento. A mistura (pescado - NaCl - glicose) foi empregada para avaliar os fatores que aceleram a fermentação láctica, o decréscimo do pH e a multiplicação das bactérias lácticas, com redução dos micro-organismos deterioradores. A contagem inicial de bactérias aeróbias viáveis foi de 7,1 Log UFC g⁻¹ e seu aumento ocorreu até o 7º dia de fermentação; posteriormente, houve redução gradual até o final do processo (28º dia) para 6,2 Log UFC g⁻¹ quando foram adicionados NaCl a 1,5% e glicose a 6,0%. As bactérias formadoras de ácidos predominaram sobre as deterioradoras durante todo o período de fermentação em um ciclo logarítmico. A glicose foi fermentada rapidamente, mas a redução do pH (3,9) foi lenta para o pescado suplementado com 6,0% de glicose e 1,5% de NaCl. A acidez titulável (% ácido láctico), após 28 dias de fermentação, atingiu 3,7% e 3,4% quando foram adicionados 6,0% e 4,0% de glicose. A inoculação do *Lactobacillus plantarum* manteve a qualidade microbiológica do produto; as bactérias deterioradoras se reduziram significativamente.

Palavras-chave. pescado fermentado, anchoita, bactérias lácticas, *Lactobacillus plantarum*.

ABSTRACT

Anchoita (*Engraulis anchoita*) was used to prepare a fermented product with sensorial quality and food safety. A mixture (fish, NaCl, glucose) was employed to evaluate the factors which help to speed up the lactic fermentation, pH decrease and lactic bacteria multiplication, and reducing the deteriorant microorganisms. At first, the viable aerobic bacteria counts were 7.1 Log CFU g⁻¹; thereafter an increase in counting was observed until the 7th day of fermentation which gradually decreased to 6.2 Log CFU g⁻¹ until the end of the process (28th day) when 1.5% NaCl and 6.0% glucose were added. The lactic acid bacteria predominated over the deteriorant microorganisms during the whole fermentation period at one logarithmic cycle. The glucose was quickly fermented, although the pH decreased (3.9) slowly for the fish supplemented with 6% glucose and 1.5% NaCl. The total titratable acidity (% lactic acid) after 28 days of fermentation came to 3.7% and 3.4%, when 6.0% and 4% of glucose were added. The inoculation of *Lactobacillus plantarum* maintained the microbiological quality of the product; the deteriorant bacteria decreased significantly.

Key words. fermented fish, anchoita, lactic bacteria, *Lactobacillus plantarum*.

INTRODUÇÃO

Um fator essencial e limitante na utilização do pescado para o consumo é a sua extrema perecibilidade aliada a processos autolíticos oriundos de atividades enzimáticas e bacterianas desenvolvidas durante o processamento e o armazenamento¹. Abre-se, então, a necessidade de se desenvolver alternativas de conservação para que, aliadas às tecnologias existentes, seja possível disponibilizar para população alimentos com qualidade e segurança alimentar sob o ponto de vista microbiológico e toxicológico².

A introdução da fermentação anaeróbica, associada às bactérias lácticas, é capaz de interromper temporariamente ou definitivamente os processos bioquímicos oxidativos e a deterioração microbiana³.

Bactérias lácticas constituem um grupo de microorganismos amplamente distribuídos na natureza, produtores de uma variedade de compostos antimicrobianos, incluindo: ácidos orgânicos, diacetil, peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, álcool, aldeído e bacteriocinas. Todos esses compostos podem contribuir para a inibição de bactérias deterioradoras e patogênicas presentes nos alimentos^{3,4,5}.

Os cultivos iniciadores produtores de ácido láctico são fundamentais na produção de alimentos cárneos fermentados. A partir de carboidratos presentes ou adicionados na massa cárnea, essas culturas produzem ácido láctico, com conseqüente redução do pH, aumento da acidez titulável e solubilização proteica⁶.

As proteínas do pescado, quando comparadas com as de outros animais, apresentam conservação quase sempre acompanhada de difícil contenção das alterações deterioradoras⁷. Entretanto, quando essas transformações são controladas passam a ser benéficas produzindo um *flavour* apropriado, mascarando o sabor indesejável de algumas espécies e aumentando a aceitabilidade de outras⁸.

Na América do Sul, países como Peru, Chile e Argentina desenvolveram fermentações de anchovetas (*Pomatomus saltator*), nas quais os peixes são misturados com NaCl na proporção de 30% e processados por fermentações que podem durar até 4 meses⁹. É apropriado considerar que culturas iniciadoras poderão ser incluídas na elaboração de novos produtos fermentados a partir de outras espécies de pescado. A anchoita salgada maturada de forma convencional ou produzida com a adição de cultivos iniciadores é apenas um dos exemplos destas variáveis¹⁰.

A anchoita (*Engraulis anchoita*) é uma espécie alternativa, oriunda de um estoque virgem na costa brasileira com possibilidade de uma exploração sustentável.

Embora uma grande biomassa esteja disponível de forma sazonal, os estoques desta espécie são subutilizados como recurso pesqueiro. No entanto, este recurso poderá tornar-se uma alternativa frente ao esgotamento da maioria das capturas tradicionais da região^{11,12,13}.

A importância da utilização desta espécie como matéria-prima se prende ao fato de que, no Brasil, é um recurso ainda não utilizado para o consumo humano. Ao mesmo tempo, favorece o estudo para a obtenção de um produto pouco difundido e não processado industrialmente de forma significativa¹⁴.

Assim, no Brasil, deve-se constituir uma tendência, a elaboração de produtos alternativos com estas espécies. Neste contexto, iniciativas para a abertura de novos mercados, principalmente o interno, favoreceriam o desenvolvimento de produtos derivados deste pelágico¹⁵.

Este trabalho avaliou a atividade do *Lactobacillus plantarum* e o seu efeito na fermentação da anchoita, com particular referência para o seu antagonismo em relação às bactérias deterioradoras envolvidas neste processamento.

MATERIAL E MÉTODOS

Matéria-prima

O estudo foi desenvolvido utilizando a anchoita (*Engraulis anchoita*) capturada pelo navio oceanográfico Atlântico Sul pertencente à Universidade Federal do Rio Grande/RS, Brasil. O pescado foi mantido sob condições adequadas com gelo em escamas a 0°C até o momento de ser transferido para o seu processamento. Para o desenvolvimento dos experimentos, não foi levado em consideração fatores fisiológicos e diferenças anatômicas relacionadas com a espécie. Houve o cuidado somente na escolha de exemplares adultos com tamanho superior a 15 cm.

Cultivo iniciador

O cultivo iniciador utilizado foi a cepa *Lactobacillus plantarum* adquirida do laboratório de microbiologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo - FCF/USP, Brasil.

Ativação e preparação do cultivo iniciador

O inóculo utilizado como cultivo iniciador foi obtido a partir da cepa do *L. plantarum* reativada em caldo MRS com incubação a 30°C durante 18 horas. A seguir,

foi executada a ressuspensão de uma alíquota de 5mL em 200mL do mesmo caldo e novamente incubada a 30°C por 12 horas. Posteriormente ao desenvolvimento da cultura, porções de 10 mL equivalentes a 10^8 UFC mL⁻¹ foram transferidas para as cubas de fermentação¹⁶.

Curva de crescimento do *L. plantarum*

A fermentação do cultivo iniciador foi monitorada durante 30 horas a 30°C. As amostras foram coletadas em frascos estéreis a cada 2 horas. Uma alíquota de 10 mL de cada amostra foi utilizada para a determinação da concentração da cultura. Várias diluições seriadas foram executadas utilizando água peptonada 0,1% e semeadas em ágar MRS, com incubação a 30°C, por 48 horas. Concomitantemente, alíquotas de 10 mL foram utilizadas para a determinação da concentração celular do inóculo através de espectrofotometria a 520 nm. Todas as alíquotas utilizadas para as leituras de absorbância foram centrifugadas a 9,77 x g/10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 3 mL de água peptonada 1% adicionada de 3 mL de solução de EDTA 1% e alcalinizada com NaOH 10M¹⁷.

Fermentação da anchoita

O pescado, após o recebimento, foi inspecionado, selecionado e lavado em lavador rotativo. Posteriormente, foi descabeçado, eviscerado, novamente lavado e pesado. Os tratamentos foram desenvolvidos de forma independente, variando-se apenas um dos parâmetros operacionais (cloreto de sódio ou glicose). Os experimentos foram executados utilizando proporções equivalentes a 1,0 e 1,5% NaCl e 4,0 e 6,0 glicose p/p em relação ao pescado eviscerado a ser fermentado. Em todos os tratamentos foram adicionados inóculos de *L. plantarum* correspondentes a $8,0 \text{ Log}_{10} \text{ UFC.mL}^{-1}$. As anchoitas foram salgadas previamente através de uma salga seca durante 24 horas a 4°C e posteriormente fermentadas a $23 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 28 dias.

Avaliações microbiológicas

Alíquotas de 25 g de amostra, incluindo o controle, foram coletadas durante 7, 14, 21 e 28 dias, homogeneizadas com 225 mL de água peptonada 0,1% e diluídas serialmente em escala decimal. A enumeração das bactérias lácticas foi realizada pelo método de

plaqueamento em profundidade em ágar MRS, utilizando as placas invertidas e foram incubadas a 30°C por 24 horas¹⁸. A contagem de micro-organismos aeróbios viáveis foi realizada pelo método do plaqueamento em profundidade em ágar de contagem *Plate Count Agar*. Após a inoculação e solidificação do meio, as placas foram invertidas e incubadas a 37°C por 48 horas¹⁸.

Análises físico-químicas

A medição do pH foi realizada homogeneizando-se 10 g de amostra com água destilada (1:10). O homogeneizado foi submetido ao eletrodo do pHmetro DM 22/Digimed por 2 minutos e procedido sua leitura¹⁹.

Usando o mesmo homogeneizado preparado para a determinação do pH, a acidez total titulável foi determinada por método titulométrico utilizando NaOH 0,1N. Os resultados foram expressos como ácido láctico (% p/p)¹⁹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Curva de crescimento do *L. plantarum*

A curva de crescimento e a densidade óptica (520 nm) do *L. plantarum* durante a fermentação são apresentadas na Figura 1. A fermentação com concentração média inicial de células viáveis equivalente a $4,93 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$ alcançou o seu crescimento máximo em 26 horas e foi de $11,6 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$. A densidade óptica, por equivalência, atingiu um valor máximo de 2,01 nm após este mesmo tempo de fermentação.

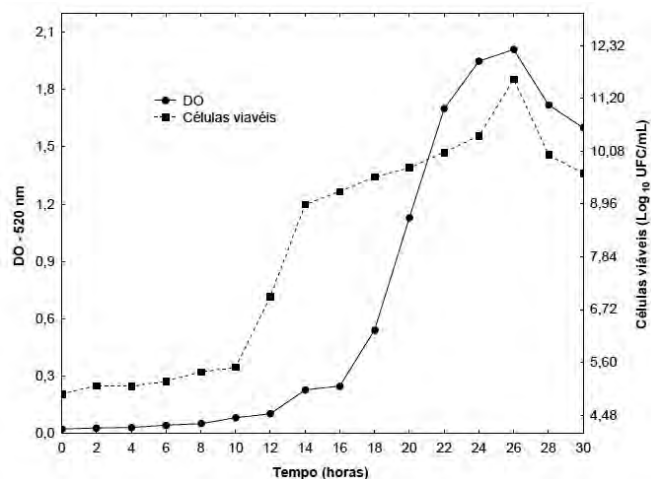


Figura 1. Curva de crescimento e densidade óptica a 520 nm do *L. plantarum*

Esses resultados são muito semelhantes aos encontrados por Campagno et al²⁰ que, ao utilizarem um meio de cultura adicionado com plasma suíno como fonte de nitrogênio, encontraram um crescimento máximo de 9,82 Log UFC.mL⁻¹ após 30 horas de fermentação. Outros trabalhos (González et al²¹) relacionados com processos fermentativos utilizando o *L. plantarum* LL441 cultivado em caldo MRS, com 5 horas de fermentação a 30°C, apresentaram uma variação relacionada com a densidade ótica de 0,4 a 1,4 nm. A leitura no espectrofotômetro foi realizada a 520 nm. Lewus et al²² estabeleceram uma curva de crescimento para *L. plantarum* BN utilizando caldo ATP (All Purpose Tween) a 30°C, com leitura espectrofotométrica a 660 nm. Após 4 horas de inoculação da cepa no caldo, a densidade ótica encontrava-se em 0,1 nm, passando a 1,1 nm com 20 horas de fermentação. Mazo²³ cultivou *L. plantarum* BN usando como substrato o melão de cana-de-açúcar por 24 horas e encontrou um crescimento máximo de 10,74 Log UFC.mL⁻¹ após 16 horas de fermentação. Utilizando uma leitura a 520 nm, o valor máximo para a absorbância foi 0,54 nm após 18 horas de fermentação.

Antagonismo bacteriano do *L. Plantarum*

A atividade antagônica do *L. plantarum* pode ser observada na Figura 2A e B, respectivamente. As bactérias lácticas apresentaram atividade inibidora sobre os micro-organismos deterioradores. Considerando a carga inicial dos micro-organismos aeróbios viáveis (10⁷ UFC g⁻¹), ocorreu um aumento desta contagem nos primeiros 7 dias de fermentação (10⁸ UFC g⁻¹) e, decresceu gradualmente até atingir 10⁶ UFC g⁻¹ no término do experimento (28 dias) para todas as amostras. A rapidez e a eficiência da fermentação foram monitoradas pela relação entre o decréscimo do pH e a enumeração das bactérias lácticas relacionadas com as bactérias deterioradoras. A queda do pH foi devida a produção de ácido láctico pelos lactobacilos, o que não descarta a possibilidade de produção de outros ácidos orgânicos formados por processos metabólicos oriunda de outros micro-organismos. De acordo com o ICMSF²⁴, nas fermentações anaeróbicas, muitos micro-organismos associados às infecções ou intoxicações alimentares não toleram a exclusão do oxigênio e a presença do CO₂. Ijong e Ohta²⁵ também não obtiveram resultados superiores aos encontrados neste trabalho referente às variações na inibição dos micro-organismos deterioradores. Estes pesquisadores, em trabalho semelhante com molho de pescado fermentado, utilizaram

glicose e NaCl em quantidades variáveis entre 100 g kg⁻¹ e 200 g kg⁻¹, respectivamente.

A contagem de bactérias lácticas a partir do sétimo dia e até o vigésimo oitavo dia de fermentação excedeu a contagem dos micro-organismos deterioradores de 1 Log UFC.g⁻¹. Assim, a relação de fermentação foi maior em todos os tratamentos se considerarmos a utilização de 6% glicose.

Vários autores relatam que a acidificação e as condições anaeróbicas durante a maturação de salsichas de pescado fermentado inibem o crescimento de micrococos²⁶.

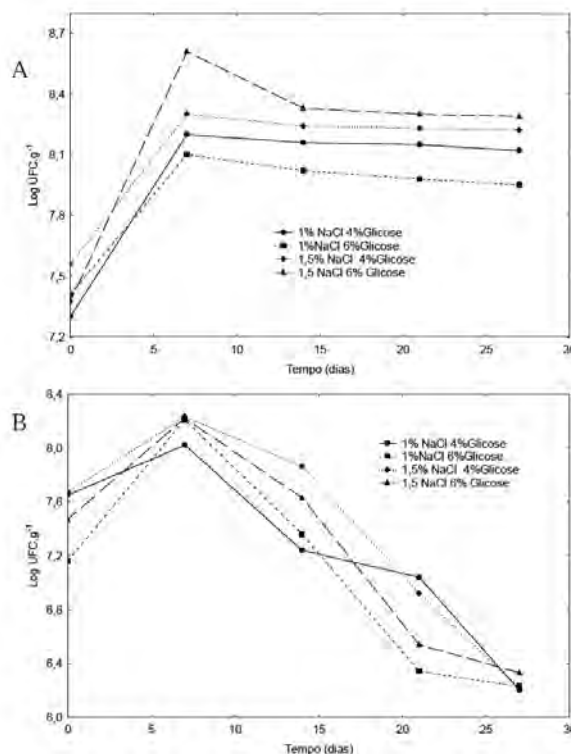


Figura 2. Variação das bactérias lácticas (A) e de micro-organismos aeróbios viáveis (B) durante o processo de fermentação da anchoita pelo *L. plantarum* envolvendo a adição de 1,5 e 2% NaCl e 4 e 6% glicose

Mah et al⁸ relataram que contagens de enterococos em produtos elaborados a base de pescado fermentado foram significativamente inferiores após a inclusão de cultivos iniciadores no processamento. Os resultados também foram semelhantes àqueles obtidos pela adição de cultivos iniciadores utilizando a fermentação de cavala²⁷.

Lee et al²⁸ também observaram que a inoculação de *L. plantarum* em embutido fermentado a base de pescado inibiu o crescimento de micro-organismos deterioradores.

Esta bactéria apresentou características homofermentativa e acidificante e com habilidade para a redução do pH.

Em trabalho semelhante, *L. plantarum* foi inoculado no músculo cominutado de pescado para produzir um produto fermentado. Durante a fermentação de 48 horas a 30°C, resultou uma rápida diminuição do pH e uma inibição de bactérias deterioradoras e patogênicas. Este estudo mostrou que a adição de uma cultura iniciadora melhorou substancialmente o sabor, a digestibilidade e o valor nutricional do alimento a base de pescado²⁹.

O NaCl tem um efeito negativo, ao criar condições desfavoráveis para o crescimento das bactérias lácticas, interferindo na redução do pH; justifica-se assim o emprego de baixas concentrações de NaCl nos diferentes tratamentos associados à fermentação da anchoita. No estudo desenvolvido por Morzel et al³⁰, o efeito negativo começou a ser observado na mais baixa concentração de NaCl (10 g kg⁻¹) e, se fosse considerada somente a otimização do pH relacionado com o crescimento bacteriano, os parâmetros mais adequados seriam equivalentes a 5 g kg⁻¹ glicose e temperatura de incubação de 20°C.

Avaliação do pH e acidez

As alterações do pH e acidez desenvolvidas durante a fermentação são apresentadas na Figura 3A e B, respectivamente. Na medida em que o processo se desenvolveu, houve redução do pH com tendência a estabilização entre 3,8 e 4,1 aos 28 dias de fermentação (Figura 2A). Este comportamento está relacionado com as concentrações de 4,0 e 6,0% glicose e 1,0 e 1,5% NaCl. O efeito da redução do pH sugere como causa a produção de ácido láctico, inibindo a multiplicação dos micro-organismos deterioradores ao mesmo tempo que permite a sequência do processo de fermentação. Os resultados apresentados indicam que a rápida fermentação do substrato foi executada da maneira como se esperava. Uma possível razão para a redução da velocidade da fermentação poderá ser representada pelas dificuldades criadas em função da capacidade tampão destes substratos proteínicos ou a incapacidade associada à adaptação e multiplicação das bactérias lácticas envolvidas frente ao carboidrato fermentescível disponibilizado. A grande capacidade tampão destes substratos atuando na faixa de pH entre 5,0 e 6,0 poderá permitir a deterioração do pescado antes que ocorra uma produção suficiente de ácido láctico para auxiliar no processo antagônico nas primeiras 24 horas de fermentação. Considerando o tratamento com

6% glicose, o aumento da concentração de NaCl de 1 para 1,5% reduziu muito pouco a relação de fermentação. Com o emprego de 1% NaCl, o pH decresceu para 4,2 após 7 dias e atingiu 3,8 com 28 dias de fermentação. Com a presença de 1,5%, o resultado mostrou baixa fermentação durante os 7 primeiros dias; o pH se manteve em 4,3 após 7 dias e atingiu 3,8 em 28 dias de fermentação. Com a utilização de 4% glicose, a relação de redução do pH foi mais sensível. No mesmo período, com a utilização de 1% NaCl, o pH atingiu 4,3 e 4,0, respectivamente. Com 1,5% NaCl, o pH atingiu 4,4 após 7 dias e 4,1 com 28 dias de fermentação.

Os resultados obtidos são compatíveis com aqueles encontrados na pesquisa de Morzel et al³⁰. Os autores caracterizam a avaliação de cultivos iniciadores na fermentação de filés de salmão (*Salmo salar*). Nesta pesquisa foram definidos parâmetros de fermentação para avaliar a dependência do crescimento de micro-organismos deterioradores e patogênicos relacionados com a redução do pH através da adição, sob várias concentrações, de sacarose, NaCl e NaNO₂ em filés submetidos a várias temperaturas de conservação. O resultado mostrou que o maior potencial para a produção de ácido láctico foi obtido com 5% de sacarose. O aumento da concentração deste carboidrato não mostrou uma melhora significativa no processo de acidificação. Por outro lado, na produção do *bakasang*, um tradicional molho de pescado fermentado consumido na Indonésia, quando submetido a um controle de pH através da adição de NaCl (10 e 20%) e glicose (1 e 10%), apresentou redução do pH em todos os tratamentos empregados. Nos experimentos em que a glicose foi adicionada, houve um grande decréscimo do pH, contrário àquelas sem a adição deste carboidrato. A maior redução ocorreu quando foram utilizados 5% glicose e 10% NaCl, explicado por um possível envolvimento de lactobacilos com habilidade para fermentar a glicose e produzir ácido láctico²⁵.

Se considerarmos os processos fermentativos, a acidez resultante corresponde a ácidos orgânicos não dissociados, os quais possuem uma acentuada atividade antimicrobiana. Os resultados mostram não somente que a acidez aumenta com o teor de glicose adicionada e o tempo de fermentação, mas também é possível observar que a relação de acidificação aumenta com a redução do NaCl utilizado no processo de fermentação. A Figura 3B apresenta a produção de ácido láctico durante a fermentação da anchoita, reproduzindo os tratamentos associados a 4 e 6% glicose e 1,0 e 1,5% NaCl (p/p). Para o tratamento correspondente a adição de 6% glicose e 1,5% NaCl, a

acidez, após 28 dias de fermentação, apresentou o máximo valor de 3,7%. Com 6% de glicose e equivalente teor salino, atingiu 3,4%. Assim que quando se agrega 1,5% glicose e 6% NaCl, o pH reduziu para 4,1 em 7 dias e para 3,8 em 28 dias. Reciprocamente, a acidez aumentou para 1,21 e 2,55%, respectivamente. Com 4% glicose e 2% NaCl, o pH reduziu para 4,0 em 7 dias e 3,8 em 28 dias. Por sua vez, a acidez aumentou para 1,77% (7 dias) e 2,76% (28 dias).

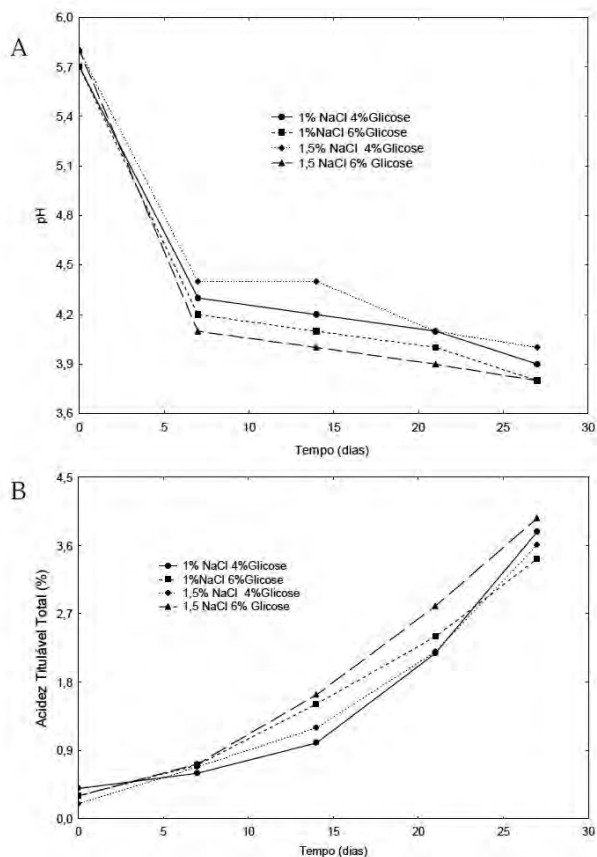


Figura 3. Variação do pH (A) e produção de ácido láctico (B) durante a fermentação da anchoita pelo *L. plantarum* relacionada com 4 e 6% glicose. O efeito foi comparado através da adição de 1 e 1,5% NaCl (p/p)

Trabalhos similares envolvendo fermentações lácticas mostram que o comportamento do pH e acidez não são diferentes. Riebroy et al⁷, avaliando a produção de ácido láctico como conservante de *Som-fug*, um pescado fermentado com adição de determinadas culturas iniciadoras, monitoraram a eficiência da fermentação pela relação do pH, acidez e balanço entre bactérias lácticas e deterioradoras, similar a este trabalho com anchoita fermentada. Os tratamentos aplicados, envolvendo cepas

comerciais (Lactostart) de *L. plantarum*, mostraram uma relação ótima de rebaixamento do pH com a adição de 5% sacarose (p/p). Anihouvi et al¹, examinando processos fermentativos com pescado e desenvolvido a temperatura ambiente (28°C a 30°C), utilizando bactérias lácticas empregadas em produtos lácteos, determinaram o final da fermentação quando a acidez (ácido láctico) atingiu 0,35% e o pH 7,0 após 10 dias de conservação. Com 4 dias de processamento, a acidez e o pH foram 0,33% e 7,0, respectivamente.

CONCLUSÃO

O estudo indica um grande efeito antagonístico do *L. plantarum* sobre a microbiota deterioradora no processo de fermentação da anchoita.

Com 28 dias de fermentação, a contagem das bactérias lácticas atingiu 10^8 UFC. g^{-1} , e a de bactérias deterioradoras apresentou uma redução de 1 ciclo logarítmico após um aumento desta microbiota nos primeiros 7 dias de fermentação. Este resultado mostra o efeito antagonístico preponderante desenvolvido pelo *L. plantarum*.

A fermentação da anchoita é passível de ser executada com o auxílio do *L. plantarum*. Durante este processo e com o auxílio da glicose (carboidrato fermentescível), esta cepa demonstrou uma significativa eficiência na redução do pH e aumento da acidez devido a produção de ácidos orgânicos e em maior expressão o láctico.

REFERÊNCIAS

1. Anihouvi VB, Sakyi-Dawson E, Ayernor GS, Hounhouigan JD. Microbiological changes in naturally fermented cassava fish (*Pseudotolithus* sp.) for lanhouin production. *Int J Food Microbiol*. 2007;116:287-91.
2. Schulz D, Bonelli RR, Batista CRV. Bacteriocinas e enzimas produzidas por *Bacillus* spp. para conservação e processamento de alimentos. *Alim Nutr*. 2005;16(4):403-11.
3. Muriana PM. Bacteriocins for control of *Listeria* spp. in food. *J. Food Prot. Supplement*. 1996;Suppl:54-63.
4. Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int J Food Microbiol*. 2001;71:1-20.
5. Bromberg R, Moreno I, Delboni RR, Cintra HC. Características da bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* ssp. *hordniae* CTC 484 e seu efeito sobre *Listeria monocytogenes* em carne bovina. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2006;26(1):135-44.

6. Yongjin H, Wenshui X, Xiaoyong L. Changes in biogenic amines in fermented silver carp sausages inoculated with mixed starter cultures. *Food Chem*. 2007; 104: 188-95.
7. Riebroy S, Benjakul S, Visessanguan W. Properties and acceptability of Som-fug, a Thai fermented fish mince, inoculated with lactic acid bacteria starters. *LWT*. 2008; 41: 569-80.
8. Mah JH, Hwang HJ. Inhibition of biogenic amine formation in a salted and fermented anchovy by *Staphylococcus xylosum* as a protective culture. *Food Contr*. 2009; 20:796-801.
9. Yeannes MI, Casales MR. Modifications in the chemical compounds and sensorial attributes of *Engraulis anchoita* fillet during marinating process. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2008;28(4): 798-803.
10. Jiang JJ, Zeng QX, Zhu ZW, Zhang LY. Chemical and sensory changes associated Yu-lu fermentation process – A traditional Chinese fish sauce. *Food Chem*. 2007;104:1629-34.
11. Garcia-Torchelsen L, Treptow RO, Porciúncula BD, Queiroz MI. Caracterização do odor da anchoita (*Engraulis anchoita*) armazenada em gelo e água do mar. *Alim Nutr*. 2008; 19(3): 249-57.
12. Haimovici M, Martin AS, Vieira PC. Distribuição e abundância de peixes teleósteos demersais sobre a plataforma continental do sul do Brasil. *Rev Bras Biol*. 1997; 56(1): 27-50.
13. Castello L, Castello JP. Anchovy stocks (*Engraulis anchoita*) and larval growth in the SW Atlantic. *Fish Res*. 2003; 59: 409-21.
14. Lima ID, Castello JP. Distribución y abundancia de *Engraulis anchoita* en la costa sur de Brasil. *Frente Marit*. 1994;15: 87-100.
15. Pájaro M. Alimentación de la anchoita argentina (*Engraulis anchoita*) Hubbs y Marini, 1935) (Pisces: Clupeiformes) durante la época reproductiva. *Rev Invest Des Pesq*. 2002;15:111-25.
16. De Martinis ECP, Franco BDGM. Inhibition of foodborne by bacteriocin-producing *Leuconostoc* sp and *Lactobacillus sake* isolated from “lingüiça frescal”. *Rev Microbiol*. 1997; 28(4):284-87.
17. Feltrin VP. Produção de *Lactobacillus plantarum* em meio de cultura à base de melão de cana-de-açúcar. [dissertação de mestrado]. Florianópolis, Santa Catarina: Universidade Federal de Santa Catarina; 1997.
18. American Public Health Association - APHA. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3ª ed. Washington; 1992.
19. Association of Official Analytical Chemists - AOAC. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemistry. 16th.ed. Washington; 1997.
20. Campagno PCB, Martins Fries LL, Terra NN, Santos BA, Furtado AS. Salame elaborado com *Lactobacillus plantarum* fermentado em meio de cultura de plasma suíno. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2007; 27(4):883-9.
21. González B, Arca P, Mayo B. Detection, purification, and partial characterization of plantaricin C, a bacteriocin produced by a *Lactobacillus plantarum* strain of dairy origin. *Appl Environ Microbiol*. 1994; 60:2158-63.
22. Lewus CB, Kaiser A, Montville TJ. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. *Appl Environ Microbiol*. 1991; 57:1683-88.
23. Mazo JZ. Detecção de bacteriocinas produzidas por *Lactobacillus plantarum* BN me melão de cana-de-açúcar sob fermentação submersa. [dissertação de mestrado]. Florianópolis, Santa Catarina: Universidade Federal de Santa Catarina; 1999.
24. International Commission on Microbiological Specifications for Foods - ICMSE. Gases as preservatives. *In: Food Microbiol Ecology*. New York: Academic Press Inc. 1980;1:170-192.
25. Ijong FG, Ohta Y. Physicochemical and microbiological changes associated with bakasang processing - A traditional Indonesian fermented fish sauce. *J Sci Food Agric*. 1996; 71(1): 69-74.
26. Aksu MI, Kaya M. Effect of usage *Urtica dioica* L. on microbiological properties of sucuk, a Turkish dry-fermented sausage. *Food Contr* 2004;15(8):591-595.
27. Yin LJ, Pan CL, Jiang ST. Effect of lactic acid bacterial fermentation on the characteristics of minced mackerel. *J Food Sci*. 2002; 67(2): 786-92.
28. Lee JY, Kim CJ, Kunz B. Identification of lactic acid bacteria isolated from kimchi and studies on their suitability for application as starter culture in the production of fermented sausages. *Meat Scien*. 2006; 72:437-45.
29. Hu Y, Xia W, Ge C. Characterization of fermented silver carp sausages inoculated with mixed starter culture. *LWT*. 2008;41: 730-38.
30. Morzel M, Fransen NG, Elke KA. Defined starter cultures used for fermentation of salmon fillets. *J Food Sci*. 1997; 62(6):1214-18.

Avaliação da qualidade microbiológica de alimentos prontos para consumo servidos em escolas atendidas pelo Programa Nacional de Alimentação Escolar

Microbial quality assessment of ready-to-eat foods served at schools supported by the National Scholar Food Supply Program

RIALA6/1279

Ryzia de Cassia Vieira CARDOSO^{1*}, Rogéria Comastri de Castro ALMEIDA¹, Aláise Gil GUIMARÃES², José Ângelo Wenceslau GÓES¹, Aisi Anne Carvalho SANTANA³, Sueli Alves da SILVA³, Perminio Oliveira VIDAL JÚNIOR³, Larissa Brito HUTTNER³, Karla Vila Nova de Araújo FIGUEIREDO⁴

*Endereço para correspondência: Escola de Nutrição, UFBA, Rua Araújo de Pinho nº32, Campus do Canela. CEP: 40.110-150, tel.: (71) 3283 7700. Salvador, Bahia, Brasil. E-mail: ryzia@ufba.br

¹Departamento de Ciências dos Alimentos, Escola de Nutrição, Universidade Federal da Bahia

²Departamento de Análises Bromatológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia

³Escola de Nutrição, Universidade Federal da Bahia

⁴Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia

Recebido: 25.05.2009 – Aceito para publicação: 09.05.2010

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica de alimentos prontos para o consumo, distribuídos em escolas atendidas pelo Programa Nacional de Alimentação Escolar, em Salvador-BA. Realizou-se um estudo transversal, com a participação de 83 escolas das redes estadual e municipal. Foram coletadas e analisadas 96 amostras quanto à contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos (CAM), estimativa do Número Mais Provável (NMP) de coliformes termotolerantes/ *Escherichia coli* e pesquisa de estafilococos coagulase-positiva (SCP). A CAM variou de <1,0 a 6,3 log UFC/g ou mL, valor médio de 3,2 log UFC/g ou mL; 10,8% das escolas apresentaram alimentos com contagens superiores a 5 log UFC/mL ou g. O NMP de coliformes termotolerantes variou de <0,47 a >3,38 log NMP/g ou mL, valor médio de 0,49 log NMP/g ou mL; 20,4% das escolas apresentaram amostras não-conformes, sendo 2,4% das amostras positivas para *E. coli*. SCP foi detectado nos alimentos de 26,5% das escolas. Os alimentos servidos na rede estadual apresentaram valores de contaminação por CAM e coliformes termotolerantes significativamente maiores ($p<0,05$) quando comparados aos alimentos fornecidos na rede municipal. Os resultados evidenciaram condições microbiológicas insatisfatórias dos alimentos, em parte expressiva das escolas investigadas, o que indica a necessidade de medidas corretivas.

Palavras-chave. alimentação escolar, qualidade microbiológica, higiene de alimentos, segurança alimentar.

ABSTRACT

This paper reports the microbiological quality of ready-to-eat foods served at schools sustained by the National Scholar Food Supply Program in Salvador (Bahia, Brazil). A cross-sectional study was undertaken in 83 municipal and state schools. Ninety-six food samples were collected and analyzed on mesophilic aerobic microorganisms counting (AMC), and the Most Probable Number (MPN) of thermotolerant coliforms/ *Escherichia coli* and the occurrence of coagulase-positive *Staphylococcus* (CPS) were estimated. The AMC ranged from <1.0 to 6.27 log CFU/g or mL, being the mean value of 3.2 log CFU/g or mL. Food products presenting microorganism counts over 5 log CFU/mL or g were found in 10.8% of investigated schools. Thermotolerant coliforms ranged from <0.47 to >3.38 log MPN/g or mL and a mean value of 0.49 log MPN/g or mL. The noncompliant food samples were found in 20.4% of schools, and *E. coli* was detected in 2.4% of those samples. CPS was found in food samples collected from 26.5% of schools. The food samples served at state schools showed significantly higher AMC and thermotolerant coliforms counting values ($p<0.05$) than those from municipal ones. Unsatisfactory microbiological quality in food products served at a substantial number of the investigated schools was evidenced.

Key words. school feeding, microbiological quality, food hygiene, food security.

INTRODUÇÃO

Um dos principais problemas de nutrição no Brasil é a insuficiência calórica, que afeta de forma grave grande parte a saúde da população. O quadro decorre não apenas da falta de orientação para a escolha de alimentos de qualidade nutricional, mas, sobretudo, da limitada quantidade de alimentos ingeridos, o que resulta em agravamento do estado nutricional e de saúde das pessoas. As crianças, em especial, são mais vulneráveis a essa adversidade, sendo por isto o público-alvo nas ações de atenção à saúde¹.

Criado em resposta a esse contexto, o Programa Nacional de Alimentação Escolar (PNAE) é o mais antigo programa social da área de segurança alimentar e nutricional do país e tem por finalidade oferecer refeições a pré-escolares e escolares das redes públicas de ensino, a alunos de creches públicas e filantrópicas e de escolas indígenas e quilombolas, de forma a contribuir para suplementar as necessidades nutricionais dos alunos por ele atendidos, reduzir o índice de evasão escolar, favorecer a formação de bons hábitos alimentares e estimular o aprendizado. Em 2008, o número de alunos assistidos pelo PNAE foi de 34,6 milhões, sendo investidos 1,49 bilhões de reais².

Por outro lado, ainda que os objetivos do PNAE sejam extremamente relevantes sob o ponto de vista nutricional, verifica-se que muitas das unidades de alimentação e nutrição, onde a alimentação escolar é preparada e distribuída, não apresentam condições adequadas para a realização das atividades de produção de refeições^{3,4,5,6}. Assim, deve-se observar a qualidade da alimentação escolar no que se refere não apenas aos aspectos nutricionais, mas também quanto à inocuidade, ou seja, o atendimento aos requisitos sanitários para proteção e promoção à saúde dos beneficiários.

Em ambientes educacionais, a produção da alimentação escolar deve considerar os riscos de alimentos veicularem micro-organismos patogênicos, associados a fatores como: grande número de refeições preparadas e servidas em condições operacionais impróprias, o longo tempo entre o preparo e a distribuição destas e a insuficiente qualificação das merendeiras, o que possibilita maiores chances de exposição dos alimentos a contaminações e de multiplicação microbiana⁶. Outros fatores que contribuem para a contaminação dos alimentos servidos incluem ausência de controle no binômio tempo e temperatura, que possibilita a sobrevivência e a multiplicação de micro-organismos patogênicos e deterioradores nas etapas de

cocção e de manutenção à quente e à frio; inobservância do uso de medidas higiênicas-sanitárias; manipuladores infectados ou com hábitos higiênicos insatisfatórios e uso de água não potável⁷.

Assim, na medida em que o PNAE destina-se principalmente ao atendimento de crianças, que muitas vezes não apresentam resposta imunológica totalmente desenvolvida, torna-se condição essencial o cumprimento de requisitos de higiene na produção da alimentação escolar⁶. Nas regiões Norte e Nordeste do país, consideradas as mais pobres e onde muitas vezes a merenda escolar contribui de modo decisivo para o aporte nutricional de elevado número de alunos, a segurança dos alimentos assume condição crítica, dada a possibilidade da única fonte de alimentação constituir também exposição para o desenvolvimento de doenças⁸.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica de alimentos prontos para consumo distribuídos em escolas atendidas pelo PNAE, na cidade de Salvador/Bahia, por meio da investigação de micro-organismos indicadores.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido a partir do estabelecimento de parcerias entre as Secretarias Municipal e Estadual de Educação, Vigilância Sanitária Municipal e a Universidade Federal da Bahia. Trata-se de um estudo transversal, de caráter descritivo e exploratório, que constitui parte do projeto "Apoio à produção de alimentos seguros em escolas públicas atendidas pelo Programa Nacional de Alimentação Escolar, em Salvador-BA" (CNPq 505733-20048), aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Maternidade Climério de Oliveira/UFBA.

A partir de cálculos para formação de amostra estratificada, tomando como base o conjunto de escolas estaduais (250) e municipais (359) e estabelecidos valor de alfa de 5% e precisão 0,10, participaram do estudo 83 escolas da cidade, sendo 34 estaduais e 49 municipais, das quais foram analisadas 96 amostras de refeições prontas para o consumo.

Em 70 escolas, as amostras constituíram preparações únicas ou formadas por *pool* de refeição pronta, enquanto em 13 casos procedeu-se a obtenção de duas amostras (preparação líquida – suco ou leite achocolatado e produto de panificação para acompanhamento – biscoito, pão ou bolo), o que resultou em número de amostras superior ao número de escolas

investigadas. Esta etapa do estudo foi conduzida entre março e dezembro de 2006.

As amostras da alimentação escolar foram obtidas em condições assépticas e transportadas ao Laboratório de Controle de Qualidade dos Alimentos da Escola de Nutrição – UFBA, respeitando-se o período máximo de quatro horas entre a coleta e o início da análise.

Isolamento, identificação e quantificação dos micro-organismos

Para a análise dos alimentos, 25g de cada amostra foram homogeneizados com 225 mL de solução salina peptonada e diluições decimais foram preparadas⁹.

A contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos (CAM) foi conduzida de acordo com Stevenson e Segner¹⁰. Coliformes termotolerantes foram investigados pela técnica do Número Mais Provável (NMP), de acordo com Silva et al¹¹, utilizando-se série de três tubos por diluição da amostra e a tabela de Hoskins. Tubos apresentando gás, a partir do caldo EC, foram inoculados por estrias em ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) para investigar a presença de *Escherichia coli*. Colônias com brilho metálico esverdeado foram confirmadas pelos testes bioquímicos do IMViC. A cepa de *E. coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle positivo. Estafilococos coagulase positiva (SCP) foram investigados de acordo com Lancette e Bennet¹², em ágar *Baird Parker* suplementado com solução salina de gema de ovo e telurito de potássio. Colônias com coloração negra e halos de lipase e/ou lecitinase foram selecionadas e submetidas ao teste da catalase e da coagulase. Para a verificação da presença da enzima coagulase foi utilizado o teste de aglutinação rápida em lâmina (Staphclin® Laborclin).

Interpretação dos resultados

Os resultados da estimativa do NMP de coliformes termotolerantes foram comparados com os padrões estabelecidos na Resolução RDC 12/01¹³. Considerando que a legislação atual não estipula padrões para a CAM, alimentos com contagem superior a 10⁵ UFC/g ou mL foram considerados impróprios para o consumo pelas crianças atendidas, limite este adotado para produtos considerados de baixo padrão higiênico¹⁴. Os alimentos que apresentaram SCP também foram considerados impróprios para o consumo devido a grande probabilidade de se tratar da espécie patogênica *Staphylococcus aureus*, que apresenta rápida coagulação

do plasma (método em lâmina) diferentemente do *S. hyicus* e *S. intermedius*.

Tratamento estatístico

Para o tratamento estatístico, adotou-se a análise descritiva para os resultados globais. Com vistas à avaliação entre a rede estadual e a municipal, utilizou-se o teste T de *Student* na comparação das médias de CAM e NMP e o teste de comparação de proporções (teste Z) para SCP, com nível de significância de 0,05; os *softwares* EPI-Info v.6.0 e SPSS v. 13 foram empregados nesses procedimentos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 encontram-se descritas as diferentes categorias de alimentos e preparações que compuseram a amostra, verificando-se grande quantidade de preparações que tiveram preparo prévio, com inclusão de etapa de aquecimento.

Tabela 1. Distribuição das amostras por categorias de alimentos

Categoria de alimentos	n	%
Preparações prontas à base de leite	23	24,0
Produtos de panificação	19	19,8
Preparações à base de caldos e sopas	14	14,6
Preparações prontas à base de cereais	13	13,5
Preparações prontas à base de carnes e aves	11	11,5
Sucos e refrescos	9	9,4
Preparações prontas à base de soja	4	4,2
Frutas <i>in natura</i>	2	2,1
Gelados comestíveis	1	1,0
Total	96	100,0

Para o conjunto de amostras, a CAM variou de <1,0 a 6,3 log UFC/g ou mL, (valor médio de 3,2 log UFC/g ou mL). Do total de escolas investigadas, em 10,8% observaram-se alimentos com contagens superiores a 10⁵ UFC/g ou mL.

Entre os alimentos que apresentaram as maiores contagens foram identificadas situações que indicaram alto grau de contaminação pós-processamento, como em mingaus, sopas, biscoitos e pão com manteiga, ou ainda a aquisição de produtos de procedência questionável, sem rotulagem adequada, sem data de validade, a exemplo do picolé.

Santana¹⁵, que também procedeu à contagem dos micro-organismos aeróbios mesófilos em alimentos servidos em escolas municipais de Salvador (sopa de macarrão com vegetais em lata e almôndegas em lata; salada de vegetais com macarrão ao molho de tomate; feijão com abóbora, frango ao molho de tomate e arroz branco), identificou preparações com contagens superiores a 10^5 UFC/g ou mL. Segundo a autora, essa investigação contribuiu para conhecer as condições higiênico-sanitárias nas escolas e sinalizar a necessidade de adoção de medidas corretivas.

As contagens de coliformes termotolerantes variaram de $< 0,47$ a $> 3,38$ log NMP/g ou mL (valor médio de $0,49$ log NMP/g ou mL). Ao comparar esses resultados com os padrões estabelecidos pela Resolução RDC 12/2001¹³, constatou-se que os alimentos de 20,4% das escolas estavam em desacordo com os padrões exigidos, além de ter sido confirmada a presença de *E. coli* em amostras de alimentos de duas escolas.

Cabe destacar, ainda, que grande parte dos alimentos submetidos a etapas de cocção servidos nas escolas de Salvador/BA, incluindo sopa, mingau, mungunzá, arroz doce, arroz e carne, dentre outras preparações, ultrapassaram os limites legais para coliformes termotolerantes. Esta constatação também indicou a ocorrência de falhas na produção das refeições, principalmente por recontaminação pós-processamento, o que se assemelha aos resultados descritos por Santana¹⁵.

No presente estudo, adicionalmente, observou-se coliformes termotolerantes em sucos reconstituídos, valor médio de $0,9$ log NMP/mL, fato que pode sinalizar a possibilidade de contaminação durante o preparo ou o uso de água e de polpa de frutas em desacordo com os padrões microbiológicos.

Os resultados são corroborados por estudos conduzidos por Façanha et al¹⁶ em Sobral-CE, e estudo em diferentes cidades de Goiás⁵, os quais reportaram contaminações posteriores à cocção de alimentos e também em sucos fornecidos na alimentação escolar. Em relação especificamente aos produtos cozidos, Rosa et al⁴ e Oliveira et al¹⁷ relataram inadequada conservação das preparações no período pós-cocção, uma vez que a maior

parte das unidades escolares pesquisadas não dispunham de equipamentos para conservação à quente, condição que favorece a multiplicação de micro-organismos sobreviventes e recontaminantes e é semelhante à realidade observada nas escolas avaliadas.

Em alimentos de 26,5% (22) das escolas, SCP foi identificado, sendo 15,6% (13) das identificações feitas em alimentos previamente submetidos à cocção, resultado que indicou o potencial de contaminação microbiana por manipulação inadequada, ressaltando que o homem constitui um dos principais reservatórios desse micro-organismo¹⁸.

Na medida em que o *S. aureus* ocupa a segunda posição entre os patógenos envolvidos em surtos no Brasil e o quarto lugar nos Estados Unidos, e que os ambientes escolares figuram em terceiro lugar entre os locais de ocorrência de surtos nesses países, os resultados disponíveis constituem motivo de preocupação para as autoridades de saúde pública^{19,20}.

Um surto de intoxicação estafilocócica envolvendo aproximadamente 1800 escolares da cidade de Birigui-SP, ocorrido em 1998, foi descrito por Michelin et al²¹. Segundo os autores, entre os componentes do cardápio, a farofa contendo farinhas de milho e de mandioca, ervilha, milho em conserva, linguiça toscana e mortadela, apresentou contagens superiores a $8,5 \times 10^7$ UFC/g de *S. aureus* coagulase positiva produtor de enterotoxina A.

Em atenção ao fato de muitas das crianças beneficiadas pelo PNAE serem carentes e não terem acesso a uma alimentação qualitativa e quantitativamente adequada, avalia-se como alto o risco de desenvolvimento de doenças veiculadas por alimentos contaminados e a gravidade do quadro clínico resultante destas doenças.

Em termos comparativos, a rede estadual de escolas apresentou pior atendimento aos padrões legais em relação à rede municipal (Figura 1), embora o número de unidades investigadas no primeiro grupo tenha sido bem menor. Para os alimentos identificados como fora do padrão, em ambos os grupos, observou-se um equilíbrio entre amostras processadas e não processadas termicamente, o que indicou a falta de cuidados higiênicos para as duas categorias de produto. Adicionalmente, foram identificadas diferenças significativas entre a rede estadual e municipal, pelo teste T, para CAM e coliformes termotolerantes ($p < 0,05$), o que confirmou o pior desempenho para o primeiro segmento. Para SCP não foi observada diferença significativa entre as redes.

Dado o desempenho inferior da rede estadual, associou-se uma possível influência do modelo de gestão e a capacidade de acompanhamento operacional do PNAE por técnico de nível superior: na rede municipal havia cinco nutricionistas para 359 escolas, enquanto a rede estadual dispunha de um nutricionista para 250 escolas da capital e mais de mil escolas distribuídas no interior do Estado.

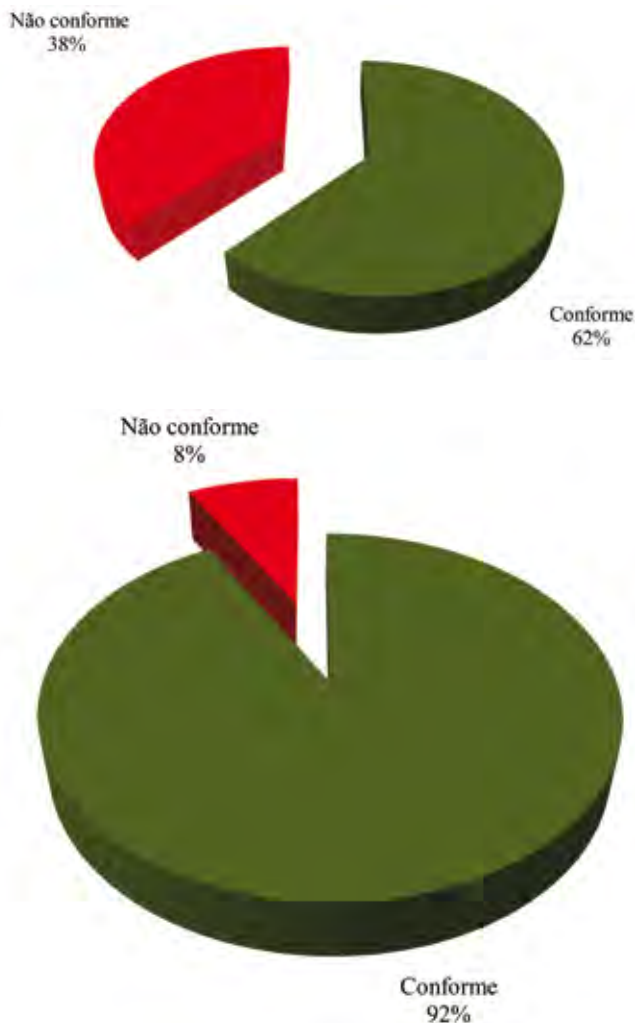


Figura 1. Distribuição das escolas atendidas pelo PNAE em Salvador/BA, quanto ao atendimento à Resolução RDC 12/01¹³

Pela análise dos resultados observa-se a necessidade de reforçar a adoção de princípios e normas de higiene e conservação de alimentos, maior comprometimento da Vigilância Sanitária e Epidemiológica, em um esforço conjunto para evitar ou minimizar a distribuição de alimentos com altos

índices de contaminação de natureza microbiológica aos escolares.

Ressalta-se que os resultados do presente estudo mostram coerência com aqueles observados em pesquisa conduzida pelos autores anteriormente²², relativa à avaliação das unidades de ensino mediante aplicação de *check-list*, em que 57% delas foram classificadas como insatisfatórias quanto ao atendimento aos requisitos sanitários estabelecidos pela Resolução RDC 216/04, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Ministério da Saúde.

CONCLUSÃO

A baixa qualidade microbiológica constatada nos alimentos servidos pelo PNAE, em parte considerável das escolas, sobretudo na rede estadual de ensino, indicou a existência de falhas na cadeia produtiva e de riscos de ocorrência de doenças veiculadas por esses alimentos.

Considerando que o público atendido pelo PNAE compreende grande coletividade e contempla um grupo especial, de reconhecida susceptibilidade a doenças, recomenda-se a implementação de intervenções para esse segmento da produção de alimentos, pautadas no atendimento às Boas Práticas de Produção e aos requisitos normativos pertinentes. Nessa perspectiva, torna-se essencial o esforço conjunto entre atores sociais do PNAE, dos órgãos de vigilância em saúde e da comunidade escolar para assegurar a inocuidade dos alimentos e promover a saúde das crianças atendidas.

REFERÊNCIAS

1. Fiúza TM, Ribeiro MTAM. Sensibilidade no diagnóstico da desnutrição protéico calórica realizado pelas equipes de saúde por meio do SIAB e de busca ativa de casos. *Rev Bras Med Fam Com*. 2007; 3(9):21-6.
2. Brasil. Ministério da Educação. Fundo Nacional de Desenvolvimento da Educação. Disponível em: <http://www.fnde.gov.br/home/index.jsp?arquivo=alimentacao_escolar.html> acesso em 05 de abril de 2009.
3. Piragine KO. Aspectos higiênicos sanitários do preparo da merenda escolar na rede estadual de ensino de Curitiba [dissertação de mestrado]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2005.

4. Rosa MS, Negreiros SRF, Seabra LMJ, Stamford TLM. Monitoramento de tempo e temperatura de distribuição de preparações à base de carne em escolas municipais de Natal (RN), Brasil. *Rev Nutr*. 2008;21(1):21-8.
5. Secretaria de Estado da Saúde de Goiás. Superintendência de Vigilância Sanitária/Universidade Federal de Goiás (UFG). Faculdade de Nutrição. Avaliação e monitoramento da qualidade dos alimentos oferecidos na Merenda Escolar – Goiás. Relatório Parcial. 2004. 19p.
6. Silva C, Germano MIS, Germano PMN. Condições higiênicas - sanitárias dos locais de preparação da merenda escolar, da rede estadual de Ensino em São Paulo, SP. *Hig Aliment*. 2003; 17(110):49-55.
7. Fortuna JL. Aspectos higiênicos-sanitários no preparo de carne bovina servida em refeições escolares de instituições municipais e estaduais, no estado do Rio de Janeiro. *Hig Aliment*. 2002; 14(95):23-33.
8. Weis B, Chaim NA, Belik W. Manual de Gestão Eficiente da Merenda Escolar. São Paulo (SP): Eskenazi Indústria Gráfica; 2004.
9. Midura TF, Bryant RG. Sampling plans, sample collection, shipment and preparation for analysis. In: Downes FP, Ito K, editors. *Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods*. Washington (DC): American Public Health Association; 2001.
10. Stevenson KE, Segner WP. Mesophilic aerobic sporeformers. In: Downes FP, Ito K, editors. *Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods*. Washington (DC): American Public Health Association; 2001.
11. Silva N, Junqueira VCB, Silveira NFA. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. São Paulo: Varela; 1997.
12. Lancette GA, Bennet RW. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Enterotoxins. In: Downes FP, Ito K, editors. *Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods*. Washington (DC): American Public Health Association; 2001.
13. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução de Diretoria Colegiada nº 12 de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=144>> acesso em 14 jul. 2002.
14. Gilbert RJ, Louvois J, Donovan T, Little C, Nye K, Ribeiro CD et al. Guidelines for the microbiological quality of some ready-to-eat foods sampled at the point of sale. *Comm Dis Publ Health*. 2000;3(3):164-7.
15. Santana NG. Avaliação do perfil higiênico - sanitário e adoção de Boas Práticas de Produção no preparo da merenda em escolas municipais de Salvador-Bahia [dissertação de mestrado]. Salvador: Universidade Federal da Bahia; 2004.
16. Façanha SHF, Ferreira NDL, Monte ALS, Pontes AR. Avaliação da garantia da qualidade higiênico-sanitária do programa de Alimentação Escolar da cidade de Sobral-CE. *Hig Aliment*. 2002; 16(100):54-8.
17. Oliveira ACB, Germano PM, Germano MIS. Avaliação dos alimentos cárneos servidos no Programa de Alimentação Escolar de um município na grande São Paulo: ênfase nos aspectos tempo-temperatura. *Hig Aliment*. 2004;18(124):24-9.
18. Oliveira AM, Gonçalves MO, Shinohara NKS, Stamford TLM. Manipuladores de alimentos: um fator de risco. *Hig Aliment*. 2003; 17(114):12-8.
19. Brasil. Ministério da Saúde. Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. Coordenação de Vigilância Epidemiológica de Transmissão Hídrica e Alimentar-COVEH Greice Madeleine Ikeda do Carmo. 2007. <Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/apresentacao_dta.pdf. Acesso em: 15 jun. 2008.
20. Centers for Disease Control and Prevention. Surveillance for Foodborne-Disease Outbreaks-United States, 1998-2002. *MMWR-Morbidity and Mortality weekly Report, U.S.A.* 2006; 55(10):1-48.
21. Michelin AF, Carmo LS, Carlos IZ. Surto de intoxicação estafilocócica no município de Birigui, São Paulo. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2006;65(1):46-9.
22. Cardoso RCV, Guimarães AG, Barreto DL, Goes JAW, Figueiredo KVNA, Huttner LB et al. A Segurança na Produção de Alimentos em Escolas Municipais Atendidas pelo PNAE em Salvador-BA: Um diagnóstico com base na RDC 216/04 ANVISA/MS. In: Simpósio Brasileiro de Vigilância Sanitária - SIMBRAVISA: Vigilância Sanitária, Risco e Desigualdade: Quem se Importa?. 2006, Florianópolis. Anais... Florianópolis: SIMBRAVISA; 2006.

Influência dos procedimentos de fabricação nas características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas de queijo de coalho

Influence of the production procedures on the physic-chemical, sensory and microbiological characteristics of *coalho* cheese

RIALA6/1280

Maria Cristina Delgado da SILVA^{1*}, Alécia Cristinne Santos RAMOS¹, Izildinha MORENO², Juliana de Oliveira MORAES¹

*Endereço para correspondência: Condomínio Aldebaran Omega, quadra F, lote 12, Tabuleiro dos Martins, CEP: 57080-900, Maceió-AL, E-mail: mcdelgadosilva@gmail.com

¹Laboratório de Controle e Qualidade de Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Alagoas

²Laboratório de Microbiologia, Centro de P&D de Laticínios -TECNOLAT, Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL

Recebido: 27.08.2009 – Aceito para publicação: 24.03.2010

RESUMO

Neste estudo foi avaliada a influência dos procedimentos de fabricação nas características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas do queijo de coalho preparado com leite cru e leite pasteurizado, em laticínios do sertão de Alagoas. A produção do queijo foi acompanhada *in loco* em três laticínios, onde foram elaborados os fluxogramas e coletadas as amostras para realização de análises microbiológicas (coliformes a 35°C, coliformes termotolerantes, bolores e leveduras, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus coagulase positiva* e *Salmonella* spp.), físico-químicas (pH, acidez, gordura, cinzas, umidade, proteína total e cloretos) e sensoriais (aparência, odor, textura/sensação na boca e sabor). As análises sensoriais indicaram discrepâncias entre as amostras dos três laticínios, provavelmente pelo uso de distintos procedimentos de processamento principalmente nas etapas de salga, pasteurização e aquecimento da massa. As análises físico-químicas indicaram serem os queijos do tipo semi-gordo a gordo e de média a alta umidade. As condições higiênico-sanitárias do produto final foram consideradas insatisfatórias em função da contagem de *E. coli* e *Staphylococcus coagulase positiva*, apesar da ausência de *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes*. Os dados sugerem a necessidade de padronização no processo de fabricação do queijo coalho e implantação de programas de melhoria da qualidade e segurança de alimentos.

Palavras-chave. queijo coalho, características físico-químicas, qualidade microbiológica.

ABSTRACT

This study evaluated the influence of the production procedures on physic-chemical, sensorial and microbiological characteristics of “coalho cheese”, a rennet coagulated cheese, produced with raw and pasteurized milk by dairy companies in Alagoas state, Brazil. Samples were collected from three dairy plants and “coalho” cheese processing flow chart was checked *in loco*. Samples were analyzed on microbiological quality (enumeration of coliforms at 35°C, thermotolerants coliforms, *Escherichia coli*, yeasts and molds, coagulase-positive *Staphylococcus*; detection of *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* spp.), physic-chemical characteristics (pH, titrable acidity, fat contents, ashes, moisture, total protein and chloride contents) and sensorial (appearance, odor, texture/mouth feeling and flavor). Samples from the three dairy plants presented different sensorial characteristics. This could be explained by differences in processing procedures employed by them, namely milk pasteurization, salting, and curd heating. All the samples were characterized as high moisture semi-fat to fat cheeses. The samples presented low microbiological quality because of the high *E. coli* and coagulase-positive *Staphylococcus* counts. Neither *Salmonella* nor *Listeria monocytogenes* were detected. It is suggested to establish a standardized process for “coalho cheese” production and to implement a pre-requisite program for improving the product quality and safety.

Key words. coalho cheese, physico-chemical characteristics, microbiological quality.

INTRODUÇÃO

O queijo de coalho é um queijo tipicamente brasileiro e bastante difundido na região nordeste do Brasil. Trata-se de um produto de grande valor comercial, devido principalmente à simplicidade da tecnologia de fabricação e elevado rendimento do processo. Sua produção realizada, principalmente por pequenos e médios laticínios e propriedades do segmento da agricultura familiar, tem contribuído para o crescimento socioeconômico desta região^{1,2}.

De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo de Coalho³, este é definido como o queijo que se obtém por coagulação do leite pasteurizado, ou tratamento térmico equivalente, para assegurar a fosfatase alcalina residual negativa, por meio do coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácticas selecionadas, e comercializado normalmente com até 10 (dez) dias de fabricação. É também classificado como um queijo de média a alta umidade, de massa semicozida ou cozida e apresentando um teor de gordura nos sólidos totais variável entre 35% e 60%. Deve apresentar, ainda, as seguintes características sensoriais: consistência elástica, textura compacta e macia, cor branco-amarelado uniforme, sabor brando, ligeiramente ácido, podendo ser salgado, odor ligeiramente ácido, lembrando massa coagulada, crosta fina e sem trinca, não sendo usual a formação de casca bem definida e algumas olhaduras pequenas ou sem olhaduras³. Ainda de acordo com esse Regulamento Técnico³, as características distintivas do processo de elaboração do queijo de coalho são: a) coagulação em torno de 40 minutos; b) corte e mexedura da massa; c) remoção parcial do soro; d) aquecimento da massa com água quente ou vapor indireto até obtenção de massa semicozida (até 45°C) ou cozida (entre 45°C e 55°C); e) adição de sal (cloreto de sódio) à massa, se for o caso; f) prensagem, secagem, embalagem e estocagem em temperatura média de 10-12°C, normalmente até 10 dias. Pode também ser elaborado a partir de massa crua (sem cozimento). Os limites microbiológicos previstos pela Resolução RDC 12/2001⁴ são tolerância máxima de 500NMP/g de coliformes termotolerantes, 500UFC/g de *S. coagulase* positiva, ausência de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp.

Atualmente, o estado de Alagoas dispõe de duas bacias leiteiras significativas. A primeira e maior delas, também conhecida como “Bacia Leiteira Tradicional”,

situa-se na região do Agreste (compreende 5 municípios) e no Sertão Alagoano (compreende outros 13 municípios), tendo os municípios de Batalha e Major Izidoro como os maiores expoentes. A principal atividade do Arranjo Produtivo Local referente ao seguimento laticínios (APL-laticínio) é a produção de queijo de coalho, atingindo, no ano de 2007, um total de 1985 toneladas⁵. O queijo de coalho produzido no sertão alagoano apresenta forte tradição e reconhecida procedência e, por isso, os produtores locais e as entidades governamentais e empresariais têm buscado o resgate da qualidade e identidade dos queijos do sertão alagoano⁵.

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi estabelecer o fluxograma de processamento e avaliar comparativamente a composição físico-química e características sensoriais e microbiológicas de queijo de coalho fabricado em três regiões do sertão de Alagoas. Além disso, determinar a influência da tecnologia de fabricação na identidade e qualidade do queijo de coalho. Os resultados contribuirão para incrementar a disponibilidade de dados científicos que possam contribuir com a definição de estratégias que levem a melhoria da qualidade do queijo de coalho.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de queijos

A coleta e análises microbiológicas de amostras de queijo de coalho procedentes de três laticínios do sertão de Alagoas, denominados A, B e C, foram realizadas conforme plano de amostragem (n=5) estabelecido pela Resolução RDC 12/2001⁴ para cada parâmetro avaliado. Cinco amostras de cada laticínio foram coletadas “in loco” e transportadas para o Laboratório de Controle e Qualidade de Alimentos - UFAL para a realização imediata das análises microbiológicas e físico-químicas^{6,7}. A análise sensorial foi realizada no Centro de Química e Nutrição Aplicada – CQNA, LAFISE, do Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL, Campinas-SP.

Fluxograma dos processamentos dos queijos

Foram realizadas visitas aos laticínios para acompanhamento dos processamentos dos queijos e levantamento das informações necessárias para a elaboração dos fluxogramas de procedimentos de fabricação de queijo de coalho adotados em cada um deles.

Determinação das características físico-químicas dos queijos

As análises químicas foram realizadas em triplicata e determinadas de acordo com os métodos oficiais descritos pelo Instituto Adolfo Lutz⁷.

Determinação da análise sensorial

As características sensoriais de aparência, odor, textura/sensação na boca e sabor das amostras foram avaliadas por equipe de dez julgadores do LAFISE-ITAL, selecionados quanto à acuidade sensorial, de acordo com a norma ISO-8586-1 (1993)⁸.

Determinação da qualidade microbiológica dos queijos

As amostras coletadas foram submetidas às análises microbiológicas conforme plano de amostragem da Resolução RDC 12/2001⁴ (anexo 01) para contagem de coliformes a 35°C e termotolerantes pela técnica do Número Mais Provável (NMP), contagem de bolores e leveduras (UFC/g), contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva (UFC/g) e pesquisa de *Escherichia coli* segundo metodologia preconizada por APHA (2004)⁶. A pesquisa de *Listeria monocytogenes* foi realizada segundo metodologia preconizada pela Instrução Normativa SDA 62⁹, e de *Salmonella* spp., segundo método BAM/FDA¹⁰.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Procedimentos de fabricação dos queijos

Os fluxogramas de processamento dos queijos de coalho produzidos nos três laticínios avaliados estão apresentados na Figura 1. O processamento do queijo “A” foi completamente distinto ao dos queijos B e C; estes dois foram bastante similares, diferindo apenas em relação à quantidade de sal adicionado, maior no queijo “B”, e ao semicozimento da massa, realizado no queijo “C”.

As principais diferenças verificadas entre os processamentos estão relacionadas com a utilização de leite cru (Laticínios “B” e “C”) ou pasteurizado a 62-65°C por 30 minutos e adicionado de cloreto de cálcio (Laticínio “A”), com a forma da salga, que foi realizada no queijo pronto (2% do peso do queijo) (Laticínio “A”) e na massa do queijo (500g de cloreto de sódio em 100L de leite no queijo “B” e em 200L de leite no queijo “C”), conforme apresentado na Figura 1. Somente no queijo do Laticínio “C” foi feita a etapa de semicozimento da massa por meio da adição de água a 66°C.

Foi constatado também que a matéria-prima utilizada no Laticínio “B” não foi submetida à filtração, resultando assim, em um produto com possibilidade de conter perigos físicos e, conseqüentemente, processado em condições higiênicas insatisfatórias. Com esses resultados, pode-se constatar a falta de padronização no processo de fabricação do queijo de coalho, mesmo quando produzido em uma mesma região, e como estas variações refletiram nas características sensoriais dos queijos, que foram naturalmente percebidas pelos consumidores.

De acordo com visitas realizadas nos distintos laticínios (A, B e C), pode-se constatar que estes são miniusinas artesanais e que, apesar de estarem em nível tecnológico inferior, têm disputado “competitivamente” no mercado local com alguns produtos de grandes laticínios. A tecnologia de fabricação do queijo de coalho artesanal nestes laticínios provém de tradições arraigadas, as quais fabricam seu produto isoladamente, utilizando processos artesanais com tecnologia simples, que se obtém por coagulação do leite, por meio do coalho, sem adição de bactérias lácticas selecionadas. Apenas o laticínio “A” pasteuriza a matéria-prima (leite cru) para produção do queijo de coalho, conforme recomenda a legislação vigente.

Análise sensorial dos queijos

Os resultados obtidos referentes à análise sensorial realizada nas três amostras de queijo de coalho produzidos no sertão de Alagoas estão apresentados na Tabela 1. Pode-se verificar que o queijo “A” apresentou características sensoriais diferenciadas, principalmente em relação ao odor e sabor. Isto pode ter ocorrido devido ao processo de pasteurização que o mesmo foi submetido (Figura 1), levando a destruição de grande parte da microbiota láctica natural do leite cru, o que pode influenciar negativamente no desenvolvimento das características sensoriais do queijo.

Já o queijo “B” foi considerado o mais salgado, devido provavelmente à salga intensa na massa, prática esta que tem como objetivo evitar o estufamento precoce do queijo de coalho, devido à produção de gás por coliformes¹¹. Além disso, esta prática em queijo que utiliza fermento láctico pode retardar o crescimento deste fermento, inibindo, assim, a produção intensa de ácido¹².

Quanto ao queijo “C”, a textura foi considerada a característica mais diferenciada em relação aos demais queijos, apresentando-se como firme e borrachento, característica esta decorrente da adição de água quente que visa proporcionar o aquecimento da massa (Figura 1).



Figura 1. Fluxograma de processamento de queijo de coalho procedente de laticínios A, B e C do sertão de Alagoas

Tabela 1. Características sensoriais das amostras de queijo de coalho produzido no sertão alagoano

Características	Queijo A	Queijo B	Queijo C
Aparência	- Massa compacta - Coloração creme-claro - Olhaduras mal formadas	- Massa compacta - Coloração creme-claro - Olhaduras mal formadas - Espaços vazios	- Massa compacta - Coloração creme-amarelada - Poucas olhaduras bem-formadas
Odor	- Ácido e estranho	- Característico de queijo de coalho ácido	- Característico de queijo de coalho, suave amanteigado
Textura/sensação na boca	- Macio, levemente borrachento, forma fragmentos muito pequenos durante a mastigação	- Macio e grumoso	- Firme e borrachento, desfaz-se em pequenos fragmentos durante a mastigação
Sabor	- Levemente salgado e muito amargo, forte sabor estranho	- Característico de queijo de coalho, ácido, salgado e levemente amargo; livre de sabores estranhos	- Característico de queijo de coalho, levemente salgado e levemente amanteigado; livre de sabores estranhos

Benevides et al¹³, ao avaliarem sensorialmente o queijo de coalho produzido com leite cru e com leite pasteurizado no estado do Ceará, observaram que o sabor e a textura foram melhor avaliados para o queijo produzido a partir de leite cru, e a maciez foi melhor avaliada para o queijo produzido com leite pasteurizado. Nassu et al¹⁴

também constataram características sensoriais distintas entre 20 amostras de queijo de coalho comercializado em Fortaleza. Dentre as amostras estudadas, três produzidas com leite cru e quatro produzidas com leite pasteurizado apresentaram atributos considerados característicos para o queijo da região. Portanto, pode-se observar que

são vários os fatores, inerentes a cada processamento, responsáveis pela diferenciação entre os queijos de coalho produzidos em diversas regiões e a falta de padronização no processamento deste produto é um fato evidente.

Composição físico-química dos queijos

Na Tabela 2 são apresentados os resultados das análises físico-químicas realizadas nos queijos de coalho. Pode-se observar que o teor de umidade variou de 45,50% a 51,50%, podendo ser caracterizado como queijo de média (36% < umidade < 46%) a alta umidade (46% < umidade < 55%). Este resultado concorda com os obtidos por Carvalho¹⁵ e Machado¹⁶, que classificaram o queijo de coalho produzido no Ceará, como de média umidade. Resultados divergentes foram relatados por Andrade Filho & Santos²⁰, que encontraram teor de umidade variando de 56,5 a 88,5% em 15 amostras de queijo de coalho produzidos em Sergipe, caracterizando-os como queijos de muito alta umidade (umidade > 55%). Vieira et al¹⁸ encontraram variações entre 23,2 a 58,0% para o teor de umidade em queijos de coalho comercializados no estado de Pernambuco. Já Silva et al¹⁹ encontraram valores médios de 40,28% no total de 11 amostras de queijo de coalho comercializados na cidade de Natal, RN.

Segundo a legislação em vigor³, o queijo de coalho pode ser definido como semigordo (25,0 a 44,9%), gordo (45,0 a 59,9%) ou extra gordo (mínimo de 60,0%), devendo apresentar um teor de gordura entre 35,0% e 60,0%.

Os valores de gordura das amostras de queijo de coalho artesanal reportado neste trabalho variaram de 36,59 a 48,16%, sendo superiores aos obtidos por Santos et al²⁰, que, ao analisarem queijos de coalho produzidos no estado de Sergipe, encontraram valor médio de 24,4% de gordura, porém próximos aos encontrados por Machado¹⁶, que constatou teor de 39,75% de gordura em amostras de queijos de coalho produzidos no Ceará.

A legislação brasileira não estabelece padrões para os demais parâmetros físico-químicos avaliados nesta pesquisa, visto que ainda não existe uma padronização no processo de produção e a maioria desses queijos são produzidos artesanalmente. Contudo, a análise de cloretos confirmou a característica sensorial do queijo “B” como o mais salgado (5,48%), seguido dos queijos “A” e “C” (Tabela 2). Resultados divergentes foram relatados por Nassu et al²⁴ que encontraram uma quantidade média de cloretos de 2,51% em amostras deste mesmo tipo de queijo, produzido no Rio Grande do Norte.

Os valores de pH entre as amostras estudadas variaram de 5,98 a 7,13 (Tabela 2), constatando-se que os queijos são frescos, recém processados e não passaram por processo de cura. Resultados semelhantes foram obtidos por Carvalho¹⁵ e Machado¹⁶. Já Sena et al²¹ encontraram um pH médio de 5,35 para as amostras de queijo de coalho produzidos em Recife, PE. O queijo “A” apresentou pH mais elevado (7,13), possivelmente em decorrência da presença de bolores e leveduras, os quais possuem a capacidade de metabolizar ácido láctico²². A ocorrência de

Tabela 2. Valores médios da composição dos queijos de coalho processados em três laticínios do sertão alagoano (A, B e C)

Determinações	Queijo A	Queijo B	Queijo C	Padrão*
Umidade* (g/100g)	51,50 (0,10)	45,50 (0,10)	45,80 (0,10)	36-54,9
Gordura no EST(g/100g EST)*	36,59 (0,20)	48,16 (0,01)	45,20 (0,01)	35-60,0
Cloretos (g/100g)	4,68 (0,01)	5,48 (0,86)	3,34 (0,12)	-
pH	7,13 (0,13)	6,23 (0,01)	5,98 (0,01)	-
Acidez (%)	0,43 (0,01)	0,44 (0,01)	0,34 (0,01)	-
Proteína (g/100g)	29,40 (0,30)	26,93 (0,02)	29,63 (0,01)	-
Cinzas (g/100g)	3,40 (0,10)	3,70 (0,10)	3,57 (0,18)	-

(*) = Padrão segundo BRASIL (2001): Aprova e oficializa o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo de Coalho. (-) = não determinado

proteólise por enzimas produzidas por bactérias lácticas naturalmente presentes em queijos produzidos com leite cru, também é outro fator, que pode levar à produção de compostos alcalinos durante a quebra de proteínas, conforme relatos de outros pesquisadores²³.

A acidez titulável, expressa em percentual de ácido láctico, variou de 0,34 a 0,44 concordando com os valores encontrados por Andrade²⁴, que, analisando amostras de queijo de coalho produzido no Ceará, constatou valores médios de 0,42% para acidez e pH de 6,33. Já Carvalho¹⁵ detectou valor médio de acidez de 0,24%.

Com relação aos teores de proteína e cinzas encontrados nesta pesquisa (Tabela 2), os resultados divergem dos obtidos por Nassu et al²⁵, que constataram valores médios de 24,26% para proteína e 4,41% para cinzas em amostras de queijo de coalho produzidos no Ceará.

Qualidade microbiológica dos queijos

Os alimentos podem conter uma ampla variedade e quantidade de micro-organismos que podem interferir na vida de prateleira ou causar doenças. Diante dos resultados obtidos nesta pesquisa, ficou evidente a má qualidade higiênico-sanitária das amostras de queijo de coalho produzidas no sertão de Alagoas. Todas apresentaram elevadas contagens de coliformes a 35°C, coliformes termotolerantes, bolores e leveduras, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (Tabela 3).

De acordo com a legislação vigente⁴, o limite máximo permitido de coliformes termotolerantes e *Staphylococcus coagulase (+)* é de 5×10^2 UFC/g e, como pode-se observar na Tabela 3, as três amostras apresentaram contagens acima deste valor. Apesar do queijo "A" ter sido produzido a partir de leite pasteurizado, o mesmo ainda apresentou contagens elevadas dos indicadores de qualidade e segurança (Tabela 3).

A ausência de *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* nas amostras analisadas, pode ser devida à presença da microbiota autóctone, mais especificamente as bactérias lácticas, que têm a capacidade de restringir o crescimento de micro-organismos patogênicos por competição e ou produção de moléculas antagônicas, conforme relatados por vários pesquisadores^{15,26}. No entanto, a quantidade e/ou o tipo de metabólito antimicrobiano produzido por bactérias lácticas nessas amostras pode não ter sido suficiente para o controle de *Staphylococcus aureus* que geralmente encontra-se em grande número.

Resultados semelhantes aos obtidos nesta pesquisa foram constatados por Benevides & Telles²⁷ em 40(80,6%) amostras de queijos de coalho produzidos na cidade de Fortaleza-CE, com valores de coliformes termotolerantes acima do padrão microbiológico permitido pela legislação brasileira⁴. Bruno et al²⁸ também analisaram amostras de queijo de coalho produzidos a partir de leite cru e a partir de leite pasteurizado (4 unidades de cada) e detectaram que todas as amostras apresentaram *Escherichia coli*, sendo

Tabela 3. Avaliação microbiológica de amostras de queijo de coalho processados em três laticínios do sertão alagoano (A, B e C)

Análises	Queijo A	Queijo B	Queijo C	Padrão*
Coliformes a 35°C (NMP/g)	$1,1 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	-
Coliformes Termotolerantes (NMP/g)	$1,1 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	$5,0 \times 10^2$
<i>Escherichia coli</i> (NMP/g)	$1,1 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	$5,0 \times 10^2$
Bolores e leveduras (UFC/g)	$3,8 \times 10^4$	$4,6 \times 10^4$	$7,2 \times 10^4$	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/g)	$2,0 \times 10^4$	$4,0 \times 10^7$	$5,0 \times 10^4$	$5,0 \times 10^2$
<i>Salmonella</i> spp.	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência

(*) Padrão RDC nº125: Dispõe sobre padrões microbiológicos sanitários para alimentos. (-) = não determinado

que, nas amostras produzidas com leite cru, foi também detectada a presença de *Salmonella* spp. No entanto, em três das amostras produzidas com leite cru e em uma produzida com leite pasteurizado, apresentaram também contagens elevadas de estafilococos coagulase positiva, isto é, acima de 10^7 UFC/g. Resultados divergentes foram obtidos por Branco et al²⁹, quanto à presença de *Listeria monocytogenes*, em amostras de queijo de coalho detectadas em 19% das amostras analisadas.

CONCLUSÃO

De forma geral, as etapas de processamento do queijo de coalho produzido no sertão de Alagoas pelos laticínios “A”, “B”, “C” foram similares, entretanto, as etapas referentes à salga, pasteurização e ao aquecimento da massa, foram aquelas que apresentaram particularidades entre as empresas, resultando em produtos com características sensoriais diferenciadas.

Na avaliação de parâmetros físico-químicos ficou evidente a falta de padronização no processamento do queijo de coalho, o qual foi caracterizado como queijo semigordo a gordo e de média a alta umidade.

Na avaliação da qualidade higiênico-sanitária de amostras de queijo de coalho do sertão de Alagoas, constatou-se que as mesmas são indicativas de condições inadequadas de processamento. A ausência de *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. pode ser atribuída à presença de metabólitos antimicrobianos produzidos por bactérias lácticas naturalmente presentes nessas amostras.

REFERÊNCIAS

1. Cerri C. Artesãos do futuro. *Globo Rur* 2002; (200): 36-49.
2. Borges MF. Diagnóstico da contaminação por bactérias patogênicas em uma indústria processadora de queijo de coalho e detecção de genes associados a fatores de virulência. [Tese de Doutorado]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2006.
3. Brasil. Instrução Normativa nº 30 de 26 de junho de 2001 do Departamento de Inspeção de produtos de origem animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Manteiga da Terra ou Manteiga de Garrafa; Queijo de Coalho e Queijo de Manteiga. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 16 jul 2001. Seção I, p.13-5.
4. Brasil, Resolução RDC nº12, de 2 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Dispõe Sobre Padrões Microbiológicos Sanitários para Alimentos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 10 jan 2001. Seção 1, nº 7-E, p.1415-53.
5. Sebrae/AL. APL-laticínios sertão (T3-ano 2007). Maceió: Instituto Compasso; 2008.
6. APHA. Standard methods for the microbiological examination of dairy products. 17 ed. Washington (DC): American Public Health Association; 2004
7. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo-Brasil). Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos: Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 4 ed. Brasília (DF): ANVISA; 2005.
8. ISO-8586-1, International Standard 8565-1 (1993). Sensory analysis - General guidance for selection, training and monitoring of assessors - Part 1: Selected assessors. Geneva: International Organization for Standardization.
9. Brasil. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003 do Departamento de Inspeção de produtos de origem animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 18 ago 2003. Seção I, p 14.
10. Andrews WH, Hammack TS. *Salmonella*. In: Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual Online. Chapter 5, updated June 2006.
11. Nassu RT, Araújo RS, Borges MDEF, Lima JR, Macêdo BA, Lima MHP et al. Diagnóstico das condições de processamento de produtos regionais derivados do leite no Estado do Ceará. *Boletim de pesquisa e desenvolvimento Embrapa Agroindústria Tropical*.2001; 1; 28.
12. Fox PF, Guinee TP, Cogan TM, McSweeney PLH. Fundamentals of cheese science. Gaithersburg: Aspen Publishers; 2000.
13. Benevides SD, Telles FJS, Guimarães ACL, Rodrigues MCP. Estudo bioquímico e sensorial do queijo de coalho produzido com leite cru e pasteurizado no estado do Ceará. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos-B. CEPPA*. 2000;18(2): 193-206.
14. Nassu RT, Silva MAAP, Viotto WH. Variações sensoriais em queijo de coalho artesanal e industrial consumido em Fortaleza, Ceará. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2004, Recife.
15. Carvalho JDG. Caracterização da microbiota láctica isolada de queijo de coalho artesanal produzido no Ceará e de suas propriedades tecnológicas [tese de doutorado]. Fortaleza, Ceará: Universidade Federal do Ceará, 2007. 154 pp.
16. Machado TF. Incidência de patógenos e caracterização físico-química do queijo de coalho artesanal e industrial. In: Symposium on Food Safety – IAFP América Latina 2008. Anais: 30-31. São Paulo: ABRAPA; 2008.
17. Andrade Filho JB, Santos MNG. Avaliação microbiológica e físico-química de queijos artesanais tipo coalho comercializados no estado de Sergipe. In: XVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. 1998, Rio de Janeiro. Livro de Resumos. Rio de Janeiro: Comissão Organizadora do XVI CBCTA 1998. p. 125-8.
18. Vieira MLM, Vaz APL, Faro ZP. Avaliação de laudos analíticos de queijo tipo coalho, à luz das Legislações Federal e Estadual de Pernambuco. *Hig Aliment*. 2003;17(109):19-23.

19. Silva AEA, Santos NN, Seabra LMJ, Damasceno KSFSC. Quantificação de lipídios, cinzas e umidade de queijos tipo manteiga e coalho comercializados na cidade de Natal, RN. *Hig Aliment*. 2006;20(145):101-4.
20. Santos JS, Jalali VRR, Castro AA, Silva GF, Santana MM, Santos RD et al. Avaliação da qualidade físico-química dos queijos artesanais produzidos no estado de Sergipe. *Hig Aliment*. 2006; 21(150): 314.
21. Sena MJ, Cerqueira MMOP, Morais CFA, Correa ES, Souza MR. Características físico-químicas de queijo de coalho comercializado em Recife, PE. *Hig Aliment*. 2000;14(74):41-4.
22. Beresford T, Williams A. The microbiology of cheese ripening. *In: Fox PF, McSweeney OLH, Cogan TM, Gueene TP. Cheese chemistry, physics and microbiology*. 3 ed, Amsterdam: Elsevier Academic Press; 2004.
23. Guinee TP, Fox PF. Salt in cheese: physical, chemical and biological aspects. *In: Fox PF, McSweeney PLH, Cogan TM, Guinee TP. Cheese chemistry, physics and microbiology*. 3ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press; 2004.
24. Andrade AA. Estudo do perfil sensorial, físico-químico e aceitação de queijo de coalho produzido no Ceará. 2006. Dissertação [dissertação de mestrado]. Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
25. Nassu RT, Andrade AA, Silva GJF, Fernandes RLA. Caracterização físico-química de queijos regionais produzidos no estado do Rio Grande do Norte. *Rev Inst Latic Cândido Tostes*. 2006;61(351): 303-5.
26. Jones RJ, Hussein HM, Zagorec M, Brighwell G, Tagg JR. Isolation of lactic bacteria with inhibitory activity against pathogens and spoilage organism associated with fresh meat. *Food Microbiol*. 2008; 25:392-9.
27. Benevides SD, Telles FJS. Características microbiológicas, de armazenamento e de embalagens de queijos tipo “coalho” comercializados na cidade de Fortaleza, CE. *Hig Aliment*. 2002; 16 (95):44-7.
28. Bruno LM, Feitosa T, Nassu RT, Carvalho JDG, Andrade AA. Avaliação microbiológica de queijos de coalho artesanais e industrializados comercializados em Fortaleza, CE. *Rev Inst Latic Cândido Tostes*. 2005; 60(345):217-20.
29. Branco MAAC, Figueiredo EAT, Borges MF, Silva MCD, Destro MT. Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo de coalho refrigerado produzido industrialmente. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos-B CEPPA* 2003; 21(2): 209-430.

Avaliação das boas práticas de fabricação em linha de processamento de queijos Minas frescal e ricota

Evaluation of good manufacturing practices in the processing line of fresh Minas and ricotta cheeses

RIALA6/1281

Vidiany Aparecida Queiroz SANTOS*, Fernando Leite HOFFMANN

*1Endereço para correspondência: Laboratório de Microbiologia de Alimentos - Departamento de Engenharia e Ciência de Alimentos - Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas - IBILCE - Universidade Estadual Paulista - UNESP . Rua Cristovão Colombo n. 2265. Bairro Jardim Nazareth, CEP: 15054-000 - São José do Rio Preto - SP , email: vidianyqueiroz@yahoo.com.br
Recebido: 05.10.2009 – Aceito para publicação: 18.05.2010

RESUMO

Para a manutenção da integridade e qualidade dos alimentos e evitar contaminações de origem química, física ou biológica, é imprescindível a adoção de Boas Práticas de Fabricação (BPF). Dentre as técnicas utilizadas para a avaliação das BPF, há a análise observacional por meio da aplicação do formulário *check-list*. Nesse contexto, este estudo avaliou as adequações quanto às BPF em uma indústria de laticínios de pequeno porte produtora de queijos Minas frescal e ricota, localizada em São José do Rio Preto - SP, por meio da aplicação do formulário *check-list*. Pela avaliação realizada no laticínio, verificou-se importante melhora nos critérios de conformidade, com aumento de 43% para 78%. Os blocos relacionados aos manipuladores e à documentação existente na empresa não apresentaram melhorias, pela evidência de más condições nessas questões. Todos os demais blocos avaliados apresentaram importante melhora após a adoção de ações corretivas relativas às BPF. Diante destas observações, a adoção de ações corretivas pelo laticínio com relação ao ambiente físico, BPF e treinamentos de manipuladores são essenciais para garantir as melhorias observadas, com aumento da qualidade dos produtos e segurança dos consumidores.

Palavras-chave. produtos lácteos, segurança alimentar, controle de qualidade, lista de checagem.

ABSTRACT

In order to assure the maintenance of foods integrity and quality, for avoiding chemical, physical or biological contamination, it is essential to follow the Good Manufacturing Practices (GMP). Among the techniques used for evaluating GMP there is the observational analysis carried out by means of a *check-list* form application. The present study evaluated the suitability of GMP in a dairy industry producer of Minas fresh and ricotta cheeses, located in São José do Rio Preto, SP, by applying a *check-list* form. A significant improvement in conformity was evidenced, increasing from 43% to 78%. Neither the blocks related to the handlers nor the existing documentation in the company showed any improvements, as poor conditions unchanged. All of the other evaluated blocks showed significant improvement after applying the GMP-related corrective measures. Based on these findings, the observance of corrective measures by the dairy industry on dairy products, physical environment, GMP, and handlers training was crucial for assuring the improvements and to increase the product quality and consumers safety.

Key words. dairy products, food security, quality control, *check-list*.

INTRODUÇÃO

A ocorrência de casos de doenças transmitidas por alimentos envolvendo derivados lácteos é bastante citada na literatura. A presença de micro-organismos patogênicos no alimento, bem como de contaminantes químicos e físicos, está relacionada à má qualidade da matéria-prima e adoção de técnicas higiênicas inadequadas, que comprometem a segurança do produto final¹.

Para garantir a segurança alimentar durante o processamento dos alimentos, é importante a adoção de um sistema de controle de qualidade, como as boas práticas de fabricação (BPF)^{2,3}.

Conforme Senac⁴, as técnicas utilizadas para a avaliação das boas práticas de fabricação podem ser classificadas em quantitativas, direcionadas à enumeração de bioindicadores de contaminação e qualitativas relacionadas à análise observacional por meio da aplicação do formulário *check-list*.

O *check-list* é um instrumento utilizado para avaliar as condições higiênico-sanitárias de estabelecimentos produtores de alimentos, visando instituir adequações pela identificação de pontos críticos em instalações e processos produtivos, a fim de eliminar ou reduzir riscos de contaminações físicas, químicas e biológicas^{5,6}.

Esta ferramenta é empregada para verificar as porcentagens de conformidades e não conformidades referentes à legislação em vigor, sendo os estabelecimentos classificados como aprovado, com ³ 75% de conformidades e reprovado com < 75% de conformidades⁵.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo, avaliar as adequações quanto às boas práticas de fabricação em uma indústria de laticínios de pequeno porte, produtora de queijos Minas frescal e ricota, localizada em São José do Rio Preto - SP, por meio da aplicação do formulário *check-list*, conforme estabelecido pela legislação vigente.

MATERIAL E MÉTODOS

Para avaliar as adequações quanto às BPF, foi utilizado o formulário *check-list*, onde cada item avaliado foi classificado como em conformidade ou não, segundo os critérios estabelecidos pela legislação. A cada item avaliado foi designada uma nota de 0 a 6 de acordo com sua importância para o preparo do alimento⁵. Com relação à classificação da linha de processamento sob o ponto de vista higiênico-sanitário, o *check-list* foi dividido em bloco 1: edificações/instalações, bloco 2: equipamentos/

utensílios, bloco 3: manipuladores, bloco 4: manufatura do alimento e bloco 5: documentação.

Conforme resolução RDC, nº275/2002⁵, para avaliar as condições higiênico-sanitárias após a aplicação do formulário *check-list* foi utilizada a equação: $PB_n = TS_n \cdot P_n / (K_n - TNA)$, onde:

PB_n = pontuação do laticínio para o bloco n.

P_n = peso atribuído a cada bloco.

TS_n = somatório das respostas “sim” obtidas pelo laticínio.

K_n = constante do bloco numericamente igual ao valor máximo atribuível.

TNA_n = somatório das respostas “não aplicável” obtidas pelo laticínio.

n = índice referente a cada bloco.

O cálculo das notas foi obtido utilizando-se uma constante (K) específica para cada bloco. Esse método é utilizado para não penalizar a planta do laticínio, caso alguns critérios forem considerados “N.A.” (não aplicáveis). O cálculo final de cada bloco é encontrado utilizando um peso específico. Estes critérios são pontuados de acordo com a importância de cada bloco para a avaliação higiênico-sanitária, conforme destacado na resolução RDC nº275/2002⁵.

A nota final foi calculada pela somatória dos valores encontrados em cada um dos quatro blocos, conforme equação: $NT = PB_1 + PB_2 + PB_3 + PB_4 + PB_5$. Ao final de cada inspeção, o laticínio foi classificado de precário a excelente, conforme a nota recebida. A classificação foi obtida pela somatória de cada bloco que totaliza no máximo 175 pontos, sendo a pontuação mínima de 75 pontos de conformidade. Quando o estabelecimento apresenta pontuação abaixo da mínima, encontra-se fora dos padrões estabelecidos e deve promover melhorias adotando as boas práticas higiênico-sanitárias exigidas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O diagnóstico preliminar do laticínio quanto a adequações às BPF foi realizado em junho de 2007, a partir do qual o estabelecimento foi classificado como regular, apresentando 43,10% de conformidade (75,42 pontos) e 56,9% de não conformidades, estando, portanto, em condições insatisfatórias para a maioria dos critérios avaliados.

Em outubro de 2008, foi realizada a avaliação final, a fim de verificar melhorias nas condições de funcionamento do laticínio. De forma geral, este apresentou importante aumento nos critérios de conformidade às BPF com 78,89% e 21,11% de não conformidades, sendo classificado como de boa qualidade (138,06 pontos).

É válido destacar que estas melhorias apresentadas são importantes tanto do ponto de vista de saúde pública quanto econômico, pois, com a adoção das BPF, podem-se elaborar alimentos seguros e de melhor qualidade.

Faleiro e Pereira⁷, ao avaliarem dois laticínios produtores de mussarela quanto a adequações às BPF, detectaram 53,6% e 43,3% de itens em conformidade, sendo estes classificados como regulares⁷. Estes mesmos autores destacam como itens de maior deficiência os relacionados ao controle de pragas e roedores, controle e garantia de qualidade, controle de uniformização e higiene pessoal, controle da matéria-prima e produto pronto para o consumo, cloração da água de abastecimento e ausência de pasteurizador⁷.

Estes resultados são similares aos encontrados neste trabalho para o diagnóstico inicial, exceto para o pasteurizador. Verificou-se também percentuais baixos de conformidade indicando a necessidade de adequações em atividades comportamentais, pessoais e operacionais.

Ao avaliar dez estabelecimentos produtores de saladas de maionese na cidade de São José do Rio Preto - SP, Seixas⁸ verificou que 70,0% não ofereciam alimentação segura

aos consumidores, sugerindo ainda, melhorias nos aspectos de qualidade dos produtos e serviços de alimentação⁸.

Com relação ao percentual de conformidades para cada bloco avaliado, nos *check-list* inicial e final, observou-se que os blocos 1, 2, 3, 4 e 5 apresentaram, respectivamente, percentuais de conformidade para o monitoramento inicial de 60,25%, 51,28%, 5,13%, 64,10% e 7,69%. Para a avaliação final obteve-se valores de 98,68%, 61,54%, 30,77%, 94,38% e 7,69% (Figura 1).

É válido destacar que os blocos 3 e 5, correspondentes aos manipuladores e à documentação, foram os que apresentaram menores percentuais em ambas as avaliações, indicando a necessidade de melhorias nesses aspectos, uma vez que estes são imprescindíveis a manutenção da qualidade e segurança alimentar.

Guimarães⁹ obteve também, para laticínio de pequeno porte localizado na cidade de Urutaí - GO, percentuais altos de não conformidade quanto às BPF, com 58% para edificações e instalações, 79% para equipamentos e utensílios; 92% para manipuladores; 45% para produção de alimentos e 73% quanto à documentação⁹.

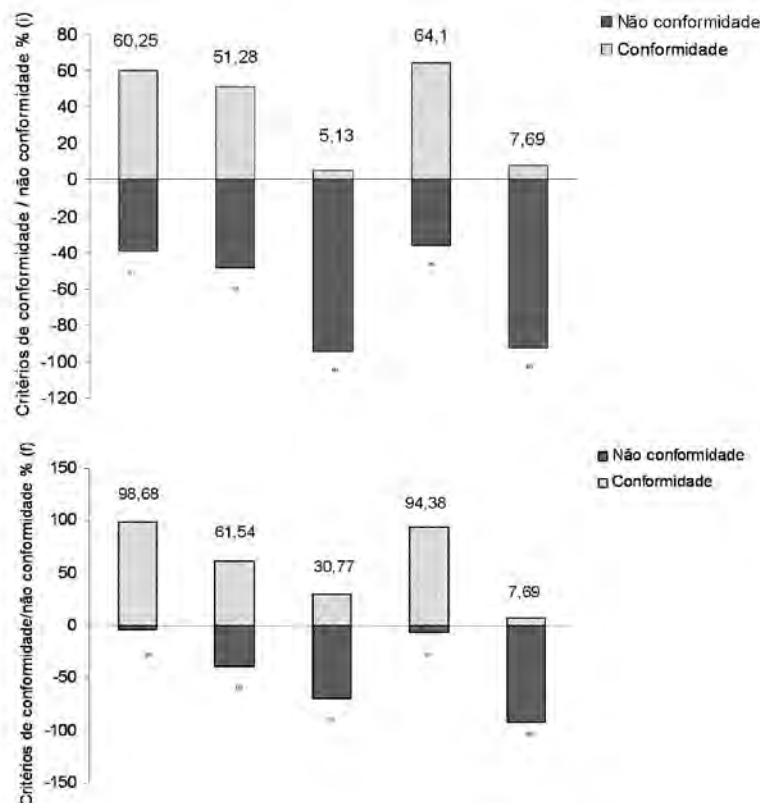


Figura 1. Análise de conformidades dos *check-list* inicial (i) e final (f) para os blocos referentes à edificação e instalações (B1); equipamentos e utensílios (B2); manipuladores (B3); produção de alimentos (B4) e documentação (B5) do laticínio de pequeno porte, localizado no município de São José do Rio Preto - SP

Com relação às edificações e instalações (bloco 1), para o *check-list* inicial, obteve-se 60,25% de conformidade, sendo que os sub-blocos relacionados à área de acesso à fábrica, área interna, pisos, tetos, janelas, instalações sanitárias para visitantes, ventilação e climatização, lavatórios na área de produção, esgotamento sanitário e “layout” apresentaram-se não conformes com o estabelecido pela legislação⁵. O sub-bloco relacionado à presença de escadas e elevadores adequados, incluíram-se nos critérios de não aplicáveis⁵ (Figura 2).

Por outro lado, o monitoramento final apresentou para este mesmo bloco 98,68% de conformidades, tendo aumentado nos percentuais de adequação para todos os sub-blocos, exceto para higienização das instalações (23,07%), controle integrado de pragas (10,25%), abastecimento de água (7,69%) e manejo de resíduos (2,56%). Para escadas e elevadores, instalações sanitárias para visitantes, esgotamento sanitário e

“layout” verificou-se novamente total não conformidade, conforme apresentado na figura 1.

Riedel¹⁰ ressalta que as janelas e as portas devem ser teladas e em adequado estado de conservação, para que essas minimizem a incidência de insetos, roedores e pragas nas dependências da fábrica e principalmente nas áreas de manipulação/elaboração dos alimentos¹⁰.

Diante disso, torna-se visível a importância de se adotar ações corretivas para melhorar as condições das edificações e instalações, focadas principalmente naqueles critérios que estejam diretamente envolvidos à elaboração do alimento.

Para equipamentos, móveis e utensílios (bloco 2), inicialmente, verificou-se 51,28% de critérios em conformidade com o estabelecido pela legislação. Para utensílios, observou-se ausência de conformidade em todos os critérios avaliados. (Figura 3).

Na avaliação final, observou-se percentual de 61,54% de conformidades, com melhoria nos sub-blocos correspondentes a utensílios e higienização dos mesmos⁵.

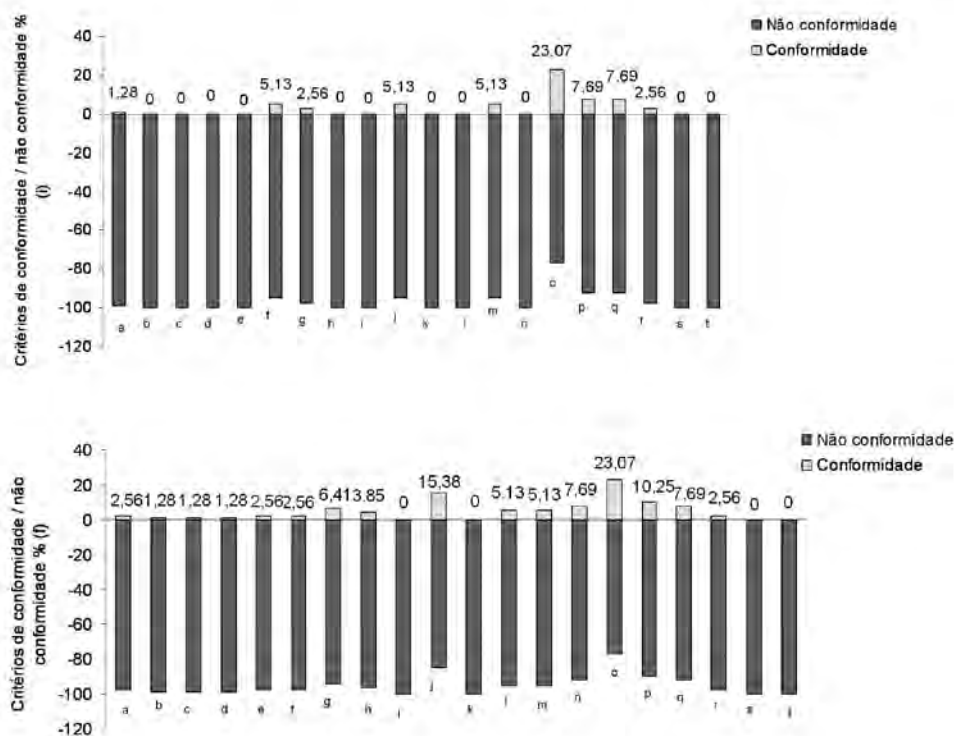


Figura 2. Análise de conformidades para o bloco 1 dos *check-list* inicial (i) e final (f) - edificações e instalações - área externa (a); acesso (b); área interna (c); piso (d); tetos (e); paredes e divisórias (f); portas (g); janelas e demais aberturas (h); escadas, elevadores de serviço e estruturas auxiliares (i); instalações sanitárias e vestiários para os manipuladores (j); instalações sanitárias para visitantes e outros (k); lavatórios na área de produção (l); iluminação e instalação elétrica (m); ventilação e climatização (n); higienização das instalações (o); controle integrado de vetores e pragas urbanas (p); abastecimento de água (q); manejo de resíduos (r); esgotamento de água (s) e *layout* (t) do laticínio de pequeno porte, localizado no município de São José do Rio Preto - SP

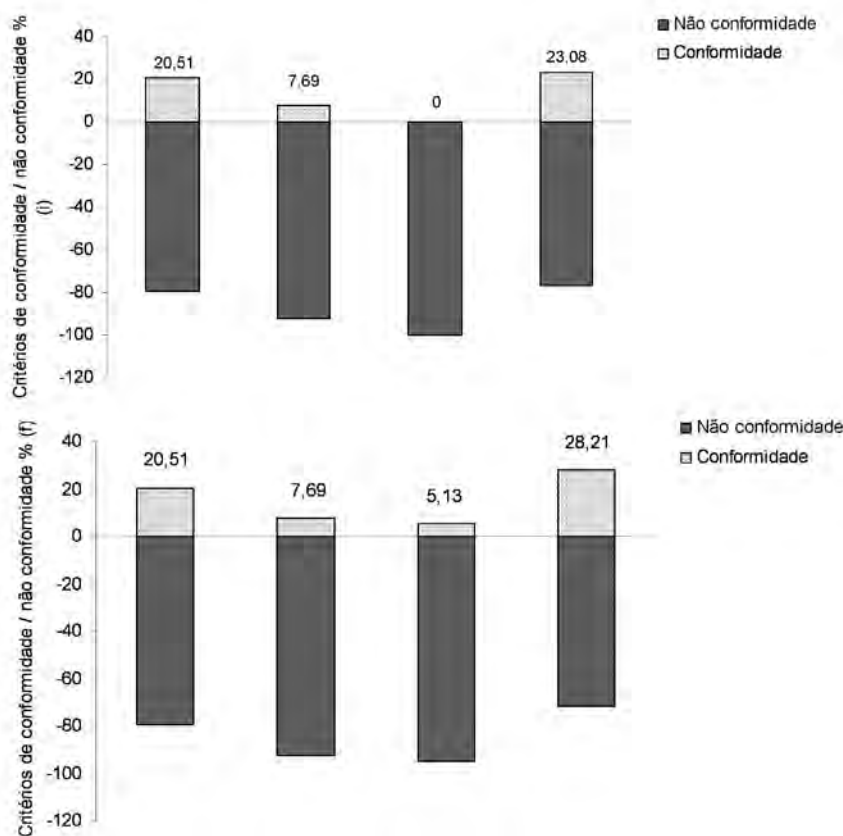


Figura 3. Análise de conformidades para o bloco 2 dos *check-list* inicial (i) e final (f) - equipamentos, móveis e utensílios: equipamentos (a); móveis (b); utensílios (c); higienização de equipamentos e utensílios (d) do laticínio de pequeno porte, localizado no município de São José do Rio Preto - SP

A utilização de equipamentos e utensílios em condições precárias, com superfícies danificadas e de material poroso, pode causar acúmulo de resíduos e aumentar as chances de proliferação de microbiota patogênica, responsável por contaminações cruzadas e ocorrência de toxinfecções alimentares^{11,5}.

O bloco 3, que diz respeito aos manipuladores, na avaliação inicial, apresentou maior índice de não conformidades, sendo que somente o sub-bloco dos hábitos higiênicos apresentou conformidade de 5,13% (Figura 4). É importante ressaltar que os sub-blocos vestuário, estado de saúde, equipamentos de proteção individual e programa de capacitação dos manipuladores/supervisão apresentaram-se totalmente não conformes. Este fato é preocupante, uma vez que os manipuladores estão diretamente em contato com o alimento.

O diagnóstico final para este bloco 3, demonstrou importante melhora nos critérios de conformidade, aumentando de 5,13% para 30,77% (Figura 4). Destes, 25,64% para o sub-bloco direcionado ao vestuário e

5,13% para hábitos higiênicos. Por outro lado, para assistência à saúde, equipamentos de proteção individual, programa de capacitação dos manipuladores e supervisão permaneceram totalmente sem conformidade.

Durante a rotina de trabalho dos dois manipuladores, observou-se que um é o responsável não somente pelo trabalho na linha de produção, mas também pela recepção das matérias primas e da limpeza do estabelecimento. Esta rotina de trabalho é um sistema indesejável, pois além de não atender às BPF, pode favorecer a inserção de micro-organismos indesejáveis na linha de processamento.

Ressaltando a importância da adoção de práticas higiênicas adequadas por parte dos manipuladores, Seixas⁸ cita que a ausência de sabonete líquido bactericida para a realização da correta higienização das mãos, é responsável muitas vezes por contaminações com coliformes termotolerantes e *S. aureus*, o que também foi observado durante a avaliação do laticínio onde foi realizada esta pesquisa⁸.

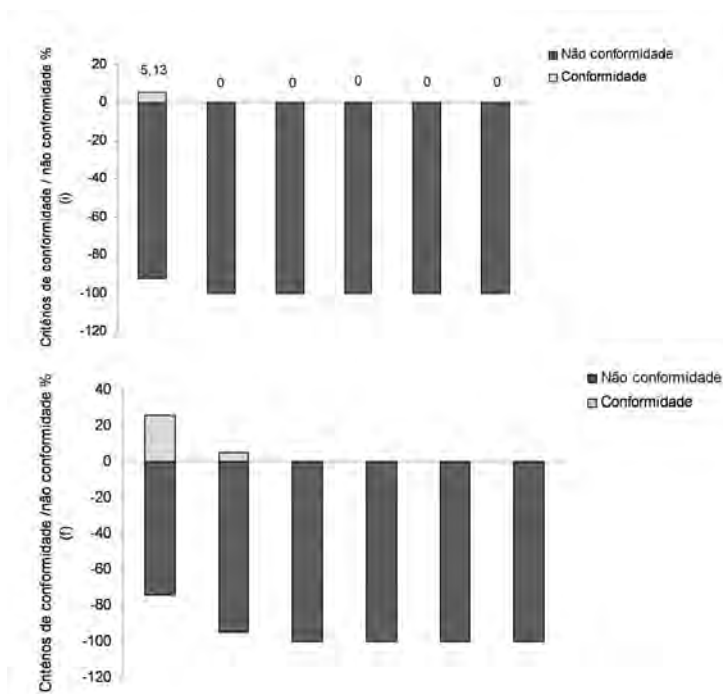


Figura 4. Análise de conformidades para o bloco 3 dos *check-list* inicial (i) e final (f) - manipuladores: vestuários (a); hábitos higiênicos (b); estado de saúde (c); assistência à saúde (d); equipamentos de proteção individual (e); programa de capacitação dos manipuladores e supervisão (f) do laticínio de pequeno porte, localizado no município de São José do Rio Preto - SP

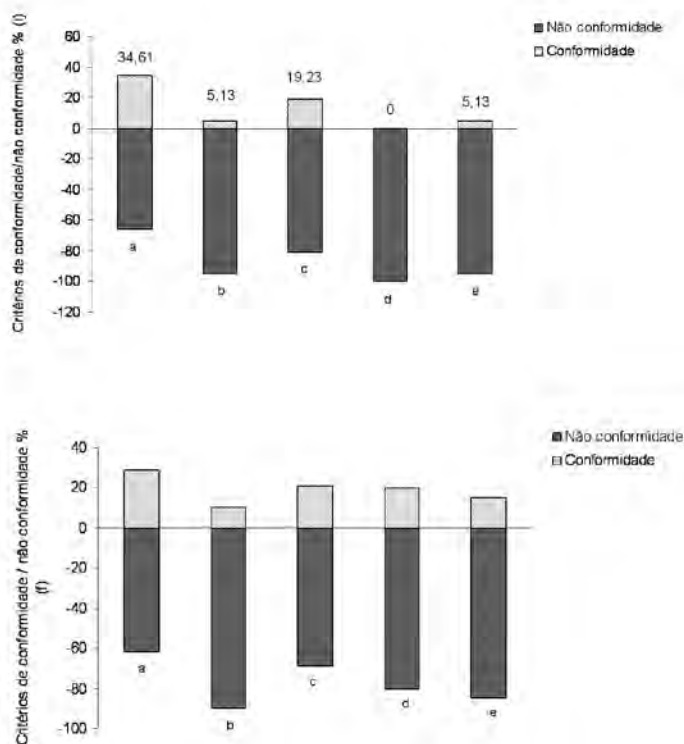


Figura 5. Análise de conformidades para o bloco 4 dos *check-list* inicial (i) e final (f) - Produção e transporte de alimentos: matéria prima, ingredientes e embalagens (a); fluxo de produção (b); rotulagem e armazenamento do produto final (c); controle de qualidade do produto final (d); transporte do produto final (e); do laticínio de pequeno porte, localizado no município de São José do Rio Preto - SP

O bloco direcionado à manufatura dos produtos (bloco 4), apresentou inicialmente 64,10% de conformidades. Para o item controle de qualidade do produto final obteve-se ausência de conformidade⁵. A avaliação final apresentou importante melhora em todos os critérios, com 94,38% de conformidades, conforme é apresentado na figura 5.

Estes resultados coincidem com os encontrados por Stolte e Tondo¹² que, ao avaliarem as condições higiênico-sanitárias de unidade de alimentação e nutrição, verificaram resultados positivos quanto ao conhecimento sobre formas adequadas de higienização pelos manipuladores e também adequações com relação aos equipamentos e utensílios utilizados pelo estabelecimento, situação que foi observada no decorrer desta pesquisa.

Quanto à documentação (bloco 5), obteve-se tanto para o diagnóstico inicial quanto para o final, 7,69% de conformidade, direcionados aos procedimentos operacionais padronizados. Com relação à existência de manual de BPF, verificou-se total não conformidade.

Tais resultados insatisfatórios com relação à existência de documentação afetam a qualidade dos produtos, além de aumentar os riscos de contaminação por micro-organismos patogênicos.

CONCLUSÃO

A partir da avaliação do laticínio, verificou-se que a empresa em questão apresentou importante melhora nos critérios de conformidade, aumentando de 43% para 78% com classificação de muito bom. Os blocos relacionados aos manipuladores e à documentação existente na empresa foram os critérios em piores condições. Todos os blocos avaliados apresentaram importante melhora após adoção de ações corretivas relativas às BPF. Diante destas observações, a adoção de ações corretivas pelo laticínio, com relação ao ambiente físico, BPF e treinamentos aos manipuladores, foram essenciais para garantir as melhorias observadas, com aumento da qualidade dos produtos e segurança dos consumidores.

REFERÊNCIAS

1. Nero LA, Mattos MR, Beloti V, Barros MAF, Netto DP, Pinto JPAN et al. Hazards in non-pasteurized milk on retail sale in Brazil: prevalence of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and chemical residues. *Braz J Microbiology*. 2004;35(3):211-5.
2. Durek CM. Verificação das boas práticas de fabricação em indústrias de leite e derivados, registradas no serviço de inspeção federal-SIF [dissertação de mestrado]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2005.
3. Food and Agriculture Organization-Fao/World Health Organization [FAO]. Codex alimentarius commission. Food hygiene texts. Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) system and guidelines for its application. Roma, 1997.
4. Serviço Nacional de Aprendizagem Comercial [SENAC]. Manual de elementos de apoio para o sistema APPCC. Rio de Janeiro; 2001. 282p.
5. Brasil. Resolução RDC nº275, 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. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 06 nov. 2002.
6. Piragine KO. Aspectos higiênicos e sanitários do preparo da merenda escolar na rede estadual de ensino de Curitiba [dissertação de mestrado]. Curitiba, Universidade Federal do Paraná, 2005.
7. Faleiro LR, Pereira AJG. Avaliação das boas práticas de fabricação em laticínio sem registro, produtores de mussarela. *Rev Inst Latic Cândido Tostes*. 2003,58(333):138-41.
8. Seixas FRF. Verificação das boas práticas de fabricação (BPF) e análise da qualidade microbiológica de saladas adicionadas de maionese comercializadas na cidade de São José do Rio Preto - SP [dissertação de mestrado]. São José do Rio Preto, Universidade Estadual Paulista, 2008.
9. Guimarães AC. Construção e organização do manual de boas práticas de fabricação para o laticínio do CEFET de Uruaí, GO [dissertação de mestrado]. Seropédica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2005.
10. Riedel G. Controle sanitário dos alimentos. 3ª ed. São Paulo: Atheneu; 2005.
11. Chiarini E, Andrade CS. Levantamento de procedimentos higiênicos adotados em cozinhas residenciais. *Hig Alimentar*. 2001,18(121):34-7.
12. Stolte D, Tondo EC. Análise de perigos e pontos críticos de controle em uma unidade de alimentação e nutrição. *Hig Alimentar*. 2001;15(85):41-9.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq pelo auxílio financeiro concedido durante a realização desta pesquisa e à Universidade Estadual Paulista - UNESP - Campus de São José do Rio Preto - SP.

Avaliação físico-química da qualidade de água de poços e minas destinada ao consumo humano

Physico-chemical evaluation of drinking water quality from wells and springs for human consumption

RIALA6/1282

Maria Anita SCORSAFAVA, Arlete de SOUZA, Monica STOFER, Claudete Azevedo NUNES, Thaís Valéria MILANEZ*

*Endereço para correspondência: Núcleo de Águas e Embalagens, Centro de Contaminantes, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo 355, CEP 01246-902, São Paulo, SP, Brasil.e-mail: thaismil@ial.sp.gov.br
Recebido: 09.03.2010 – Aceito para publicação: 04.05.2010

RESUMO

A água para o consumo humano foi avaliada segundo os parâmetros estabelecidos pela Portaria nº518 do Ministério da Saúde, que dispõe as normas de qualidade em sistemas de abastecimento público e soluções alternativas. O potencial de risco das águas provenientes de poços e minas de 100 municípios do estado de São Paulo, incluindo a capital, foi avaliado por meio de análise dos seguintes parâmetros: ferro, cor aparente, turbidez, nitrato, nitrito, amônia e flúor. No período de 2005-2008 foram coletadas 1759 amostras de águas, sendo 1356 de poços e 403 de minas. Das amostras de águas de poços analisadas, 8,5% apresentaram níveis de ferro superiores ao valor máximo permitido (VMP), 7,5% mostraram cor aparente, 5,0% turbidez, 10,8% nitrato, 0,4% amônia, 0,3% nitrito e 1,1% altos níveis de flúor. No mesmo período, em 7,0% das amostras de águas de minas analisadas, foram observadas alterações nos parâmetros ferro, 9,6% apresentaram cor, 5,2% turbidez, 14,5% com nitrato em níveis acima do VMP, 1,0% para nitrito, 0,4% amônia e 0,2% para flúor. Considerando os resultados obtidos torna-se de grande importância o monitoramento da qualidade dessas águas para o consumo humano.

Palavras-chave. água, poços, minas.

ABSTRACT

Drinking water samples were analyzed following the guidelines established by Decree nº 518 of the Ministry of Health which provides the national quality standards for water supply systems and public alternatives. The potential risk of drinking water from wells and springs located in 100 municipalities in the state of São Paulo, including the capital, was investigated by assessing the parameters on iron, apparent colour, turbidity, nitrate, nitrite, ammonia and fluoride rates. During the period from 2005 to 2008, 1,759 samples were collected, being 1,356 from wells and 403 from springs. Among the samples from wells, 8.5% showed iron contents above the maximum allowed rate (MAR), 7.5% had apparent colour, 5.0% turbidity, 10.8% nitrate contents above the MAR, 0.4% ammonia, 0.3% nitrite and 1.1% fluorine above MAR. At the same period, 7.0% of spring water samples showed changes on parameters iron, 9.6% in colour, 5.2% in turbidity, 14.5% with nitrate above MAR, 1.0% for nitrite, 0.4% for ammonia and 0.2% with fluoride above MAR. According to these findings, the quality of the analyzed drinking water has to be monitored.

Key words. water, wells, springs.

INTRODUÇÃO

A água tem importância vital para todos os seres humanos e a avaliação de sua potabilidade e das condições higiênico-sanitárias são primordiais para a saúde da população. Para tanto, existem padrões de controle da sua qualidade atualmente regidos pela Portaria nº 518/2004 do Ministério da Saúde (MS)¹, que dispõe sobre as normas de qualidade para o consumo humano em sistemas de abastecimento público e soluções alternativas. Desta forma, a água é considerada própria para o consumo humano quando seus parâmetros microbiológicos e físico-químicos atendem aos padrões de potabilidade estabelecidos e não oferecem risco à saúde da população.

De acordo com a Sabesp², houve um aumento do uso de água subterrânea para o abastecimento público nas últimas décadas, principalmente no estado de São Paulo, considerado o maior usuário das reservas subterrâneas do país. Cerca de 65% da sua zona urbana é abastecida por poços artesianos e na região metropolitana de São Paulo, cerca de 3 milhões de habitantes recebem água proveniente de poços profundos.

Em São Paulo, a licença para perfuração e utilização de um poço é concedida pelo Departamento de Águas e Energia Elétrica - DAEE, que estabelece as normas que regem o projeto de construção de poços tubulares profundos e controlam sua utilização².

O objetivo deste trabalho foi reunir dados para avaliação do potencial de risco das águas provenientes de poços (águas subterrâneas) e minas (águas superficiais) de 100 municípios do Estado de São Paulo, incluindo a capital, levando em consideração o aspecto e a presença de depósito, além dos seguintes parâmetros fixados pela portaria nº 518 do MS: ferro, cor aparente, turbidez, nitrato, nitrito, amônia e fluoreto (flúor).

MATERIAL E MÉTODOS

No período de 2005 a 2008, foram coletadas 1759 amostras de águas, sendo 1356 de poços e 403 de minas de 100 municípios do Estado de São Paulo, incluindo a capital. As metodologias aplicadas para estas determinações foram: espectrofotometria de absorção atômica para ferro; espectrofotometria UV/VIS para nitrato, nitrito e amônia; turbidimetria para turbidez; nefelometria para cor; potenciometria para determinação de fluoreto. Os métodos utilizados estão descritos no livro de Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz³. A avaliação do aspecto

e da presença de depósito nas amostras foi realizada por observação visual.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nas análises das águas de poços e minas do Estado de São Paulo no período 2005-2008 estão apresentados na Tabela 1. Nesta tabela estão os valores máximos permitidos pela portaria nº 518 do Ministério da Saúde (MS) para os parâmetros avaliados: fluoreto, nitrato, nitrito, amônia, cor aparente, ferro e turbidez. Os resultados estão expressos em termos de porcentagens das amostras em desacordo com a mesma portaria.

O aspecto e a presença de depósito não estão incluídos na portaria nº 518 (MS). O aspecto límpido é uma característica para a água ser considerada potável, de consumo alimentar, pela norma técnica do Estado de São Paulo, a NTA 60⁴. Neste estudo estes critérios foram observados por se tratar da avaliação inicial do próprio consumidor.

Todas amostras que apresentaram aspecto alterado apresentaram também alterações em outros parâmetros, como por exemplo: água com aspecto turvo apresentava turbidez alterada, aspecto opalino apresentava ferro ou cor acima do VMP. Todas as amostras que apresentaram depósito também apresentaram turbidez e ferro acima do VMP.

Segundo a Tabela 1, o parâmetro com maior porcentagem de amostras em desacordo com a legislação é nitrato, chegando a atingir 15% em 2008, nas amostras de poços. O mesmo parâmetro se mostrou ainda mais crítico nas amostras de minas, também em 2008, quando ultrapassou os 30%.

O nitrato é tóxico aos seres humanos e se ingerido em excesso pode provocar a metahemoglobinemia infantil mais conhecida por “doença do sangue azul” dos bebês, onde é reduzido no organismo a nitrito, que por sua vez compete com o ferro pelo oxigênio livre na corrente sanguínea. Quando o nitrito está presente na água e é ingerido, este processo é ainda mais rápido. O nitrato também pode ser transformado em nitrosaminas e nitrosamidas, ambas carcinogênicas⁵. O valor máximo permitido para este contaminante é 10mg/L¹ e sua presença, bem como a do nitrito e da amônia, sugerem condições higiênico sanitárias insatisfatórias. Sabe-se que em muitas regiões isto pode significar que a quantidade de matéria orgânica na água aumentou, o que é um indicio de poluição ou provável degradação ambiental⁶. Efluentes de indústrias químicas, siderúrgicas, farmacêuticas, alimentícias, frigoríficos e matadouros podem contribuir com descargas de nitrogênio

orgânico e amoniacal⁶. A própria atmosfera também pode ser uma fonte de nitrogênio (como nitrato/nitrito/amônia) em função da biofixação desempenhada por bactérias e algas, que incorporam o nitrogênio em seus tecidos. Nas áreas agrícolas, pode haver escoamento das águas pluviais pelos solos fertilizados, e, nas áreas urbanas, as águas pluviais podem carregar alguma fonte de nitrogênio relacionada à deficiência de limpeza pública⁶.

Com relação às minas, a presença destes contaminantes nitrogenados pode ser devida à própria natureza da água superficial que tem maior exposição aos contaminantes externos. Nitrato, nitrito ou amônia, são considerados nutrientes nas águas naturais podendo concorrer para a eutrofização do meio e grandes quantidades de algas também prejudicam o sistema de abastecimento público⁶. A amônia, que é tóxica aos peixes

e consome o oxigênio dissolvido na água ao ser oxidada biologicamente⁶, esteve presente nas amostras de poços e de minas em valores inferiores a 1,1%. Isto já era esperado, pois ela se oxida rapidamente a nitrito, e este, a nitrato, ou é adsorvida pelas partículas do solo. Alaburda e Nishihara⁷ avaliaram compostos de nitrogênio em amostras de águas de poços da região metropolitana de São Paulo em 1998 e observaram que 4% delas apresentavam valores acima de 10mg/L. Não há muitos dados na literatura e não se pode afirmar se 2008 foi um ano atípico ou se trata de uma tendência que indica uma degradação ambiental. O monitoramento contínuo das águas de minas e poços é importante, uma vez que se observou um aumento nos teores de nitrato em água, que é um indicio de contaminação ambiental, e um aumento das doenças de veiculação hídrica.

Tabela 1. Porcentagem de amostras de águas de poços e minas com aspecto alterado, presença de depósito e em desacordo com parâmetros da portaria nº 518, no período de 2005 a 2008

Parâmetros avaliados	VMP ⁽¹⁾	2005		2006		2007		2008		Média dos anos	
		poços %	minas %	poços %	minas %	poços %	minas %	poços %	minas %	poços %	minas %
Fluoreto	1,5 mg/L	1,6	0,0	1,0	0,6	0,6	0,0	1,0	0,0	1,1	0,2
Nitrato (como N)	10 mg/L	9,4	8,5	7,7	7,1	10,9	10,2	15,3	32,1	10,8	14,5
Nitrito (como N)	1 mg/L	0,0	0,0	0,2	0,0	0,6	2,0	0,5	1,8	0,3	0,9
Amônia (como NH ₃)	1,5 mg/L	0,9	1,1	0,6	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,4
Cor aparente	15 uH ⁽²⁾	8,2	18,0	7,3	11,6	7,0	5,1	7,4	3,6	7,5	9,6
Ferro	0,3 mg/L	8,8	5,3	8,3	9,7	8,5	6,1	8,4	7,1	8,5	7,0
Turbidez	5 UT	2,8	3,2	5,6	7,7	7,6	7,1	4,0	3,6	5,0	5,2
Aspecto ⁽³⁾	límpido ⁽³⁾	1,6	3,2	4,0	5,8	2,6	2,0	1,5	3,6	2,4	1,0
Depósito ⁽³⁾	ausência ⁽³⁾	0,3	0,0	1,8	3,9	1,8	2,0	0,0	0,0	3,6	1,5

(1) Valor Máximo Permitido, fonte: Portaria nº518 do Ministério da Saúde (MS).; (2) Unidade Hazen (mg Pt-Co/L); (3) parâmetros não incluídos na Portaria nº518 do Ministério da Saúde (MS)

Os parâmetros cor e turbidez são indicativos da presença de sólidos dissolvidos em suspensão ou material em estado coloidal, sejam eles orgânicos ou inorgânicos (areia, argila); porém muitas vezes eles podem estar relacionados com a elevada concentração de ferro. Segundo os dados da Tabela 1, o ferro esteve presente em valores acima do permitido em cerca de 8,5% das amostras de águas de poços avaliadas, sendo que, no decorrer dos anos, a variação foi de 8,3 a 8,8%. Observou-se que, das 115 amostras com ferro acima do máximo permitido, 33 delas, cerca de 29%, também apresentaram cor e

turbidez em valores superiores aos da legislação. O ferro pode ser proveniente tanto da má condição da bomba do poço (encanamento enferrujado), ou mesmo da própria natureza das rochas, com a sua dissolução pelo gás carbônico da água. Com relação às amostras de águas de minas, 7% em média apresentaram valores superiores ao estabelecido pela legislação, mas este percentual não teve qualquer correlação com os dados de cor e turbidez. Nas águas superficiais o ferro pode ocorrer com a erosão das margens ou ainda ser produto dos efluentes industriais da região². A cor na água, neste caso, gera um impacto

estético, pode provocar manchas nas roupas e utensílios⁶, alterar o sabor da mesma e trazer problemas como depósitos em tubulações². O consumo excessivo de ferro pode causar uma doença chamada hematocromatose, que se caracteriza pelo depósito deste metal nos tecidos de órgãos como fígado, pâncreas, coração e hipófise⁶, e a sua presença pode favorecer o desenvolvimento das ferrobactéria, que não são prejudiciais à saúde mas dão cor e odor à água. Desta forma, sua determinação é essencial e o seu valor máximo permitido na Portaria nº 518 é 0,3mg/L.

Catorze amostras de águas de poços, cerca de 1% do total avaliado, apresentaram flúor em quantidade superior à permitida, que é de 1,5 mg/L. O flúor nestas amostras variou na faixa entre 1,77 a 18,0 mg/L, sendo que as duas das amostras que apresentaram os valores mais elevados, 13,7 e 18,0 mg/L foram provenientes da capital. Leva-se a crer que neste caso não é provável a presença natural de flúor e sim uma contaminação particular. Apenas uma amostra de água de mina apresentou flúor acima do valor permitido, 2,43 mg/L. O flúor pode estar presente naturalmente na água devido à presença de cristais de fluoreto nas rochas subterrâneas ou pode ser proveniente dos efluentes das indústrias de vidro e de fios condutores de eletricidade que descartam fluoretos². A presença de flúor deve ser rigorosamente controlada, pois tanto seu excesso como sua falta podem ser prejudiciais à saúde. Sua falta está relacionada à cárie dental⁸ e seu excesso pode causar entre outros a fluorose dentária (manchas esbranquiçadas nos dentes) e pode também ser um dos fatores que provocam a gengivite e a fluorose do esqueleto⁸. O fator protetor do flúor começa com uma concentração mínima de 0,5mg/L e vai até o máximo de 2,0. Entretanto, foi observado que numa concentração entre 0,9 e 1,2 mg/L, dependendo da quantidade de água ingerida, da exposição à outras fontes de flúor, já se pode observar uma leve fluorose dentária⁹. Fluorose do esqueleto pode ser observada quando a água de consumo apresenta de 3 a 6 mg de fluoreto por litro, principalmente quando o consumo desta água é alto⁹. Nas águas de poços e minas o valor máximo permitido é de 1,5mg/L, que também é o valor máximo recomendado pela Organização Mundial da Saúde. Acredita-se que concentrações acima deste valor aumentem o risco de fluorose dentária⁹.

Em muitas regiões onde a população não tem acesso à água de abastecimento público tratada, a água utilizada é proveniente de minas e poços. Estas águas geralmente apresentam características

físicas perfeitamente compatíveis com os padrões de potabilidade devido à ação de filtração lenta através das camadas permeáveis do solo; apresentam baixos teores de cor e turbidez, não sendo necessário sofrer processos de tratamento¹⁰. São isentas também de bactérias normalmente encontradas em águas superficiais, a não ser que o lençol esteja próximo de alguma fonte poluidora¹⁰. Considerando os resultados levantados neste estudo, torna-se evidente a importância do monitoramento da qualidade destas águas para um consumo seguro.

REFERÊNCIAS

1. Ministério da Saúde. Portaria nº 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativas ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade e dá outras providências. Diário Oficial da União. 26 mar 2004; Seção 1: 266.
2. Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo. SABESP Ensina. Intermediário. Poços Artesianos. [internet]. [acesso em 02/12/2009] Disponível em: (<http://www.sabesp.com.br/CalandraWeb/CalandraRedirect/?temp=4&proj=sabesp&pub=T&db=&docid=525EF64B81536513832571C6006B651E>).
3. Zenebon O, Pascuet NS, coordenadores. Métodos físico-químicos para análises de alimentos, 4ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2005.
4. São Paulo. Decreto Estadual nº12486 de 20 out 1978. Aprova normas técnicas especiais relativas a alimentos e bebidas. Norma Técnica Alimentar 60 Águas de consumo alimentar. Diário Oficial do Estado de São Paulo. 21 out 1978; Seção 1: 29.
5. Alaburda J, Nishihara L. Presença de compostos de nitrogênio em águas de poços. *Rev Saúde Pub*. 1998; 32(2):160-5.
6. Companhia Estadual de Tecnologia e Saneamento Ambiental. Qualidade das águas interiores no Estado de São Paulo. Apêndice A. Significado Ambiental e Sanitário das variáveis de qualidade das águas e dos sedimentos e metodologias analíticas e de amostragem. São Paulo: CETESB; 2008.
7. Battalha BHL, Parlatore AC, editores. Controle da qualidade da água para consumo humano. Bases Conceituais e operacionais. São Paulo: CETESB; 1993.
8. Fawell J, Bailey K, Chilton J, Dahi E, Fewtrell L, Magara Y, editores. Fluoride in Drinking-water. World Health Organization/WHO Drinking-water Quality Series. London: World Health Organization; 2006.
9. Moore JW. Inorganic Contaminants of Surface Water. Research and Monitoring Priorities. New York: Springer-Verlag;1991.
10. Pereira BEB, Yassuda ER, Martins J, Nogami PS, Gaglianone S, Oliveira WE, editores. Técnica de Abastecimento e tratamento de água. Vol 1. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. São Paulo: CETESB;1987.

Compostos bioativos e potencial antioxidante do pólen apícola produzido por abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.)

Bioactive compounds contents and antioxidant potential of bee pollen produced by africanized bees (*Apis mellifera* L.)

RIALA6/1283

Jeanne Denise de Souza MENEZES*, Leonardo Fonseca MACIEL, Maria Spinola MIRANDA, Janice Izabel DRUZIAN

*Endereço para correspondência: Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Rua Barão de Jeremoabo s/n, Campus de Ondina, CEP: 40170-290, Salvador-BA -Brasil. e-mail: xjdsmx@gmail.com

Recebido: 08.12.2009 – Aceito para publicação: 13.06.2010

RESUMO

A concentração de compostos bioativos e a atividade antioxidante do pólen apícola podem variar em função da origem botânica. Trinta e três amostras de pólen apícola da região de Alagoinhas-BA foram analisadas quanto aos teores de compostos fenólicos, flavonoides, carotenoides e atividade antioxidante e, também, foi avaliada a correlação dos compostos bioativos com os tipos polínicos *Mimosa pudica* e *Eucalyptus*. O teor dos compostos fenólicos e sua fração de flavonoides nas amostras com ocorrência de *Mimosa pudica* variaram, respectivamente, de 14,31 a 64,14mg em GAE.g⁻¹ de pólen e de 0,72 a 1,99mg e, nas amostras com ocorrência de *Eucalyptus* variaram, respectivamente, de 26,48 a 132,38mg em GAE.g⁻¹ de pólen e de 1,55 a 2,5mg. O teor de carotenoides totais variou de 18,16 a 764,37µg.g⁻¹ para o tipo polínico *Mimosa pudica* e de 3,01 a 46,08µg.g⁻¹ para o tipo polínico *Eucalyptus*. A atividade antioxidante variou de 37,94 a 91,81% e de 78,96 a 93,21%, respectivamente, nas amostras com ocorrência do tipo polínico *Mimosa pudica* e *Eucalyptus*. Foi constatada correlação positiva entre o tipo polínico *Eucalyptus* e o teor de compostos fenólicos, porém não foi observada associação estatisticamente significativa entre o tipo polínico *Mimosa pudica* e o teor de carotenoides.

Palavras chave. pólen apícola, atividade antioxidante, compostos fenólicos, flavonoides, carotenoides.

ABSTRACT

The concentration of bioactive compounds and antioxidant activity of pollen may vary depending on the botanical origin. Thirty-three samples of bee pollen from the region of Alagoinhas-BA were investigated on the concentrations of phenolic compounds, flavonoids, carotenoids and antioxidant activity, and the correlation between bioactive compounds and *Eucalyptus* and *Mimosa pudica* pollens was assessed. The phenolic compounds contents and of its flavonoid fraction in samples with the occurrence of *Mimosa pudica* ranged from 14.31 to 64.14 mg in GAE.g⁻¹ of pollen and from 0.72 to 1.99 mg, respectively; the samples with the occurrence of *Eucalyptus* ranged from 26.48 to 132.38 mg GAE.g⁻¹ of pollen and from 1.55 to 2.5 mg, respectively. The carotenoids contents ranged from 18.16 to 764.37 µg.g⁻¹ in *Mimosa pudica* pollen type, and from 3.01 to 46.08 µg.g⁻¹ in *Eucalyptus* pollen type. The antioxidant activity ranged from 37.94 to 91.81% and from 78.96 to 93.21% in samples with occurrence of *Eucalyptus* and *Mimosa pudica* pollen types, respectively. A positive correlation between the *Eucalyptus* pollen type and the phenolic compounds contents was found, however no statistically significant correlation was observed between the *Mimosa pudica* pollen type and carotenoids contents.

Key words. bee pollen, antioxidant activity, phenolic compounds, flavonoids, carotenoids.

INTRODUÇÃO

O pólen apícola é obtido da aglutinação de diferentes grãos de pólen de várias fontes vegetais colhidos pelas abelhas, os quais são misturados com néctar e secreções das glândulas hipofaringeanas, como as enzimas α e β -glicosidase, o que o torna diferente daqueles colhidos diretamente das plantas¹.

O valor nutritivo do pólen apícola varia de acordo com a espécie vegetal, das condições ambientais, das condições de secagem, temperatura e do tempo de armazenamento². Contém nutrientes como carboidratos, proteínas, aminoácidos, lipídeos, vitaminas e minerais, além de carotenoides, flavonoides e fitosteróis³, sendo este o motivo da sua utilização como alimento alternativo e/ou suplemento alimentar^{4,5}. Além das propriedades nutricionais, o pólen apícola tem se destacado no cenário científico devido às suas propriedades bioativas, como atividade antibacteriana⁶, antifúngica, anti-inflamatória, imunomodulatória e anticariogênica, exercendo funções antioxidante e inibindo a ação lesiva dos radicais livres⁷.

A composição dos produtos apícolas, e qualidade dos mesmos dependem muito das características das plantas visitadas pela *Apis mellifera*. Desta maneira, a identificação das plantas visitadas pelas abelhas é de fundamental importância para apicultores por indicar fontes de alimentos utilizadas para a coleta do néctar e do pólen, visando maximizar o aproveitamento dos recursos tróficos e apontando para características físico-químicas e nutricionais, tendo em vista que cada planta tem características diferenciadas, resultando em tipos nectarínicos e políferos múltiplos, principalmente em áreas de vegetação natural^{8,9,10}.

Mimosa pudica é considerada pelos apicultores como uma fonte potencialmente polinífera¹¹. Esta planta pode produzir 700 sementes, que germinam após a maturação, se houver condições favoráveis; caso contrário, permanecem dormentes por um período de até 15 anos¹². Ela é considerada pelos agricultores uma planta daninha^{13,14}, popularmente conhecida como dormideira, sensitiva, dorme-dorme, mimosa, erva-viva, malícia, entre outros, dependendo da região¹⁵.

As espécies de *Eucalyptus* têm produção variável de pólen, de modo que ora se enquadram como nectaríferas, ora como poliníferas¹⁶. O aumento das áreas reflorestadas com espécies desse gênero, em todo o estado, justifica o aumento na participação desse tipo polínico em várias regiões. Dentre as espécies botânicas fornecedoras de

alimento para as abelhas, o eucalipto é considerado um dos melhores e mais abundantes¹⁷.

Deste modo, o conhecimento da origem botânica torna-se imprescindível na caracterização nutricional e bioativa dos produtos apícolas. Este trabalho teve como objetivo verificar a correlação do teor de compostos fenólicos e sua fração de flavonoides, carotenoides totais e a atividade antioxidante do pólen apícola com ocorrência dos tipos polínicos *Mimosa pudica* e *Eucalyptus* produzido em um fragmento de mata ombrófila densa em estágio avançado de regeneração localizado no município de Alagoinhas-BA.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

O material experimental compreendeu 33 amostras de pólen apícola coletadas de setembro de 2007 a outubro de 2008, provenientes do apiário localizado no *Campus II* da Universidade do Estado da Bahia, situado no território do Litoral Norte da Bahia e Agreste do Município de Alagoinhas (12° 08' S, 38° 26' W; altitude 150 m).

O pólen apícola foi coletado por meio de um caça pólen, uma estrutura que apresenta uma grade de retenção com orifícios de 4 mm de diâmetro, por onde as abelhas passam. Como esse orifício é muito estreito, as bolotas de pólen são depositadas em um recipiente coletor e transferido para vasilhames de polietileno hermeticamente fechados e congelados a -18°C, onde permaneceu por no mínimo 48 horas. O pólen foi descongelado gradativamente em geladeira e foi feita uma limpeza manual, para a retirada de eventuais materiais estranhos e sujidades, como asas e pernas de abelhas, larvas secas e bolotas de própolis.

Depois da limpeza, o pólen foi desidratado em estufa elétrica a uma temperatura de 40°C \pm 2°C, como recomendado pela legislação vigente¹⁸. Todas as amostras foram trituradas, armazenadas em vasilhames de plástico e guardadas em freezer a -18°C para posterior análise.

Métodos

Identificação palinológica: cada amostra foi homogeneizada e 2 g de pólen foram dissolvidos em 20 mL de água destilada; a mistura foi centrifugada (2500 rpm durante 15 minutos) e o líquido sobrenadante descartado. O sedimento polínico foi submetido ao processo de acetólise de Erdtman¹⁹, que consiste na hidrólise ácida

aplicada aos grãos de pólen através de uma mistura de anidrido acético e ácido sulfúrico com proporção de 9:1. O sedimento resultante foi montado em lâminas com gelatina glicerizada. Para cada amostra foram montadas 5 lâminas e para determinar a porcentagem de cada tipo polínico encontrado foram contados ao todo 500 grãos de pólen por amostra, os quais foram identificados por comparação com a literatura.

Preparo do Extrato Etanólico do Pólen (EEP): foi preparado com aproximadamente 1 grama de pólen de cada amostra e 15 mL de etanol a 70% (v/v). A extração foi feita a 70°C em banho de água termostaticado, por 30 min, sob agitação constante, de acordo com a metodologia descrita por Zhishen et al²⁰. Depois de centrifugados a 4000 rpm, os sobrenadantes obtidos foram armazenados a 5°C, em tubos de ensaio com rosca.

Determinação de compostos fenólicos totais: foi determinado pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu²¹, utilizando ácido gálico como padrão de referência. Dos extratos de pólen foram retiradas uma alíquota de 20 µL e adicionado a 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu, diluído em água destilada 1:10 (v/v). A esses reagentes foram adicionados 2 mL de solução de carbonato de sódio a 4% (v/v). Após repouso de 2 horas em temperatura ambiente, foram realizadas as leituras em espectrofotômetro UV/VIS (PERKIN ELMER-LAMBDA 20) a 740 nm. O branco foi conduzido nas mesmas condições. Foi constituída uma curva analítica com ácido gálico e os resultados expressos em mg GAE.g⁻¹ de pólen²² (GAE: equivalente em ácido gálico). As análises foram realizadas em triplicata.

Determinação de flavonoides totais: foi determinada pelo método descrito por Zhishen et al²⁰. Uma alíquota de 1 mL do EEP foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL, foi adicionado 4 mL de água destilada, 0,3 mL de nitrito de sódio a 5%; aguardou-se 3 minutos, adicionou-se 0,3 mL de cloreto de alumínio a 10%; aguardou-se 1 minuto, adicionou-se 2 mL de hidróxido de sódio a 1M e completou-se o volume do balão com água destilada. As leituras foram feitas em espectrofotômetro (PERKIN ELMER-LAMBDA 20) em 510 nm. O branco foi conduzido nas mesmas condições, mas sem a adição da amostra. Uma curva analítica contendo 9,375; 18,75; 37,5; 75 e 150 ppm de epicatequina foi construída, e os resultados foram expressos em mg epicatequina.g⁻¹ de pólen apícola.

Determinação de carotenoides totais: foi utilizada 1,5 g de amostra triturada. A análise foi realizada em triplicata segundo a metodologia de Rodriguez-Amaya²³. Os carotenoides foram extraídos por maceração com acetona gelada e hiflosupercel, seguida por filtração à vácuo em funil sinterizado. Houve repetição deste procedimento até a completa extração destes pigmentos e, em seguida, foi feita partição com éter de petróleo para se obter o extrato. A quantificação dos carotenoides totais foi realizada na região do UV-VIS, utilizando-se um espectrofotômetro UV/VIS digital marca PERKIN ELMER, modelo U-2001 e quantificados segundo a “Lei de Beer” no comprimento de maior absorção. Os cálculos de carotenoides totais foram realizados utilizando o valor de 2592 ($E^{1\%}_{1\text{cm}}$) como coeficiente de absorção proposta de Davies²⁴: $\mu\text{g de carotenoides totais/g de amostra} = (\text{Absorbância máxima} \times \text{vol. da solução} \times 10^4) / (E^{1\%}_{1\text{cm}} \times \text{massa da amostra (g)})$.

Determinações da atividade antioxidante, através do sistema DPPH: foi determinada por meio da capacidade sequestrante do radical livre DPPH (2,2 difenil-1-picril-hidrazil) de acordo com o método de Yen e Wu²⁵. Uma alíquota de 100 µL da solução do EEP foi colocada em um tubo de ensaio contendo 4 mL da solução etanólica do radical DPPH (0,5 mM). Os extratos etanólicos de pólen foram avaliados na concentração de 67 mg.mL⁻¹. O decréscimo na absorbância em 517 nm foi determinado em espectrofotômetro (PERKIN ELMER-LAMBDA 20) após 30 min de reação para todas as amostras e padrões. O branco específico da amostra foi determinado usando DPPH 0,5 mM de cada concentração. Todas as determinações foram realizadas em triplicata. A porcentagem de atividade de sequestrante (%AA) foi determinada segundo a fórmula de Mensor et al²⁶: $\%AA = 100 - \{[(\text{Abs amostra} - \text{Abs branco}) \times 100] / \text{Abs controle}\}$, onde %AA: atividade antioxidante (%) e Abs: absorbância lida em 517 nm após 30 min de reação.

Análise Estatística: foi utilizado Coeficiente de Correlação de Spearman para medir a correlação obtida por métodos não paramétricos. Este coeficiente considera o posto das observações e não os valores das variáveis, logo, a magnitude dos valores observados não tem relevância. Não foi utilizado o Coeficiente de Correlação de Pearson porque este é indicado apenas quando os dados seguem distribuição normal bivariada. A correlação entre o teor de compostos fenólicos, flavonoides, a atividade antioxidante, carotenoides totais e tipos polínicos foi realizada utilizando o Programa Statistica 8.0²⁷.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 33 amostras analisadas foram observados pólen de diferentes tipos polínicos, onde os tipos mais frequentes foram *Mimosa pudica* (família Leguminosae-mimosoideae), que foi encontrado em 22 amostras com frequência variando de 9 a 95,6% (Tabela 1), e *Eucalyptus* (família Myrtaceae), que foi encontrada em 11 amostras com frequência variando de 14,2 a 99,2% (Tabela 2).

Os tipos polínicos de menor frequência foram: *Schinus terebinthifolius*, *Ageratum conyzoides*, *Emilia*, *Eupatorium*, *Trichogonia*, *Vernonia*, *Cecropia*, *Cróton*,

Mimosa caesalpinifolia, *Mimosa pudica*, *Mimosa quadrivalves*, *Eucalyptus*, *Eugenia*, *Piper*, *Paspalum*, *Cocoloba*, *Richardia*, *Solanum*, *Solanum 2*, *Angelonia* (Apêndice A, B e C).

Compostos fenólicos totais

O teor dos compostos fenólicos das amostras de pólen com ocorrência de *Mimosa pudica* variou de 14,31 a 64,14 mg em GAE.g⁻¹ de pólen, com um teor médio de 33,34 ± 0,46 mg GAE.g⁻¹ de pólen, usando uma curva padrão de ácido gálico (R² = 0,9902) (Tabela 1).

Tabela 1. Teor de compostos fenólicos totais, flavonoides totais, carotenoides e atividade antioxidante (DPPH) em amostras com ocorrência do tipo polínico *Mimosa pudica*

Amostras	<i>Mimosa pudica</i> (%)	Compostos fenólicos (mg GAE*.g ⁻¹ ± DP**)	Flavonoides totais (mg epicatequina.g ⁻¹ ± DP)	Carotenoides	Atividade antioxidante DPPH***
1	90,8	25,22 ± 0,62	0,93 ± 0,07	164,91 ± 3,24	83,67 ± 0,42
2	90,8	23,70 ± 0,29	1,16 ± 0,01	100,23 ± 1,25	91,81 ± 0,31
3	86,6	22,09 ± 0,27	0,72 ± 0,02	327,35 ± 0,81	85,92 ± 1,48
4	94	27,60 ± 0,23	0,77 ± 0,01	119,86 ± 2,1	81,14 ± 3,93
5	55	64,14 ± 0,41	1,62 ± 0,01	339,67 ± 3,02	88,58 ± 0,30
6	80,4	31,88 ± 0,25	0,82 ± 0,02	275,57 ± 1,29	89,33 ± 0,65
7	65,2	51,27 ± 0,43	1,30 ± 0,00	157,86 ± 3,67	83,79 ± 1,45
8	40	30,79 ± 0,37	0,78 ± 0,03	764,37 ± 4,25	85,50 ± 1,84
9	49,4	38,53 ± 0,17	1,35 ± 0,00	188,08 ± 4,03	87,86 ± 0,13
10	58,2	33,57 ± 0,66	0,97 ± 0,01	31,16 ± 0,69	80,14 ± 0,66
11	9	57,34 ± 0,33	1,99 ± 0,01	218,73 ± 5,13	89,33 ± 0,20
12	27	60,51 ± 0,17	1,78 ± 0,00	302,61 ± 4,23	91,33 ± 0,05
13	54,8	22,19 ± 0,19	0,78 ± 0,08	50,28 ± 0,23	89,22 ± 0,57
14	95,6	27,73 ± 0,70	1,23 ± 0,00	99,32 ± 1,34	76,02 ± 1,29
15	85,6	35,00 ± 0,43	1,01 ± 0,00	219,54 ± 4,03	84,07 ± 0,12
16	88	35,10 ± 0,54	1,36 ± 0,02	205,36 ± 0,48	75,85 ± 13,6
17	50,75	37,80 ± 0,37	0,99 ± 0,18	157,52 ± 2,04	86,82 ± 1,03
18	55,5	32,71 ± 2,28	0,72 ± 0,09	41,48 ± 2,53	88,05 ± 0,12
19	83,8	14,31 ± 0,10	1,52 ± 0,02	60,24 ± 0,75	84,20 ± 0,44
20	70,1	18,47 ± 0,16	0,83 ± 0,06	331,28 ± 0,84	88,03 ± 0,47
21	72	18,84 ± 0,53	0,84 ± 0,01	52,24 ± 1,62	84,00 ± 0,93
22	82,8	24,81 ± 0,77	0,79 ± 0,02	18,16 ± 1,54	37,94 ± 1,80
Vmin	9	14,31	0,72	18,16	37,94
Vmax	95,6	64,14	1,99	764,37	91,81
MÉDIA ± DP	67,51	33,34 ± 0,46	1,10 ± 0,03	192,08 ± 2,23	83,3 ± 1,44
CV****	----	0,01	0,02	0,01	0,01

*GAE: equivalente em ácido gálico; **DP: Desvio padrão de análises em triplicata; ***2,2 difenil-1-picril-hidrazil, ****Coeficiente de variação

Tabela 2. Teor de compostos fenólicos totais, flavonoides totais, atividade antioxidante (DPPH) e carotenoides em amostras com ocorrência do tipo polínico *Eucalyptus*

Amostras	<i>Eucalyptus</i> (%)	Compostos fenólicos (mg GAE*.g ⁻¹ ± DP**)	Flavonoides totais (mg epicatequina.g ⁻¹ ± DP)	Carotenoides	Atividade antioxidante DPPH***
23	87,6	45,99 ± 0,50	1,62 ± 0,01	22,03 ± 0,58	90,73 ± 1,13
24	95,6	27,06 ± 0,58	2,50 ± 0,01	13,67 ± 1,02	90,19 ± 0,57
25	93,4	27,58 ± 1,29	2,03 ± 0,03	31,20 ± 1,35	92,47 ± 0,14
26	95,8	85,03 ± 1,28	1,81 ± 0,05	22,35 ± 1,67	91,58 ± 0,90
27	95,8	65,17 ± 0,59	1,99 ± 0,09	22,36 ± 0,42	88,22 ± 0,53
28	99,2	91,38 ± 1,09	2,49 ± 0,09	30,20 ± 0,86	83,18 ± 0,32
29	99,2	132,38 ± 0,70	2,20 ± 0,12	22,09 ± 0,58	87,40 ± 0,54
30	60,6	54,59 ± 1,35	2,20 ± 0,05	3,01 ± 1,04	90,66 ± 0,19
31	93,2	72,96 ± 1,69	2,05 ± 0,01	34,55 ± 1,85	88,69 ± 0,72
32	94	117,51 ± 1,04	2,03 ± 0,13	35,55 ± 1,65	93,21 ± 0,70
33	14,2	26,48 ± 0,20	1,55 ± 0,12	46,08 ± 0,12	78,96 ± 0,87
Vmin	14,2	26,48	1,55	3,01	78,96
Vmax	99,2	132,38	2,5	46,08	93,21
MÉDIA ± DP	84,31	67,83 ± 0,93	2,04 ± 0,06	25,73 ± 1,01	88,66 ± 0,60
CV****	-----	1,24	0,45	0,02	0,00

*GAE: equivalente em ácido gálico; **DP: Desvio padrão de análises em triplicata; ***2,2 difenil-1-picril-hidrazil, ****Coeficiente de variação

Valor médio similar foi encontrado por Carpes⁹ para 36 amostras de pólen apícola desidratado de diferentes localidades da região sul do Brasil, com um teor médio de 30,77 mg em GAE.g⁻¹ de pólen, entretanto houve uma variação menor (19,28 a 48,90 mg GAE.g⁻¹ de pólen), ressaltando a diferença da localização geográfica na composição da matriz.

Nas amostras com ocorrência de *Eucalyptus* o teor de compostos fenólicos variou de 26,48 a 132,38 mg

em GAE.g⁻¹ de pólen, com um teor médio de 67,83 ± 0,93 mg GAE.g⁻¹ de pólen, usando uma curva padrão de ácido gálico (R² = 0,9902) (Tabela 2).

Foi constatado, através do Coeficiente de Correlação de Spearman, que existe associação linear correlação negativa entre o teor de compostos fenólicos totais e o tipo polínico *Mimosa pudica* (r_s = -0,5066) e correlação positiva com o tipo polínico *Eucalyptus* (r_s = 0,6666) (Tabela 3).

Tabela 3. Valores da correlação de Spearman entre o teor de compostos fenólicos totais, flavonoides totais, atividade antioxidante e carotenoides totais com a frequência dos tipos polínicos *Mimosa pudica*⁽¹⁾ e *Eucalyptus*⁽²⁾

	Coeficiente	<i>Mimosa pudica</i>	<i>Eucalyptus</i>
Compostos fenólicos	r _s	-0,5066	0,6666
	p	0,01*	0,02*
Flavonoides	r _s	-0,2164	0,4335
	p	0,33	0,18
Carotenoides	r _s	-0,2242	-0,1370
	p	0,31	0,69
Atividade antioxidante	r _s	-0,5124	-0,1461
	p	0,01*	0,67

(1)N = 22; (2)N = 11; rs: Coeficiente de Correlação de postos de Spearman; p: probabilidade associada ao teste. * e **Significativo a 5 e 1% de probabilidade

Os resultados aqui apresentados estão em sintonia com Menezes², que afirmava que o valor nutritivo do pólen varia especialmente em relação à espécie vegetal, entre outros parâmetros (condições ambientais, condições de secagem e tempo de armazenamento).

Flavonoides totais

Os teores de flavonoides totais expressos em mg epicatequina/g de pólen apícola variaram de 0,72 a 1,99 mg.g⁻¹, com média de 1,10 ± 0,03 mg.g⁻¹ de pólen, com ocorrência do tipo polínico *Mimosa pudica*, e de 1,55 a 2,5 mg.g⁻¹, com média de 2,04 ± 0,06 mg.g⁻¹ de pólen, ambos quantificados através de uma curva padrão de epicatequina (R² = 0,9998). Assim como para os teores de compostos fenólicos, os maiores teores de flavonoides foram encontrados nas amostras provenientes do tipo polínico *Eucalyptus* (Tabela 2).

Os teores de flavonoides totais não apresentaram correlação com os tipos polínicos estudados, porém uma relação positiva estatisticamente significativa (p<0,05)

foi obtida com compostos fenólicos (r_s=0,6370) e com a atividade antioxidante (r_s=0,3997) e uma correlação negativa com carotenoides (r_s=-0,4669) (Tabela 4).

Leja et al²⁸ estudaram os constituintes fenólicos e a capacidade antioxidante do pólen apícola de 12 espécies diferentes da região da Krakow (Polônia). Neste estudo foi verificado que a contribuição dos flavonoides no teor de compostos fenólicos diferia consideravelmente em função da origem botânica, com variação de 170 mg.100g⁻¹ nos pólen de *Lamium purpureum* a 1349 mg.100g⁻¹ nos pólen de *Pyrus communis*.

Os valores de flavonoides das amostras analisadas foram menores que as encontradas para matrizes oriundas de outras origens polínicas. Muitos autores relatam que esta diferença significativa no teor de flavonoides está relacionada com os tipos polínicos das amostras. Os resultados obtidos por Almaraz-Abarca et al²⁹ demonstram que o pólen de *Prosopis juliflora* (Leguminosae) em Durango, México apresentou uma quantidade significativa de flavonoides (9.794 µg.ml⁻¹), podendo ser considerado como uma fonte natural de antioxidante.

Tabela 4. Valores da correlação de Spearman entre o teor de compostos fenólicos totais, flavonoides totais, atividade antioxidante e carotenoides⁽¹⁾

	Coefficiente	Compostos fenólicos	Flavonoides	Atividade antioxidante
Flavonoides	r _s	0,6370	-	-
	p	0,00**	-	-
Atividade antioxidante	r _s	0,2867	0,3997	-
	p	0,00**	0,02*	-
Carotenoides	r _s	-0,1888	-0,4669	-0,0939
	p	0,29	0,00**	0,60

(1)N = 33; rs: Coeficiente de Correlação de postos de Spearman; p: probabilidade associada ao teste. * e **Significativo a 5 e 1% de probabilidade

Carotenoides totais

O teor de carotenoides totais variou de 18,16 a 764,37 µg.g⁻¹, com uma média de 192,08 ± 2,23µg.g⁻¹, para o tipo polínico *Mimosa pudica* e de 3,01 a 46,08 µg.g⁻¹, com uma média de 25,73 ± 1,01 µg.g⁻¹, para o tipo polínico *Eucalyptus* (Tabela 1 e 2). Não foi constatado correlação significativa entre o teor de carotenoides e os tipos polínicos *Mimosa pudica* e *Eucalyptus*.

Melo et al⁸ encontraram em seu estudo correlação positiva entre os teores de carotenoides em pólen apícola com maiores porcentagens dos tipos polínicos Arecaceae tipo *Astrocaryum* (r = 0,79), Cecropia (r = 0,84) e

Fabaceae (0,92) e correlação negativa nos polens dos tipos Mimosaceae tipo *Mimosa caesalpiniaefolia* (r = -0,73) e Poaceae (r = -0,65).

Almeida-Muradian et al³, em dez amostras de pólen fresco coletado por *Apis mellifera*, verificaram que a média de carotenoides obtida foi de 76,33 µg.g⁻¹ de pólen. O total de carotenoides apresentado por Melo et al⁸ para amostras oriundas de Pariquera-Acu-SP variaram de 25,34 a 268,5 µg.g⁻¹ de pólen mg por carotenos.100 g⁻¹.

Em outro estudo, Mello e Almeida-Muradian³⁰ encontraram valores para pólen apícola desidratado que variaram de 3,4 ± 0,09 µg.g⁻¹ de b-caroteno a 77,88 ± 5,01 µg.g⁻¹. No entanto, Almeida-Muradian et al³ analisaram

dez amostras de pólen apícola da Região Sul do Brasil e não encontraram b-caroteno nas amostras analisadas.

Atividade antioxidante (DPPH)

Neste estudo a neutralização do radical DPPH variou de 37,94 a 91,81% nas amostras com ocorrência do tipo polínico *Mimosa pudica* e de 78,96 a 93,21% nas amostras com ocorrência do tipo polínico *Eucalyptus*, com uma média de $83,3 \pm 1,44\%$ e de $88,66 \pm 0,60\%$, respectivamente, para *Mimosa pudica* e *Eucalyptus* (Tabela 1 e 2).

Foi constatada correlação positiva entre atividade antioxidante (DPPH) e o teor de flavonoides totais ($r_s = 0,3997$) (Tabela 4). Esta correlação também foi encontrada por Leja et al²⁸, que verificaram que as amostras que apresentaram altos índices de constituintes fenólicos também apresentaram alta capacidade antioxidante. Porém, em estudos realizados por Campos et al³¹ não se constatou correlação entre flavonoides e atividade antioxidante.

Alguns autores relataram estudos correlacionando os tipos polínicos às características bromatológicas presentes no pólen. Modro et al³² avaliaram a influência das composições florísticas locais sobre a qualidade do pólen apícola, em dois apiários de Minas Gerais, e verificaram que as diferentes composições florísticas influenciam na qualidade do pólen apícola.

Leja et al²⁸ coletaram 20 amostras de pólen apícola proveniente de Krakow na Polônia e encontraram predominância de 12 espécies de plantas. Estes pesquisadores encontraram uma grande variedade quanto à atividade antioxidante nas amostras analisadas, variando de 8,6 - 91,5% de neutralização do radical DPPH. Os pólenes de *Lupinus polyphyllus*, *Phacelia tanacetifolia*, *Trifolium sp.*, *Sinapis alba*, *Robinia pseudoacacia* e *Aesculus hippocastanum* apresentaram a maior capacidade de neutralização do radical DPPH (61-91,3%); os pólen de *Zea mays*, *Chamerion angustifolium*, *Pyrus communis* apresentaram (23,5 - 29,6%) e baixa atividade (8,6 - 16%) nos pólen de *Lamium purpureum*, *Taraxacum officinale* e *Malus domestica*.

Carpes et al⁹ encontraram atividade antioxidante nos extratos de pólen mensurada pelo método do DPPH que variou de 30,54 a 94,73%, com uma média de $73,44 \pm 21,10\%$. As variações observadas tiveram como justificativa as diferentes composições das plantas de origem do pólen coletado.

CONCLUSÃO

Foi constatado, através do Coeficiente de Correlação de Spearman, que os compostos fenólicos totais apresentaram associações lineares e correlações negativas com o tipo polínico *Mimosa pudica* e positivas com o tipo polínico *Eucalyptus* (família Myrtaceae). Assim sendo, a ocorrência do tipo polínico *Eucalyptus* contribui para altos teores de compostos fenólicos do pólen.

Nas amostras provenientes do tipo polínico *Mimosa pudica* (família Leguminosae-mimosoideae) foram encontrados os maiores teores de carotenoides, porém não foi detectada uma relação estatisticamente significativa entre o tipo polínico *Mimosa pudica* e o teor de carotenoides.

Através dos resultados apresentados neste estudo, pode-se constatar que o teor de compostos fenólicos totais, flavonoides totais, atividade antioxidante e carotenoides totais de pólen oriundo de Algoíngas-BA, sofreram influência quanto à origem botânica.

REFERÊNCIAS

1. Couto RHN, Couto LA. Apicultura: Manejo e Produtos. 3ª ed. Jabotical (SP): FUNEP; 2006.
2. Menezes JDS. Avaliação das práticas de colheita, beneficiamento e armazenamento do mel de *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera: Apidae) no Litoral Norte da Bahia, através de análises físico-químicas. [monografia]. Salvador: Universidade Federal da Bahia; 2005. Especialização em Segurança e Inspeção de Alimentos.
3. Almeida-Muradian LB, Pamplona LC, Coimbra S, Barth OM. Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. *J Food Compos Anal*. 2005;18:105-11.
4. Somerville DC. Lipid content of honey bee-collected pollen pellets from south-east Australia. *Aust J Exp Agr*. 2005;45:1659-61.
5. Somerville DC, Nicol HI. Crude protein and amino acid composition of honey bee-collected pollen pellets from south-east Australia and note on laboratory disparity. *Aust J Exp Agr*. 2006;46:141-9.
6. Carpes ST, Begnini R, Alencar SM, Masson ML. Study of preparations of bee pollen extracts, antioxidant and antibacterial activity. *Ciênc Agrotec*. 2007; 31(6): 1818-25.

7. Neves LC, Alencar SM, Carpes ST. Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonoides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellifera*. VII BMCFB; junho de 2009; Lorena - SP: Braz J Food Technol. p. 107-10.
8. Melo ILP, Freitas AS, Barth OM, Almeida-Muradian LB. Relação entre a composição nutricional e a origem floral de pólen apícola desidratado. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2009; 68(3):346-53.
9. Carpes ST, Cabral ISR, Luz CFP, Capeletti JP, Alencar SM, Masson ML. Palynological and physical-chemical characterization of *Apis mellifera* L. bee pollen in the Southern region. *Int J Food Agric Environ*. 2009;7:132-8.
10. Barreto LMRC, Funari SRC, Orsi RO, Dib APS. Produção de Pólen no Brasil. Taubaté-SP: Cabral Editora e Livraria Universitária; 2006. p. 99.
11. Demartelaere ACF, Oliveira AK, Góes GB, Lima GKL, Pereira MFS. A flora apícola no semi - árido brasileiro. *Rev Verde*. 2010; 5(1): 17-22.
12. Silva AMA, Coelho ID, Medeiros PR. Levantamento florístico das plantas daninhas em um parque público de Campina Grande, Paraíba, Brasil. *Biotemas*. 2008; 21(4):7-14.
13. Albertino SMF, Miléo LJ, Silva JF, Silva CA. Composição florística de plantas daninhas em um lago do Rio Solimões, Amazonas. *Planta Daninha*. 2009; 27(1):1-5.
14. Santos LS, Oliveira MN, Guilhon GMSP, Santos AS, Ferreira ICS, Lopes-Júnior ML et al. Potencial herbicida da biomassa e de substâncias químicas produzidas pelo fungo endofítico *Pestalotiopsis guepinii*. *Planta Daninha*. 2008; 26(3): 539-48.
15. Barbosa JD, Silveira JAS, Albernaz TT, Silva NS, Belo-Reis AS, Oliveira CMC, Riet-Correa G; Barbosa Marcos DD. Lesões de pele causadas pelos espinhos de Mimosa pudica (Leg. Mimosoideae) nos membros de bovinos e ovinos no estado do Pará. *Pesq Vet Bras*. 2009; 29(5):435-48.
16. Barth OM. Análise polínica de mel: avaliação de dados e seu significado. *Mensagem doce*. São Paulo: 2005; 81. maio.
17. Luz CFP, Thomé ML, Barth OM. Recursos tróficos de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae) na região de MorroAzul do Tinguá, Estado do Rio de Janeiro. *Rev Bras Bot*. 2007; 30(1): 29-36.
18. Brasil. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 11, de 20/10/2000. Padrão de Identidade e Qualidade do Mel. *Diário Oficial da União*, Brasília (2001 jan 23); Sec.1:p.18-23. [acesso 2007 fev 25]. Disponível em [http://www.agricultura.gov.br//das/dispoa/instrunormativa11.htm].
19. Erdtman G. The acetolysis method. A revised description. *Svensk Botanisk Tidskrift*. 1960; 39:561-4.
20. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem*. 1999; 64: 555-9.
21. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Viticult*. 1965; 16: 144-58.
22. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*. 1999; 299: 152-78.
23. Rodriguez-Amaya D, Raymundo LC, Tung-Ching L, Simpson KL, Chichester CO. Carotenoid pigment changes in ripening *Momordica charantia* fruits. *Ann Bot*. 1976; 40: 615-24.
24. Davies BH. Carotenoids, *In: Goodwin TW*. 2ª ed. Chemistry and biochemistry of plant pigments. London: Academic Press; 1976. p. 38-65.
25. Yen G, Wu J. Antioxidant and radical scavenging properties of extracts from *Ganoderma tsugae*. *Food Chem*. 1999; 65: 375-9.
26. Mensor LL, Menezes FS, Leitão GG, Reis AS, Santos TC, Coube CS, Leitão SG. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother Res*. 2001; 15: 127-30
27. *Statistica Version 8.0 for Windows*. Tulsa: StatSoft; 2007.
28. Leja M, Mareczek A, Wyzgolik G, Klepacz-Baniak J, Czekonska K. Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. *Food Chem*. 2007; 100(1): 237-40.
29. Almaraz-Abarca N, Campos MG, Ávila-Reyes JA, Naranjo-Jiménez N, Herrera-Corral J, González-Valdez LS. Antioxidant activity of polyphenolic extract of monofloral honeybeecollected pollen from mesquite (*Prosopis juliflora*, Leguminosae). *J Food Compos Anal*. 2007; 20: 119-24.
30. Melo ILP, Almeida-Muradian LB. Avaliação das vitaminas antioxidantes no pólen apícola desidratado. XI Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da FCF/USP. XLI Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica. XXI Seminário de Pós-Graduação. 14ª Reunião de Iniciação Científica; 2006; São Paulo: *Rev Bras Ciênc Farm*. 42: p. 55.
31. Campos MG, Webby RF, Markham KR, Mitchell KA, Cunha AP. Age-induced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and the contribution of constituent flavonoids. *J Agric Food Chem*. 2003; 51: 742-5.
32. Modro AFH, Message D, Luz CFP, Meira-Neto JAA. Composição e qualidade de pólen apícola coletado em Minas Gerais. *Pesq Agrop. Bras*. 2007; 42(8): 1057-65.

Apêndice A. Percentual dos tipos polínicos observados nas amostras de pólen apícola

Imagem ¹	Tipos polínicos	Amostras de pólen apícola (%)																
		01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17
1	Anacardiaceae <i>Schinus</i>										15							
2	Asteraceae <i>Ageratum</i>								10			8			5,2	5,4		
3	Asteraceae <i>Emilia</i>									5		18,6	6,8	19,8				
4	Asteraceae <i>Eupatorium</i>																	
5	Asteraceae <i>Trichogonia</i>								5,4			6,6						
6	Asteraceae <i>Vernonia</i>											7						
7	Capparaceae <i>Cecropia</i>											7,8						
8	Euphorbiaceae <i>Croton</i>							5,8										
9	Leguminosae (mimosoideae) <i>Mimosa caesalpinifolia</i>								10									
10	Leguminosae (mimosoideae) <i>Mimosa pudica</i>	90,8	90,8	86,6	94	55	80,4	65,2	40	49,4	58,2	9	27	54,8	95,6	85,6	88	50,7
11	Leguminosae (mimosoideae) <i>Mimosa quadrivalves</i>													6,4				
12	Myrtaceae <i>Eucalyptus</i>																	
13	Myrtaceae <i>Eugenia</i>																	
14	Piperaceae <i>Piper</i>																	39,1
15	Poaceae <i>Paspalum</i>																	
16	Polygonaceae <i>Coccoloba</i>											5,2						
17	Rubiaceae <i>Richardia</i>									9								
18	Solanaceae <i>Solanum</i>					29			16,8	15,6		24,6	21,8					
19	Solanaceae <i>Solanum</i> 2										5,2		12,2					
20	Scrophulariaceae <i>Angelonia</i>									5,6								
21	Outra Origem Botânica	9,2	9,2	13,4	6	16	13,8	24,8	27,8	15,4	21,8	21	24,2	19	4,4	9,2	6,6	10,1

1. Imagens de microscopia ótica (Apêndice C)

Apêndice B. Percentual dos tipos polínicos observados nas amostras de pólen apícola (continuação)

Imagem ¹	Tipos polínicos	Amostras de pólen apícola (%)																
		18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	
A	Anacardiaceae <i>Schinus</i>																	
B	Asteraceae <i>Ageratum</i>																	
C	Asteraceae <i>Emilia</i>																	
D	Asteraceae <i>Eupatorium</i>			8		8,8												
E	Asteraceae <i>Trichogonia</i>																	
F	Asteraceae <i>Vernonia</i>																	
G	Capparaceae <i>Cecropia</i>			8,6														
H	Euphorbiaceae <i>Croton</i>																	70
I	Leguminosae (mimosoideae) <i>Mimosa caesalpinifolia</i>																	
J	Leguminosae (mimosoideae) <i>Mimosa pudica</i>	55,5	83,8	70,1	72	82,8												
L	Leguminosae (mimosoideae) <i>Mimosa quadrivalves</i>											95,8	99,2	99,2	60,6	93,2	94	14,2
M	Myrtaceae <i>Eucalyptus</i>						87,6	95,6	93,4	95,8				36,4				
N	Myrtaceae <i>Eugenia</i>																	
O	Piperaceae <i>Piper</i>	20,6	6,2		22,2	6,6												7,8
P	Poaceae <i>Paspalum</i>																	
Q	Polygonaceae <i>Coccoloba</i>																	
R	Rubiaceae <i>Richardia</i>																	
S	Solanaceae <i>Solano</i>																	
T	Solanaceae <i>Solano</i> 2																	
U	Scrophulariaceae <i>Angelonia</i>											4,2	0,8	0,8	3	6,8	6	8
V	Outra Origem Botânica	23,9	10	13,3	5,8	1,8	12,4	4,4	6,6	4,2								

1. Imagens de microscopia ótica (Apêndice C)

Apêndice C - Fotos de microscopia ótica

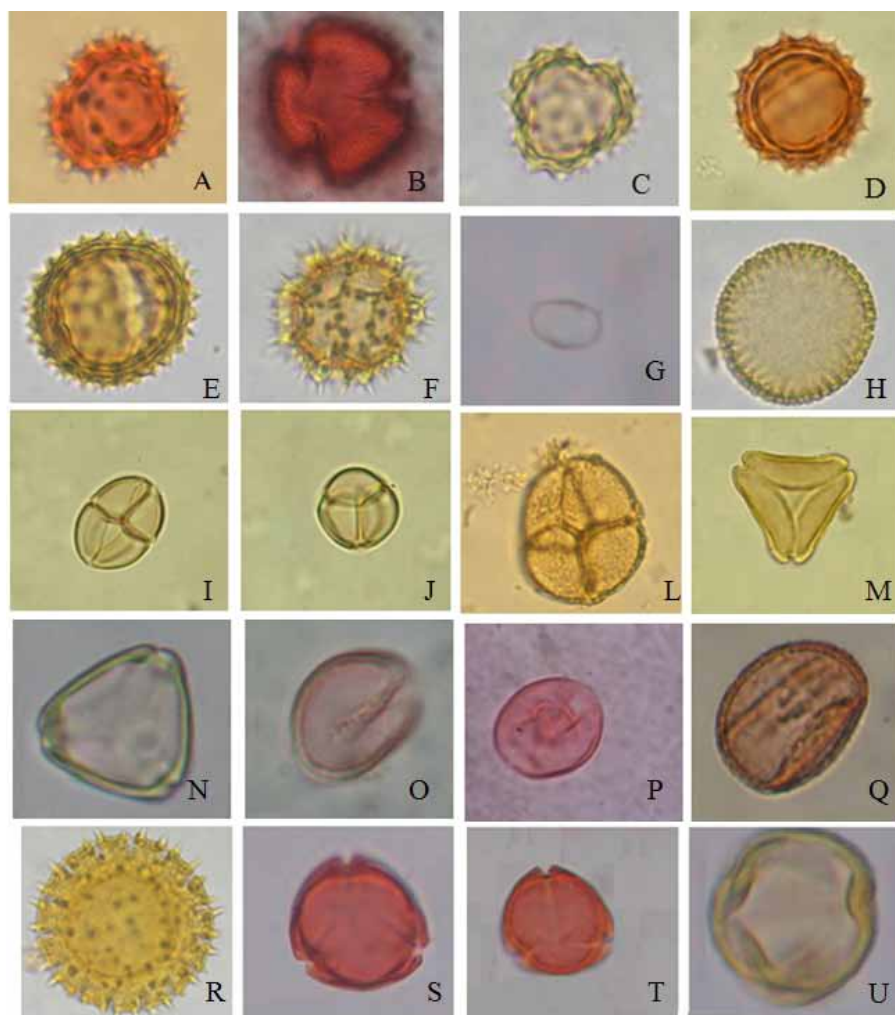


Figura 2. Principais tipos polínicos encontrados nas amostras de pólen apícola do apiário do Campus II UNEB/Alagoinhas, de 2007 a 2008: A - *Schinus* (Anacardiaceae); B - *Ageratum* (Asteraceae); C - *Emilia* (Asteraceae); D - *Eupatorium* (Asteraceae); E - *Trichogonia* (Asteraceae); F - *Vernonia* (Asteraceae); G - *Cecropia* (Capparaceae); H - *Croton* (Euphorbiaceae); I - *Mimosa caesalpinifolia* (Leguminosae - Mimosoideae); J - *Mimosa pudica* (Leguminosae - Mimosoideae); L - *Mimosa quadrivalves* (Leguminosae - Mimosoideae); M - *Eucalyptus* (Myrtaceae); N - *Eugenia* (Myrtaceae); O - *Piper* (Piperaceae); P - *Paspalum* (Poaceae); Q - *Coccoloba* (Polygonaceae); R - *Richardia* (Rubiaceae); S - *Solanum* (Solanaceae); T - *Solanum2* (Solanaceae); U - *Scrophulariaceae Angeloni*. (Aumento de 1.000X)

Análise das proteínas e estudo reológico dos isolados proteicos das amêndoas da faveleira (*Cnidosc ulus phyllacanthus* (Mart.) Pax. et K. Hoffm.) com e sem espinhos

Analysis on rheological properties of proteins isolated from nuts from *faveleira* trees (*Cnidosc ulus phyllacanthus* (Mart.) Pax. et K. Hoffm.) with and without thorns

RIALA6/1284

Mônica Tejo CAVALCANTI^{1*}, Pushkar Singh BORA²

Endereço para correspondência: ^{1}Departamento de Pós-graduação de Engenharia de Processos, Universidade Federal de Campina Grande. Rua Clementino Siqueira, 635C, Jardim Tavares. Campina Grande, PB – Brasil - CEP 58402-070. Tel. (83) 3334-1267 / 9969-5537. e-mail: monicatejoc@yahoo.com.br

²Departamento de Ciências e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba. CEP - 58059-900. Tel.: (83) 3216-7269. Campus Universitário I, João Pessoa, PB - Brasil

Recebido: 13.08.2009 – Aceito para publicação: 27.04.2010

RESUMO

A faveleira possui amêndoas com potencial em óleos e proteínas alimentares e é encontrada no Nordeste brasileiro, principalmente nas regiões do sertão e caatinga. As proteínas contidas nas amêndoas das variedades da faveleira com (FCE) e sem (FSE) espinhos foram isoladas, classificadas e estudadas quanto à viscosidade para o seu possível uso como alternativo ingrediente alimentar. As sementes de ambas variedades apresentaram elevadas concentrações proteicas com, respectivamente, 26,20% e 30,70%. Quando desengorduradas, estas passaram a 57,55 e 63,00%. A fração de globulina apresentou-se mais expressiva (63,37 e 63,91%). O isolado proteico apresentou teores de proteínas solúveis de 81,08% e 90,02%. Quando analisadas por eletroforese, apareceram quatro subunidades na faixa de PM de 40,8 a 20,2 kDa para a amêndoa da FCE e sete subunidades na faixa de 60,5 a 21,1 kDa para a da FSE. Quanto à viscosidade, foram analisadas as concentrações de 1, 3, 5 e 7% de isolado proteico e observou-se uma relação de dependência positiva da viscosidade com a concentração de proteína. O isolado proteico da FSE mostrou maior viscosidade que a de FCE. Como a faveleira possui alto teor de proteína, independentemente da sua variedade, sugere-se a sua possível utilização como ingrediente em formulações alimentícias.

Palavras-chave. faveleira, classificação proteica, isolado proteico, eletroforese, viscosidade.

ABSTRACT

Faveleira grows throughout the *caatinga* biosphere in the Brazilian Northeast region. Its nuts contain potential nourishing oils and proteins. The proteins in nuts from *faveleira* with (FWT) and without thorns (FWOT) were classified, and the proteins viscosity was analyzed at different conditions and concentrations; also its use as an alternative food ingredient was evaluated. The nuts from both varieties of *faveleira* showed an elevated protein concentration of 26.2 and 30.70%, respectively; after removing the fat matter, the proteins contents turned 57.5 and 63.0%, respectively. The protein classification according to its solubility was performed in defatted nuts, and the globulin fraction exhibited meaningful concentrations (63.3 and 63.9%, respectively). The nut of both *faveleira* varieties showed 81.0 and 90.0% of soluble proteins, respectively. By electrophoresis, the nuts from FWT showed four protein sub-units with MW ranging from 20.2 to 40.8 kDa, and seven protein sub-units ranging from 21.1 to 60.5 kDa in nuts from FWOT. Protein solutions at 1, 3, 5 e 7% were analyzed on viscosity, and a positive dependence correlation between viscosity and protein concentration was observed. The proteins in nuts from FWT showed higher viscosity than those from FWOT. Owing to the high protein concentration, the *faveleira*'s nuts might be used in food formulas.

Key words. *faveleira*, protein classification, protein isolate, electrophoresis, viscosity.

INTRODUÇÃO

As proteínas vegetais devem ganhar bastante espaço em alimentos, desde que apresentadas aos consumidores em formas mais atraentes com relação ao gosto, sabor, textura e outras qualidades desejadas. Para isso existe a necessidade do conhecimento de propriedades não-nutricionais que influem no comportamento durante o processamento, estocagem e preparação de ingredientes alimentares, influenciando na aceitação e no consumo do produto final¹.

As proteínas de sementes vegetais têm sido classificadas, de acordo com a sua solubilidade², em albuminas, globulinas, prolaminas e glutelinas. Com essa classificação, tem-se uma ideia da composição de aminoácidos que as sementes vegetais possuem. As albuminas são ricas em aminoácidos cisteína, glutamina e arginina³. Já as globulinas são caracterizadas pelos altos níveis de arginina, glutamina e asparagina. No entanto, elas são pobres em aminoácidos sulfurados como metionina e cisteína⁴.

As prolaminas são encontradas em cereais e possuem alto teor de prolina. As glutelinas, ricas em prolina e glutamina, são exemplos típicos a glutelina do trigo e do arroz⁵.

Parâmetros reológicos são índices de mudanças estruturais que ocorrem ou podem ocorrer em proteínas como resultado de processamento. São importantes em produtos alimentares como sopas e molhos. Isso pode ser desejado nas propriedades reológicas e de textura dos produtos finais. A viscosidade está relacionada aos atributos de qualidade, como aparência física e, ao paladar de produtos alimentares.

A faveleira, *Cnidoscolus phyllacanthus* (Mart.) Pax et K. Hoffm., pertencente à família *Euphorbiaceae*, é uma planta arbórea, com tronco curto e ramificado desde a base, mais ou menos cilíndrico e com casca fina e lenticelada. Possui raízes tuberculadas e suas folhas são longas, grossas e lanceoladas. Suas flores são alvas, hermafroditas e se apresentam em pequenos cachos axilares e terminais⁶.

O fruto é uma cápsula tricoca esquisocárpica, com superfície recoberta totalmente ou parcialmente por pêlos urticantes. As suas sementes são ovoides, rígidas e lisas, cor cinzento-pardacentas, apresentando alguma semelhança com os frutos da mamona (*Ricinus communis*)⁷. As suas amêndoas (endosperma + embrião) são ricas em óleo comestível e proteínas.

A faveleira possui abundantes espinhos causticantes, o que constitui um enorme empecilho a exploração, pois sua picada

causa sensação desagradável às pessoas que, indevidamente, tocam as suas extremidades pontiagudas⁷. Entretanto, são encontrados exemplares inermes (sem espinhos) em populações nativas de faveleira, porém com uma menor frequência⁸.

Através do melhoramento genético, a partir dos poucos indivíduos inermes existentes, é possível aumentar a frequência gênica para este caráter⁹. De modo particular, como forrageira, o uso de plantas sem espinhos no lugar da faveleira com espinhos é recomendado por diminuir os riscos de ferimentos e permitir uma melhor circulação de animais e de seus tratadores próximos à planta⁹.

A faveleira é encontrada em todos os estados do nordeste brasileiro até o norte de Minas Gerais, principalmente nas regiões do sertão e caatinga¹⁰. Ela se destaca, no meio das outras plantas da caatinga, pela sua extraordinária resistência à seca, prestando-se ao reflorestamento de vastas extensões erodidas⁶.

A grande importância da faveleira reside nas suas sementes, que apresentam em média 60% de amêndoas, que são consumidas pela população *in natura*, ou macerada em pilão e misturada com farinha de mandioca, açúcar ou rapadura, usada pura ou na fabricação de cocadas, bolos e biscoitos de alta qualidade nutricional.

Morais¹¹, estudando as amêndoas da faveleira nativa com espinhos, observou a ausência de fitohemaglutinina, inibidor de tripsina e alergenicos, que são elementos tóxicos de natureza proteica. Também, analisando seus aminoácidos, observou que a faveleira possui todos os aminoácidos essenciais com concentrações próximas ou superiores aos níveis recomendados pela FAO¹².

Na literatura ainda não se tem relatos de estudos para o aproveitamento da faveleira como alternativa alimentar na indústria de alimentos, tornando-a subaproveitada na sua região de origem. Com este estudo poderemos avaliar o seu potencial de aproveitamento e contribuir para a preservação de espécies vegetais nativas da região do semiárido do Nordeste brasileiro, além de levar benefícios diretos à população da região.

O presente trabalho tem como objetivo classificar as proteínas contidas nas amêndoas das variedades da faveleira com e sem espinhos, isolar as proteínas e estudar sua viscosidade em diferentes condições e concentrações, para que se possa avaliar seu possível uso como alternativa alimentar na indústria de alimentos.

MATERIAL E MÉTODOS

As sementes da faveleira (*Cnidoscolus phyllacanthus* (Mart.) Pax et K. Hoffm.) das variedades com e sem

espinhos utilizadas neste trabalho foram colhidas no município de Santa Luzia, estado da Paraíba, Brasil, e transportadas ao Laboratório de Química e Bioquímica de Alimentos da Universidade Federal da Paraíba.

Uma alíquota das sementes foi triturada em liquidificador doméstico para obtenção da farinha das sementes. As sementes da faveleira foram quebradas para obtenção de suas amêndoas. As amêndoas foram trituradas em liquidificador doméstico e desengorduradas com hexano por 7 horas em aparelho de soxhlet (sistema para determinação de gordura modelo - TE-044-5/50, marca Tecnal, São Paulo, Brasil) para obtenção da farinha desengordurada das amêndoas.

Componentes Centesimais

A composição centesimal (umidade, cinzas, lipídios, proteínas) da farinha das sementes *in natura* da faveleira foi determinada conforme os procedimentos analíticos da A.O.A.C.¹³ e o conteúdo de carboidrato total foi calculado por diferença de 100 com a soma dos percentuais dos demais componentes da composição centesimal.

Classificação das Proteínas

A classificação dos tipos de proteínas existentes nas amêndoas da faveleira foi realizada de acordo com o método de Osborne², descrito na Figura 1. Os volumes dos sobrenadantes de cada extração foram medidos e o teor de proteínas solúveis determinado por Biureto¹⁴.

Obtenção do Isolado Proteico

Na Figura 2 está descrito o fluxograma do processo de obtenção do isolado proteico da farinha da faveleira. O isolado proteico da amêndoa foi adquirido a partir da farinha desengordurada, onde se adicionou água destilada na proporção de 1:20, agitou-se por 2 horas e seu pH foi ajustado a 10,5 com hidróxido de sódio 1,0M. O extrato obtido foi centrifugado (centrifuga MLW, modelo K 26 D, marca Fanem, São Paulo, Brasil) e o resíduo extraído por mais duas vezes nas mesmas condições¹⁵. Os sobrenadantes foram combinados, medindo-se concentração de proteína solúvel pelo método do biureto¹⁴. Em seguida ajustou-se o pH a 4,5 com ácido clorídrico 1,0M. Após precipitação,

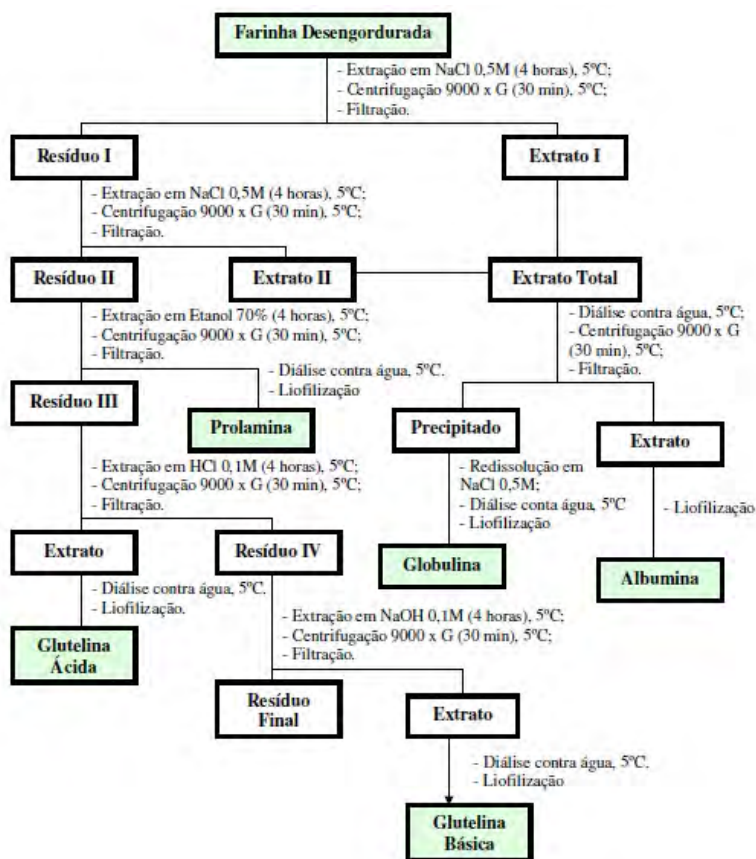


Figura 1. Fluxograma da classificação das proteínas

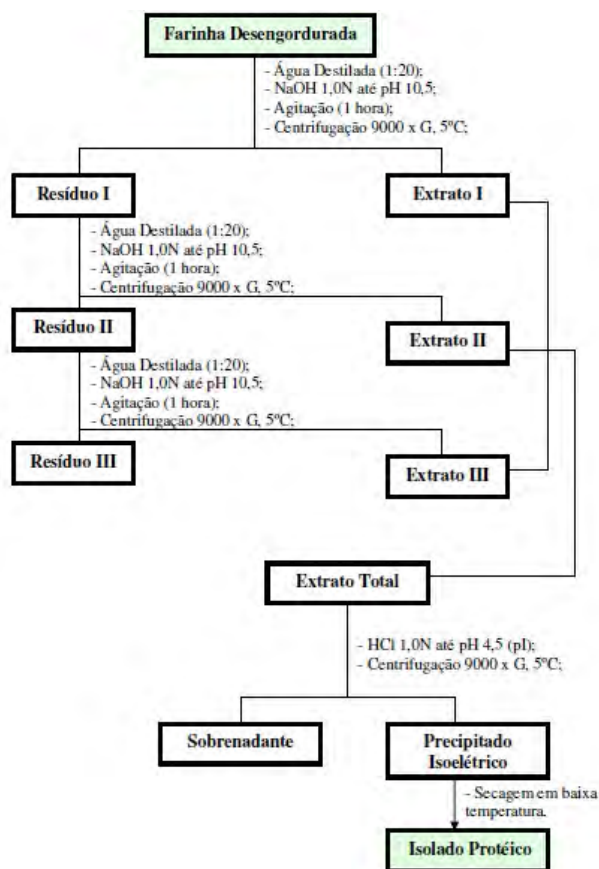


Figura 2. Fluxograma de obtenção do isolado proteico das variedades da faveleira em pH de extração de 10,0 e pH de precipitação de 4,5

o extrato total foi centrifugado. As proteínas precipitadas isoeletricamente foram liofilizadas e então armazenadas em vidro sob refrigeração a 5°C.

Análise Eletroforética

A análise eletroforética foi realizada no isolado proteico das variedades da faveleira, onde utilizou-se o sistema PAGE-SDS-2 β Me, descrito por Laemmli¹⁶, adaptado para o uso de géis de separação em placas (13,8 x 7,9 x 0,75 cm) (Mini-PROTEAN[®] 3 Cell, BIORAD Co, Califórnia, EUA). O gel de aplicação, contendo 3,5% de poliácridamida, foi montado em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 e SDS a 1,0% (p/v). O gel de separação, com gradiente de 12,5% de poliácridamida, foi montado em tampão Tris-HCl 3,0 M, pH 8,9, contendo SDS a 1,0%. As amostras submetidas à eletroforese foram suspensas em tampão amostra composto de 0,35 mL de água Milli-Q, 0,125 mL de Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8), 0,2 mL de SDS a 1,0% (p/v), 0,25 mL de glicerol, 0,02 mL de azul de bromofenol a 0,5% (p/v) e 0,05 mL de 2 β -Mercaptoetanol (2 β -Me).

As amostras, 1,0 mg/mL de tampão, foram tratadas a 100°C por 10 minutos e centrifugadas em centrífuga Eppendorf a 5.000 rpm por 1 minuto. Os extratos foram separados e alíquotas de 10 μ l aplicadas nos poços do gel. A corrida eletroforética foi realizada à voltagem constante de 200 V. Após a eletroforese, o gel foi corado em Coomassie blue R-250 a 0,05% preparado em metanol, ácido acético e água (1:3,5:8, v/v/v), e o descolorimento do gel e visualização das unidades proteicas com metanol, ácido acético e água (1:3,5:8, v/v/v).

Para avaliar o peso molecular das unidades proteicas separadas, o gel foi calibrado com marcador proteico contendo 13 proteínas de pesos moleculares 205, 116, 97,4, 84, 66, 55, 45, 36, 29, 24, 20,1, 14,2 e 6,5 kDa (SigmaMarker[™] MW Wide Range).

O gel corado foi fotografado em scanner e a imagem obtida processada através do software *Scion Image* (Scion Corporation for Windows, Washington, EUA). O resultado foi expresso em gráfico com picos em série, sendo cada pico correspondente a uma subunidade proteica separada. O número de gráficos dispostos no

espaço cartesiano dos eixos X (distância) e Y (densidade óptica) corresponderam ao número de produtos aplicados no gel. A distância de cada pico nas amostras foi usada para obter o peso molecular a partir da calibração com padrões de pesos moleculares 116, 97,4, 66, 36, 29, 24 e 20 kDa. Já a área referente aos picos foi usada para obter o conteúdo relativo de cada subunidade proteica na mistura de proteínas revelada no gel.

Análise da Viscosidade

A viscosidade do isolado proteico das variedades da faveleira foi determinada através do método de Dua, Mahajan e Mahajan¹⁷. Foram preparadas soluções do isolado nas concentrações de 1, 3, 5 e 7% (m/v) solubilizadas em tampão fosfato de potássio 0,05M em pH 7,2 por 30 minutos, como também solubilizadas com tampão fosfato de potássio adicionado de cloreto de sódio a 0,5M. A medida da viscosidade foi feita usando um aparelho viscosímetro (AVS 350 – Schott, Texas, USA) contendo um suporte (Schott Gerate GmbH D65719 Hctheim a.ts. tipo AVSIS, Texas, USA), acoplado a um banho-maria (Schott CT52, Texas, USA), utilizando um capilar nº 520 com diâmetro 13 a 25°C e após aquecimento (80°C) por 15 minutos da solução proteica, seguido de resfriamento até temperatura de 25°C. O teor de proteínas solúveis foi determinado em cada concentração de isolado proteico pelo método de biureto¹⁴.

Análise Estatística

Os resultados das análises da composição centesimal e viscosidade foram submetidos à análise estatística denominada “*t* de Student”, considerando-se o nível de probabilidade de erro (*p*) menor que 5% para determinar a significância. Todas as demais análises foram realizadas com média de três repetições (\pm erro padrão) e os resultados foram analisados empregando o programa estatístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences for Windows, versão 11.0, Chicago, EUA)¹⁸.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A faveleira, por ser uma semente oleaginosa, apresenta elevado conteúdo de lipídio, que quando extraído da semente deixa um resíduo denominado “torta” ou “farelo” com elevado teor de proteínas. A Tabela 1 apresenta o resultado da composição centesimal da farinha das sementes *in natura* das variedades da faveleira.

Tabela 1. Composição centesimal da farinha *in natura* das sementes da faveleira com (FCE) e sem espinhos (FSE)

Componentes Centesimais (%)	Amostras	
	Faveleira Com Espinhos (FCE)	Faveleira Sem Espinhos (FSE)
Umidade	7,6 \pm 0,02 ^a	5,1 \pm 0,09 ^b
Proteína (N x 6,25)	26,2 \pm 0,07 ^a	30,7 \pm 0,06 ^b
Lipídio	22,1 \pm 0,18 ^a	26,5 \pm 0,27 ^b
Cinza	4,4 \pm 0,06 ^a	5,8 \pm 0,07 ^b
Carboidrato*	39,7	31,9

* Carboidratos por diferença (100 menos o somatório dos outros componentes). Resultados das análises com média de seis repetições (\pm desvio padrão). Letras diferentes (na mesma linha) apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de *t*-student

Dos componentes determinados experimentalmente, as frações lipídica e proteica constituíram os componentes majoritários, evidenciando a faveleira como uma oleaginosa típica. As sementes das variedades da faveleira com e sem espinhos apresentaram-se estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) em todos os componentes determinados experimentalmente como mostra a Tabela 1.

Morais¹¹, trabalhando com a semente da faveleira com espinhos, obteve valores superiores em proteínas (34,5%), lipídio (49,9%) e inferior em carboidratos (10,5%). Moura Fé et al¹⁹ compararam a composição química das sementes das duas variedades, com e sem espinhos, e obtiveram valores, respectivamente, de 8,85 e 5,30% para umidade, proteína 22,4 e 24,1%, lipídio 31,3 e 31,0%, cinza 3,7 e 4,2% e carboidratos totais 34,1 e 35,4%. Os valores foram superiores em umidade da faveleira com espinhos e carboidratos totais e inferiores em proteínas, lipídios e cinzas para as duas variedades.

Os resultados das frações proteicas obtidas a partir da farinha desengordurada das amêndoas da faveleira com e sem espinhos, de acordo com sua solubilidade, estão apresentadas na Tabela 2.

Observa-se na Tabela 2 que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as frações proteicas das variedades da faveleira, e a fração proteica mais expressiva foi a globulina, seguindo o perfil de proteínas de reserva vegetal.

Tabela 2. Teor de proteínas das frações proteicas das variedades de faveleira de acordo com sua solubilidade em água, solução salina, álcool e solução ácida e básica diluídas

Fração Proteica Teor de Proteína	Amostras (%)	
	Faveleira com espinhos (FCE)	Faveleira sem espinhos (FSE)
Albumina	16,46±0,35 ^a	16,05±0,33 ^a
Globulina	63,37±0,34 ^a	63,91±0,20 ^a
Prolamina	1,23±0,14 ^a	1,27±0,05 ^a
Glutelina	11,67±0,40 ^a	11,34±0,11 ^a
Resíduo	7,27	7,43

Resultado das análises com média de três repetições (\pm desvio padrão). *Porcentagem em relação ao teor total de proteína na farinha desengordurada. Letras diferentes (na mesma linha) apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de *t-student*

Alguns pesquisadores, estudando proteínas de oleaginosas, observaram que a fração globulínica foi majoritária entre as outras frações proteicas, a exemplo de Lourenço²⁰ estudando as sementes de canola (variedade *Hyola 601*), que obteve valores de 32,16% de globulina e Ramos e Bora²¹ para a castanha-do-pará, que obteve 72,99% de globulina.

As farinhas desengorduradas das amêndoas das variedades da faveleira com e sem espinhos apresentaram teores de proteínas (N x 6,25) de respectivamente, 57,55% e 63,00% e os teores de proteínas solúveis nos isolados proteicos foram de 81,08% \pm 1,24 para a variedade com espinhos e de 90,02% \pm 1,07 para a variedade sem espinhos.

A Figura 3 representa o perfil eletroforético no sistema PAGE-SDS-2 β Me das proteínas presentes nos isolados proteicos das variedades de faveleira com e sem espinhos (Faixas 3 e 4, respectivamente). A Faixa 1 representa o marcador de peso molecular.

As bandas de polipeptídeos reveladas, mais e menos proeminentes, de todos os produtos também são indicadas através da Figura 4, relacionadas à análise densitométrica, onde os picos representam as subunidades proteicas separadas.

Na Figura 3 observa-se que o isolado proteico das amêndoas da faveleira com espinhos apresentou um total de 4 subunidades na faixa de peso molecular de 40,8 a 20,2 kDa. As subunidades proeminentes

apresentaram pesos moleculares de 40,8 (28,4%), 37,8 (49,0%) e 23,5 (18,0%) kDa, e a subunidade de peso 20,2 (4,5%) kDa foram reveladas sem proeminência. No isolado proteico das amêndoas da faveleira sem espinhos, o total de bandas foi maior que o isolado proteico da faveleira com espinhos, pois apresentou 7 subunidades na faixa de 60,5 a 21,1 kDa. As subunidades 40,8 (21,4%), 39,2 (15,9%), 38,4 (26,1%) e 23,5 (18,3%) foram as mais proeminentes, e as de peso molecular 60,5 (7,7%), 30,6 (5,4%) e 21,1 (5,1%) se apresentaram menos proeminentes. A subunidade de peso molecular de 60,5 kDa só aparece na faixa do isolado proteico da faveleira sem espinhos (7,7%), o que pode ser uma proteína diferente entre as duas variedades de faveleira. Como também outras faixas que aparecem com maior proeminência nesse isolado.

A análise densitométrica que mostra os pesos moleculares e índices percentuais das unidades polipeptídicas reveladas estão representados na Tabela 3.

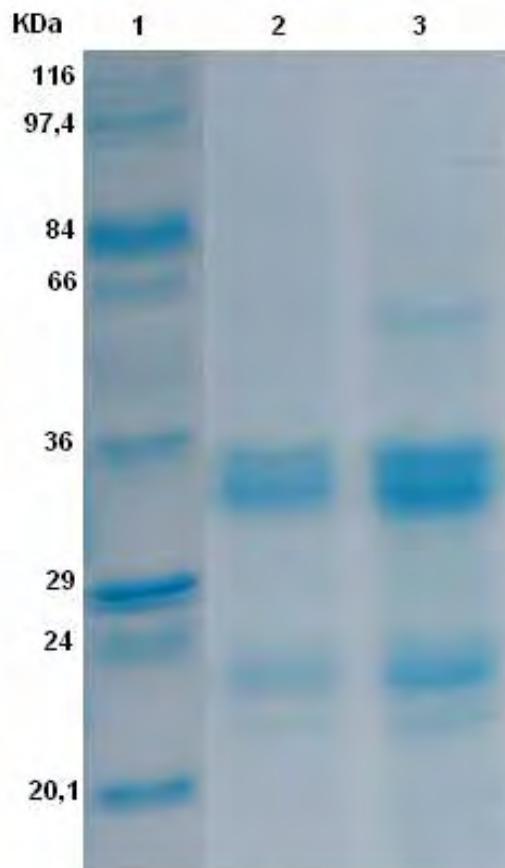


Figura 3. Eletroforese em gel de poliacrilamida, em presença de SDS e 2 β Me, do marcador padrão (Faixa 1) e dos isolados proteicos das amêndoas da faveleira com (Faixa 2) e sem espinhos (Faixa 3)

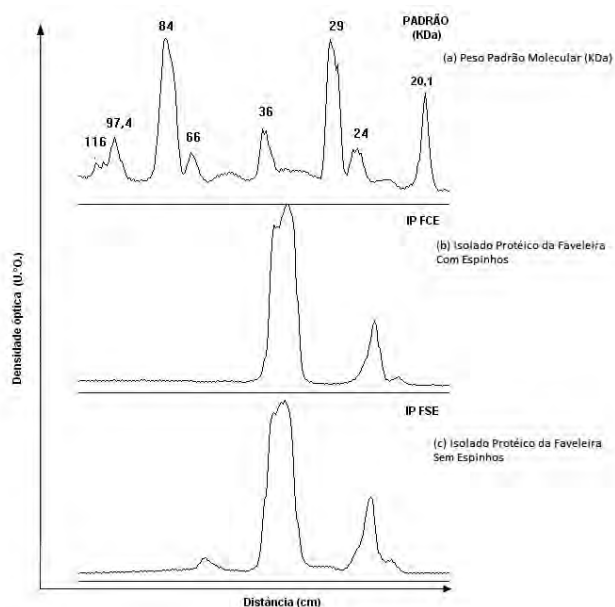


Figura 4. Análise densitométrica da eletroforese em gel de poliacrilamida, em presença de SDS e 2βMe, dos isolados proteicos de amêndoas da faveleira com (b) e sem espinhos (c)

Tabela 3. Unidades polipeptídicas reveladas (kDa) nos isolados proteicos das amêndoas de faveleira com espinhos (FCE) e faveleira sem espinhos (FSE)

Unidades Reveladas (kDa)	Distribuição e Conteúdo revelado (%)	
	Isolado proteico (FCE)	Isolado proteico (FSE)
60,5	-	7,7
40,8	28,4	21,4
39,2	-	15,9
38,4	-	26,1
37,8	49,0	-
30,6	-	5,4
23,5	18,0	18,3
21,1	-	5,1
20,2	4,5	-

Observa-se na Tabela 3 que os isolados proteicos apresentaram subunidades proteicas em comum, devido à solubilidade semelhante em algumas faixas, indicando que as subunidades reveladas foram extraídas e que as proteínas podem estar sob formas moleculares diferentes.

Os isolados proteicos das variedades da faveleira foram testados quanto sua solubilidade, em diferentes

concentrações, em tampão fosfato de potássio a 0,05M e em cloreto de sódio a 0,5M, como mostra a Tabela 4.

Tabela 4. Teor de proteína no isolado proteico da amêndoa de faveleira com e sem espinhos solubilizados em tampão fosfato de potássio e acrescentado cloreto de sódio

Concentração do Isolado Proteico % (m/v)	Faveleira Com Espinhos (FCE)		Faveleira Sem Espinhos (FSE)	
	Tampão (mg de proteína/mL)	Cloreto de sódio (mg de proteína/mL)	Tampão (mg de proteína/mL)	Cloreto de sódio (mg de proteína/mL)
1	1,43	1,88	1,22	2,31
3	1,72	2,31	3,24	5,42
5	2,57	3,58	5,95	9,46
7	3,56	5,15	7,44	13,16

Segundo a Tabela 4, tanto o isolado proteico da faveleira com espinhos, como o isolado da variedade sem espinhos, apresentaram maior concentração de proteína por mL de solução nas soluções que contêm cloreto de sódio. Isto se deve à maior solubilidade das proteínas em baixas concentrações de sais (baixa força iônica), onde a solubilidade em geral aumenta, porque os íons salinos em baixa concentração tendem a se associar às proteínas, contribuindo para uma maior hidratação e/ou repulsão das moléculas de proteína chamada de *salting in*.

As viscosidades relativas de diferentes concentrações dos isolados proteicos das variedades da faveleira, solubilizadas em tampão fosfato de potássio, acrescentando cloreto de sódio à solução, estão descritas nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5. Viscosidade relativa do isolado proteico das variedades da faveleira com e sem espinhos solubilizado em tampão fosfato de potássio

Concentração do isolado proteico % (m/v)	Viscosidade Relativa (mm ² /s)			
	Temperatura			
	Ambiente (25°C)	Após Aquecimento (80°C)	Ambiente (25°C)	Após Aquecimento (80°C)
	Faveleira com espinhos (FCE)		Faveleira sem espinhos (FSE)	
1	1,01±0,01 ^a	1,02±0,001 ^a	1,09±0,03 ^b	1,10±0,03 ^c
3	1,04±0,05 ^a	1,05±0,06 ^a	1,11±0,01 ^b	1,12±0,02 ^c
5	1,08±0,01 ^a	1,09±0,01 ^b	1,20±0,02 ^c	1,22±0,02 ^d
7	1,25±0,37 ^a	1,27±0,03 ^a	1,26±0,02 ^b	1,29±0,03 ^c

Resultados das análises com média de três repetições (± erro padrão). Letras diferentes na mesma linha apresentam diferença significativa (p<0,05) segundo o teste de *t-student*

Tabela 6. Viscosidade relativa do isolado proteico das amêndoas da faveleira com e sem espinhos solubilizado em tampão fosfato de potássio e acrescentando cloreto de sódio a solução

Concentração do isolado proteico % (m/v)	Viscosidade Relativa (mm ² /s)			
	Temperatura			
	Ambiente (25°C)	Após Aquecimento (80°C)	Ambiente (25°C)	Após Aquecimento (80°C)
	Faveleira com espinhos (FCE)		Faveleira sem espinhos (FSE)	
1	1,01 ± 0,14 ^a	1,02 ± 0,01 ^b	1,09 ± 0,05 ^c	1,11 ± 0,01 ^d
3	1,07 ± 0,01 ^a	1,08 ± 0,01 ^b	1,08 ± 0,01 ^c	1,10 ± 0,10 ^d
5	1,07 ± 0,01 ^a	1,08 ± 0,01 ^b	1,28 ± 0,01 ^c	1,29 ± 0,01 ^d
7	1,27 ± 0,04 ^a	1,29 ± 0,02 ^a	1,29 ± 0,01 ^b	1,30 ± 0,02 ^c

Resultados das análises com média de três repetições (± erro padrão). Letras diferentes na mesma linha apresentam diferença significativa (p<0,05) segundo o teste de *t-student*

O tampão fosfato de potássio apresentou viscosidade de 1,01 mm²/s (± 0,002), e a água destilada 0,98 mm²/s (± 0,004). Observou-se uma variação na viscosidade relativa dos isolados proteicos estudados com aumento de até 0,30 mm²/s a temperatura ambiente e após aquecimento a 80°C.

Comparando as variedades da faveleira, o isolado proteico da faveleira sem espinhos obteve maior viscosidade relativa em tampão fosfato, sendo diferente estatisticamente (p>0,05) em todas as concentrações estudadas tanto a temperatura ambiente quanto após aquecimento a 80°C. O isolado proteico da variedade com espinho não apresentou diferença (p>0,05) nas concentrações de 1, 3 e 7%. Quando o cloreto de sódio foi acrescentado à solução, observou-se um aumento da viscosidade em todas as concentrações de proteínas.

O aumento da viscosidade após o aquecimento da solução pode ser explicado pelas mudanças conformacionais da molécula de proteína seguida pela sua desnaturação após tratamento térmico.

Resultados semelhantes foram obtidos por Ramos & Bora²¹, que analisando a viscosidade relativa da globulina da castanha-do-pará, nas mesmas condições, observaram que, nas concentrações de 1, 3 e 5% de globulina, a viscosidade relativa variou com o aumento da concentração da solução de proteína e com o aquecimento da solução. Sze-Tao e Sathe²², analisando a viscosidade da soja, também encontraram uma relação de dependência positiva da viscosidade com a concentração da solução de proteína.

CONCLUSÃO

As frações lipídica e proteica constituíram os componentes majoritários nas sementes das variedades da faveleira (*Cnidoscopus phyllacanthus* (Mart.) Pax. et K. Hoffm.) com e sem espinhos. Suas proteínas apresentaram a fração globulínica como a mais expressiva, seguindo o perfil de proteínas de reserva vegetal. Os isolados proteicos apresentaram bom rendimento de extração nas duas variedades e apresentaram relação de dependência positiva entre a viscosidade e as concentrações de proteínas, sugerindo sua possível utilização como ingrediente em formulações alimentícias.

REFERÊNCIAS

1. El Nasri NA, El Tinay AH. Functional properties of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) protein concentrate. *Food Chemistry*. 2007;103:582-9.
2. Osborne TB. *The vegetable proteins*, 2nd ed. London: Longman-Green; 1924.
3. Bartolomé B, Mendez JD, Armentia A, Vallverd A, Palacios R. Allergens from Brazil nut: immunochemical characterization. *Allergol Immunopathol*. 1997;25:135-44.
4. Higgins TSV. Synthesis and regulation of major protein in seeds. *Ann Review Plant Physiology*. 1994;35:191-21.
5. Shewry PR, Tatham AS. The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution. *J Bioch*. 1990;267:1-12.
6. Duque JG. *O Nordeste e as lavouras xerófilas*. 3^a ed., Mossoró- RN: ESAM – Fundação Guimarães Duque, Vol. CXLIII; 1980.
7. Braga R. *Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará*. 2^a Ed. Imprensa Oficial do Ceará. v. VIII; 1960.
8. Moreira JAN, Silva FP, Costa JTA, Kokay L. Ocorrência de faveleira sem espinho no Estado do Ceará, Brasil. *Ciência Agrônômica, Fortaleza-CE*. 1974;4:51-5.
9. Arriel EF, Bakke AO, Silva APB. Estimativa da herdabilidade em jurema-preta (*Mimosa hostilis*) para a característica acúleos. *In: 41º Congresso Nacional de Genética; Caxambu/MG. Rev Bras de Genética*. 1995;18:129.
10. Lorenzi H. *Arvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. 2. ed. Nova Odessa: Editora Plantarum; 1998.
11. Moraes EA. *Proteínas da Semente de Favela (Cnidoscopus phyllacanthus, Pax & K. Hoffm) [dissertação de mestrado]*. Fortaleza (CE): Universidade Federal do Ceará; 1978.

12. FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO Statistical Data base 2006. Disponível em: www.fao.org/. Acesso em 12/02/2007.
13. AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. Washington; 2000.
14. Gornall AG, Bordawill CS, David MM. The determination of protein by the biuret reaction. *J Biology Chem*. 1949;177:751-80.
15. McWatters KH, Holmes MR. Influence of moist heat on solubility and emulsification properties of soy and peanut flours. *J Food Sci*. 1979;44:774-6.
16. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage t4. *Nature*. 1970;227:689-95.
17. Dua S, Mahajan A, Mahajan A. Improvement of functional properties of rapeseed (*Brassica campestris* Var. Toria) preparations by chemical modification. *J Agric Food Chem*. 1996;44:706-10.
18. SPSS. Inc. 11.0 for Windows [Computer program]; LEAD Technologies SPSS Inc.; Chicago, EUA, 2001.
19. Moura Fé JA, Holanda LFF, Martins CB, Maia GA. Estudos tecnológicos da faveleira (*Cnidoscopus phyllacanthus* (Mart) Pax et Hoffm). *Ciência Agrônômica*, Fortaleza–CE. 1977;7:33-7.
20. Lourenço KDS. Estudo comparativo parcial das características lipídica, e protéicas, determinação de fatores antinutricionais em sementes de duas cultivares de canola (*Brassica napus*, L). 2004. [dissertação de mestrado]. João Pessoa (PB): Universidade Federal da Paraíba; 2004.
21. Ramos CMP, Bora PS. Functional characterization of acetylated brazil nut (*bertholletia excelsa* hbk) kernel globulin. *Ciênc Tecnol Alim*. 2004;24:134-8.
22. Sze-Tao KWC, Sathe SK. Functional properties and in vitro digestibility of almond (*Prunus dulcis* L.) protein isolate. *Food Chem*. 2000;69:153

Ocorrência de parasitas e comensais intestinais em crianças da comunidade da Vila Inglesa, em São Paulo, SP, Brasil

Occurrence of intestinal parasites and commensals among children of Vila Inglesa, community of São Paulo, State of São Paulo, Brazil

RIALA6/1285

Lúcia Mara LOPES^{1*}, Emerson da Silva SANTOS², Thaís de Lima SAVEGNAGO², Fábria Andréa SALVADOR³, Erika Renata RIBEIRO-BARBOSA²

*Endereço para correspondência: ¹Núcleo de Ciências da Saúde da Universidade do Grande ABC, Santo André, SP, Departamento de Pesquisa e Pós graduação, Av. Industrial, 3330 Campestre, 09080-511, Santo André, SP. Tel.: 55 11 499198112/75098514 Fax: 55 11 49 91 9890. E-mail: lopeslm@yahoo.com.br

²Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Ibirapuera, São Paulo, SP

³Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP
Recebido: 02.10.2009 – Aceito para publicação: 10.02.2010

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência de parasitas em crianças da Comunidade da Vila Inglesa em São Paulo, SP, Brasil. Os exames coproparasitológicos realizados em amostras coletadas de 66 crianças evidenciaram resultados positivos em 69,7% em que os mais prevalentes foram *Endolimax nana* (48,4%), *Entamoeba coli* (40,9%) e *Giardia lamblia* (10,7%). Observou-se que 25,8% das crianças estavam infectadas por mais de um protozoário. Esses achados mostram que as enteroparasitoses ainda representam um sério problema de saúde pública em determinadas comunidades e que há necessidade de programas de saúde para orientar a população a respeito de educação sanitária para a prevenção de doenças.

Palavras chaves. parasitas intestinais, criança, saúde pública.

ABSTRACT

This study aimed at investigating the enteroparasitosis occurrence in children of the Vila Inglesa community in São Paulo, SP, Brazil. Coproparasitological analyses performed in samples collected from 66 children revealed that 69.7% were infected with protozoa, being *Endolimax nana* (48.4%), *Entamoeba coli* (40.9%) and *Giardia lamblia* (10.7%) the mostly prevalent. It was also observed that 25.8% of the analyzed children were infected with more than one protozoa species. These findings show that enteroparasitosis remains to be a serious problem of public health in certain communities, and that a health program needs to be implemented for guiding the population on how the sanitation education can help for preventing diseases.

Key words. intestinal parasites, children, public health.

INTRODUÇÃO

Nos países em desenvolvimento como o Brasil, grande parte da população, devido às baixas condições socioeconômicas em que vive, fica exposta a diversas doenças debilitantes, como no caso das parasitoses intestinais, que acometem principalmente indivíduos das faixas etárias mais jovens da população^{1,2}. As enteroparasitoses comprometem o estado nutricional de crianças e jovens parasitados e, por consequência, o crescimento e o desenvolvimento das funções cognitivas desses indivíduos, tornando-se um grave problema de saúde pública para os países mais afetados^{3,4}. Devido à importância do estudo das infecções parasitárias e seus agravos à saúde e bem-estar da população, o objetivo desse estudo foi identificar a ocorrência de enteroparasitoses em um grupo de crianças de 1 a 13 anos proveniente da Comunidade da Vila Inglesa, localizada na zona sul de São Paulo.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas amostras fecais de 66 crianças sendo 36 (54,5%) do sexo feminino e 30 (45,4%) do sexo masculino, durante o período de fevereiro a junho de 2008. O presente projeto foi autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Ibirapuera, São Paulo (processo nº 372/08). Foram coletadas três amostras de fezes de cada criança, em dias alternados. As amostras foram recolhidas na residência da criança em caixa de isopor, de acordo com as datas de entrega previamente agendadas, processadas e analisadas pela metodologia de Hoffman, Pons e Janner⁵. Os resultados positivos foram encaminhados para a Unidade Básica de Saúde Jardim Umuarama zona sul de São Paulo/SP para tratamentos específicos das crianças parasitadas. Foram aplicados questionários para identificar as condições socioeconômicas das famílias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 66 crianças estudadas, 69,7% apresentaram positividade para pelo menos uma espécie de protozoário. A tabela 1 mostra a ocorrência de protozoários por faixa etária das crianças estudadas. Os protozoários encontrados nas crianças da comunidade da Vila Inglesa foram *Endolimax nana* (48,4%), *Entamoeba coli* (40,9%) e *Giardia lamblia* (10,7%). O único protozoário patogênico

registrado nas amostras das crianças estudadas foi *Giardia lamblia*. Este dado corrobora com o estudo parasitológico que demonstrou que a giardíase é uma das principais parasitoses intestinais entre as crianças brasileiras. Entretanto, a identificação de *E. coli* e *E. nana*, protozoários não patogênicos, seja um indicador de contaminação fecal nos ambientes em que as crianças estão inseridas⁶. Obtivemos um percentual de 25,8% de crianças infectadas por mais de um protozoário, lembrando que apenas *G. lamblia* é considerada patogênica. Embora os resultados do presente estudo tenham identificado uma maior ocorrência de protozoários não patogênicos, é importante ressaltar que apesar de não provocarem problemas ao hospedeiro, têm uma importância epidemiológica no que se refere às condições social, econômica, cultural, sendo o mecanismo de transmissão parecidos ou iguais aos patogênicos⁷. Ao analisar a variável idade, observou-se que, na Comunidade da Vila Inglesa, as crianças parasitadas com idades entre 1 a 3 anos apresentaram contaminação de 22,7%, entre 4 a 6 anos de 25,7%, entre 7 a 9 anos de 27,3% e entre 10 a 13 anos de 24,3%, o que não corrobora com os trabalhos que citam uma prevalência maior nos primeiros anos de vida, com um declínio de infecção por enteroparasito com o aumento da idade. Sugere-se que esse declínio possa estar relacionado a mudanças de hábitos e comportamento das crianças estudadas^{2,8}. Entretanto, dados obtidos em outros trabalhos mostram que crianças com idade escolar em regiões menos favorecidas são mais suscetíveis às enteroparasitoses^{9,10}, assim como aquelas observadas nas crianças da Comunidade da Vila Inglesa. Alguns autores consideram que condições ambientais, como renda familiar, grau de instrução do responsável, saneamento e acesso a serviços de saúde, estão associados à presença de parasitas na faixa etária de 1 a 13 anos de idade^{11,2,8}, corroborando com os resultados do presente trabalho, onde 77,3% dos responsáveis pelas crianças estudadas, possuem o ensino fundamental incompleto, todas as famílias participantes recebem entre 1 a 3 salários mínimos e das 66 crianças apenas 7 utilizam assistência médica particular e 59 utilizam a Unidade Básica de Saúde da região. Alguns fatores, como condições de higiene pessoal, cuidados com a água e os alimentos, são determinantes para contaminação por *G. lamblia*. Alguns trabalhos relatam contaminação por *G. lamblia* em crianças da faixa etária de 2 a 6 anos e 7 a 9 anos^{12,13}, corroborando com os resultados do presente trabalho onde foi identificado um maior percentual de contaminação por *G. lamblia* em crianças da faixa etária de 7 a 9 anos.

Vários trabalhos relatam que estas crianças passam por mudanças quanto a hábitos pessoais e alimentares, tais como o consumo de alimentos crus, contato com o solo, com animais domésticos e outras crianças^{12,14}. Não foi identificada contaminação por helmintos nas crianças da comunidade da Vila Inglesa, mas, segundo levantamentos de dados da comunidade através de questionário, 57,5% das crianças receberam tratamento a menos de 1 ano, mesmo sem orientações médica e, apesar de condições precárias de saneamento, principalmente relacionado a esgoto exposto em ruas e vielas, todas as ruas são pavimentadas com poucas áreas com solo.

Tabela 1. Ocorrência de protozoários por faixa etária

Faixa Etária (Ano)	Espécies						Total	
	<i>E. coli</i>		<i>E. nana</i>		<i>G. lamblia</i>		Parasitas	
	n	%	n	%	n	%	n	%
01 - 03	8	12,1	6	9,1	1	1,5	15	22,7
04 - 06	6	9,1	9	13,6	2	3,0	17	25,7
07 - 09	6	9,1	8	12,1	4	6,2	18	27,3
10 -13	7	10,6	9	13,6	0	0	16	24,3
Total	27	40,9	32	48,4	7	10,7	66	100

CONCLUSÃO

Conclui-se que as enteroparasitoses ainda representam um sério problema de saúde pública, principalmente no que se refere às crianças em condições menos favoráveis. Na comunidade estudada há a necessidade de um controle efetivo de parasitas e a criação de programas educativos em saúde.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Dra. Nair Massumi Itaya, Dr. Marco Antônio Zonta e a bióloga Tatiana de Baia Moura pela colaboração técnica.

REFERÊNCIAS

1. Harpham T, Stephens C. Urbanization and health in developing countries. *World Health Stat Q*. 1991; 44:62-9.
2. Machado ER, Costa-Cruz JM. Enteroparasitas e comensais em crianças de quatro bairros da periferia de Uberlândia, Estado de Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008; 41(6):581-5.
3. Ludwig KM, Frei F, Filho FA, Ribeiro-Paes JT. Correlação entre condições de saneamento básico e parasitoses intestinais na população de Assis, Estado de São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1999; 32(5): 547-55.
4. Stephenson LS. The impact of helminth infections on human nutrition. London: Taylor & Francis; 1987.
5. Hoffman WA, Pons JA, Janer JL. The sedimentation concentration method in Schistosomiasis mansoni, Puerto Rico. *J Publ Health* 1934; 98-283.
6. Silva EF, Silva EB, Almeida KS, Sousa JN, Freitas FL. Enteroparasitoses em crianças de áreas rurais do município de Coari, Amazonas, Brasil. *Rev Patol Trop*. 2009; 38(1):35-3.
7. Macedo HS. Prevalência de parasitos e comensais intestinais em crianças de escolas da rede pública municipal de Paracatu (MG). *Rev Bras Anal Clin*. 2005; 37(4):209-13.
8. Rocha RS, Silva JG, Peixoto SV, Caldeira RL, Firmo JOA, Carvalho OS et al. Avaliação da esquistossomose e de outras parasitoses intestinais, em escolares no município de Bambuí, Minas Gerais, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2000; 33(5): 431-6.
9. Prado MS, Barreto ML, Strina A, Faria IA, Nobre AA, Jesus SR. Prevalência e intensidade da infecção por parasitas intestinais em crianças na idade escolar na cidade de Salvador (Bahia, Brasil). *Rev Soc Bras Med Trop*. 2001; 34(1):99-201.
10. Silva CG, Santos HA. Ocorrência de parasitoses intestinais da área de abrangência do Centro de Saúde Cícero Idelfonso da Regional Oeste da Prefeitura Municipal de Belo Horizonte, Minas Gerais. *Rev Biol Cienc Terra*. 2001; 1(1):519-22.
11. Fortes BPMD, Valencia LIO, Ribeiro SV, Medronho RA. Modelagem Geoestatística da infecção por *Ascaris lumbricoides*. *Cad Saúde Publ*. 2004; 20(3): 727-34.
12. Diaz IA, Rivero ZR, Bracho AM, Castellanos MS, Acureiro E, Calchi ML et al. Prevalência de enteroparasitos em niños de la etnia yukpa de toromo, Estado Zulia, Venezuela. *Rev Med Chile* 2006; 134 (1): 72-8.
13. Machado RC, Marcari EL, Cristiane CMA. Giardíase e helmintíases em crianças de creches e escolas de 1º e 2º Grau (públicas e privadas) da cidade de Mirassol - SP. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1999; 32: 697-704.
14. Ferreira H, Lala ERP, Monteiro MC, Raimondo ML. Estudo epidemiológico localizado da frequência e fatores de risco para enteroparasitoses e sua correlação com o estado nutricional de crianças em idade pré-escolar. *Publ UEPG Biol Health Sci, Ponta Grossa*. 2006; 12(4): 33-40.

Estudo sensorial e nutricional da merenda escolar de uma escola da cidade de Lauro de Freitas-BA

Sensorial and nutritional study on scholar lunches served at a school in Lauro de Freitas city, Bahia, Brazil

RIALA6/1286

Adriana Lúcia da Costa SOUZA, Maria Eugênia Oliveira MAMEDE*

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

Recebido: 11.12.2009 – Aceito para publicação: 14.05.2010

RESUMO

O cardápio escolar deve oferecer refeições saborosas e nutritivas, pois representa para o aluno um atrativo para permanência nas escolas públicas brasileiras. Este estudo analisou a composição centesimal, a aceitação e a preferência da merenda servida em uma escola municipal de ensino fundamental da cidade de Lauro de Freitas-BA. O cardápio semanal da merenda avaliada era composto de: sopa (A), arroz doce (B), achocolatado (C), suco e biscoito (D) e banana e maçã (E). Foram utilizadas uma escala hedônica facial de sete pontos para avaliação da aceitação e uma escala de cinco pontos em ordem crescente de preferência e, aplicadas em 106 alunos da 5ª a 8ª séries. As amostras foram analisadas nos parâmetros: umidade (%), cinzas (%), proteínas (%), lipídios (%) e glicídios totais (%). A merenda D teve a maior média de aceitação (5,63) e de preferência (440), e apresentou 283,54 kcal, que correspondem a valores de 75,6% e 65,18% de kcal recomendados, respectivamente, pelo PNAE de 2000 e 2009. Nenhuma merenda alcançou as taxas de kcal recomendadas pelo PNAE. Portanto, a valorização da qualidade nutricional da merenda desta escola seria necessária, a fim de assegurar as necessidades diárias de nutrientes aos alunos e não comprometer o aprendizado.

Palavras-chave. análise físico-química, análise sensorial, alimentação escolar, composição nutricional.

ABSTRACT

A tasty and nourishing scholar lunch served at school has been a means of attracting the students to the Brazilian public schools. The present study analyzed the centesimal and calorific compositions, and sensory features of scholar lunches served at a municipal primary school in the city of Lauro de Freitas, BA. The analyzed samples corresponded to those for a week-lunch, being: soup (A), sweet rice (B), chocolate milk drink (C), juice and biscuit (D), and banana and apple (E). A facial hedonic scale of seven points was used for assessing the food acceptability. Sensory tests were applied to 106 students in the 5th to 8th grades. The food samples were analyzed on moisture (%), minerals (%), lipids (%), protein (%), and carbohydrate (%) contents. Sample D had the highest score of acceptability (5.63) and preference (440), and it presented 283.54 kcal which corresponded to 75.6% and 65.18% of kcal required by PNAE 2000 and 2009, respectively. None of these lunches reached the calorific values recommended by the PNAE. Thus, the nutritional quality of scholar lunches served at this school might be improved to ensure the daily nutrients needs to the students and to avoid the learning impairment.

Key words. physico-chemical analysis, sensorial analysis, scholar lunches, nutritional composition.

INTRODUÇÃO

O Programa Nacional de Alimentação Escolar (PNAE) é um dos mais antigos programas sociais do governo Federal. É reconhecido pela *United Nations Children's* (UNICEF). O direito à alimentação escolar para todos os alunos do ensino fundamental foi assegurado em 1988. O programa passou a ser gerenciado pelo Fundo Nacional de Desenvolvimento da Educação (FNDE) em 1997¹.

Os objetivos e dimensões do PNAE priorizam o respeito aos hábitos alimentares regionais e a vocação agrícola do município, por meio do fomento ao desenvolvimento da economia local¹. O planejamento dos cardápios deve ser feito por nutricionistas para garantir a oferta de todos os grupos de alimentos, valor energético (atendendo a 15% da necessidade energética diária), volume adequado da refeição e variedade². O PNAE não visa à evasão escolar, ao contrário, contribui não só para a aprendizagem e o rendimento escolar, como também para a formação de hábitos saudáveis e a dinamização da economia local³. A rejeição voluntária e as preferências culturais levam muitas crianças, mesmo havendo disponibilidade, a deixarem de consumir determinados alimentos⁴.

A partir da Lei Federal número 8913, de 1994, o PNAE foi descentralizado, passando a ser de responsabilidade das prefeituras, com o intuito de melhorar a qualidade, o fornecimento da merenda, respeitar o hábito alimentar de acordo com a cultura de cada estado e, ainda, diminuir custos⁵.

Uma das grandes responsabilidades da creche é a alimentação, pois o ato de alimentar adequadamente uma criança permite a ela se desenvolver com saúde intelectual e física, diminuindo, ou evitando, também, o aparecimento de distúrbios e deficiências nutricionais. O alimento é essencial, tanto para o crescimento como para a manutenção da vida, mas não podemos esquecer que também pode ser responsável por doenças. Por esse motivo, o objetivo principal dos estabelecimentos que fornecem alimentação tem sido fornecer uma dieta equilibrada do ponto de vista nutricional⁶.

A merenda escolar representa um atrativo para a permanência dos alunos nas escolas públicas brasileiras⁷. Portanto, o cardápio deverá ser programado de modo a fornecer refeições saborosas e nutricionalmente adequadas, oferecendo uma quantidade média de 375 kcal e 6,9 g de proteínas diárias¹.

A aceitação de um alimento pelo aluno é um dos fatores analisados para determinar a qualidade do serviço

prestado pelas escolas, no tocante ao fornecimento da merenda escolar. Para averiguar a aceitação de determinado alimento, a pesquisa de preferência e aceitação da merenda escolar é um instrumento fundamental, pois é de fácil execução e permite verificar a preferência média dos alimentos oferecidos⁷.

Acredita-se que os cardápios da alimentação escolar atenderá os 15% preconizados pelo PNAE em relação a calorias. Muitas pessoas duvidam da efetividade dos programas de assistência oficiais⁸, por isso é fundamental a avaliação do cardápio fornecidos nas instituições de ensino no sentido de se averiguar o quanto está sendo suficiente e eficaz para a sua população.

Este estudo teve como objetivo analisar a composição centesimal, calórica e sensorial da merenda de uma escola municipal de ensino fundamental da cidade de Lauro de Freitas-BA.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas 5 amostras da merenda semanal na cozinha central da escola do município de Lauro de Freitas-BA onde é preparada a alimentação escolar: sopa de legumes (A), arroz doce (B), achocolatado (C), suco e biscoito (D) e banana e maçã (E). As preparações utilizadas para análise fazem parte do cardápio oferecido na escola onde o estudo foi realizado. Este cardápio é fornecido pela Secretária de Educação Municipal, calculado por um profissional qualificado, nutricionista.

Composição Centesimal:

Foi realizada a composição centesimal dos cinco tipos de preparações da merenda, de acordo com os métodos do Instituto Adolfo Lutz. O teor de umidade foi determinado por secagem em estufa a 105°C (método 012/IV); cinzas foi determinado por incineração em mufla a 550°C (método 018/IV); lipídios foi determinado pelo método Soxhlet (032/IV); proteínas foi determinado pelo método Kjeldahl (036/IV) e carboidratos foi calculado por diferença, subtraindo-se de 100 os valores encontrados para umidade, cinza, lipídio e proteína⁹.

O valor calórico das amostras foi determinado através da soma das calorias fornecidas por carboidratos, lipídios e proteínas, multiplicando-se seus valores em gramas pelos fatores de Atwater 4kcal, 9kcal e 4kcal, respectivamente¹⁰.

Análise Sensorial:

Primeiramente, foi aplicado um questionário a todos os alunos de 5ª a 8ª série da escola no turno vespertino, num total de 186 alunos. Nele foram abordados os hábitos dos alunos em relação à merenda oferecida pela escola; a repetição da merenda; quantas vezes por semana consumiam a merenda; a merenda era a única refeição durante o dia; quantas refeições têm durante o dia; se apresentava alguma patologia; se tomavam medicamentos; se faziam dieta.

A partir dos resultados deste questionário, foram selecionados os alunos que participariam dos testes de aceitação e de preferência. Foram excluídos os alunos que não consumiam merenda todos os dias da semana, os que tinham patologias que poderiam interferir na análise sensorial ou que faltaram algum dos dias da semana de aplicação do teste.

Foi utilizado para o teste de aceitação uma escala hedônica facial de 7 pontos, apresentada na Figura 1. Os testes sensoriais foram aplicados nas 5ª, 6ª, 7ª e 8ª séries da escola municipal, utilizando 106 alunos. O teste de preferência também foi aplicado aos mesmos alunos¹¹.

A faixa etária dos alunos variou de 11 a 17 anos. Os testes foram aplicados na própria escola, durante uma semana, no período de 23 a 27 de outubro de 2007.

Análise Estatística:

Os resultados foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey (5% de significância), para o teste de aceitação. Para o teste de ordenação-preferência foi utilizada a tabela de Newell e Mac Farlane que define o valor das diferenças críticas entre os totais de ordenação ao nível de 5% de significância.

Avaliação de comitê de ética em pesquisa

O trabalho foi avaliado pelo comitê de ética em pesquisa da Maternidade Climério de Oliveira/UFBA de acordo com a Resolução nº 196/96 (Parecer número 62/2007). A escola, por intermédio da direção, concordou com a realização do estudo na Instituição.

TESTE DE ACEITAÇÃO

NOME: _____ DATA: ___/___/___

Por favor, prove a amostra de merenda escolar e marque na escala sua aceitação:

Ótimo	Muito Bom	Bom	Nem bom/nem ruim	Ruim	Muito ruim	Péssimo	

Comentários:

Figura 1. Modelo de ficha de aplicação do teste de aceitação

Fonte: Meilgaard, Civille, Carr. *Sensory evaluation techniques*. 4 ed. Boca Raton, FL: CRC Press, p. 276, 2007

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 1. Composição centesimal e composição da porção da merenda escolar em g/100g e g/porção diária

MERENDA	kcal		Umidade		Cinza		Lipídio		Proteína		Carboidrato	
	g/100g	g/porção diária	g/100g	g/porção diária	g/100g	g/porção diária	g/100g	g/porção diária	g/100g	g/porção diária	g/100g	g/porção diária
A (sopa)	375,23	156,10	6,83	2,84	5,42	2,25	4,84	2,02	4,34	1,80	78,56	32,68
B (arroz doce)	389,72	194,86	7,81	3,91	5,95	2,97	8,96	4,48	4,93	2,47	72,34	36,17
C (achocolatado)	406,12	203,06	5,68	2,84	6,15	3,08	8,97	4,48	2,44	1,22	78,91	39,45
D (suco e biscoito)	271,10	283,54	46,82	52,52	0,91	1,04	9,07	10,19	4,36	4,90	38,37	43,06
E (banana e maçã)	62,89	100,99	83,02	142,99	0,22	0,38	1,85	3,15	1,60	1,21	9,96	16,95

Análises realizados em triplicata, $n=3$

Observa-se, a partir da Tabela 1, que nenhuma merenda alcançou a meta proposta pelo PNAE que é de 375 kcal e 6,9g de proteína para a resolução do FNDE de 2000¹. Atualmente estes valores mudaram, a resolução do FNDE de 2009 preconiza o atendimento de 20% das necessidades diárias, correspondendo a 435 kcal e 13,6g de proteína para faixa etária de 11 a 15 anos e 500 kcal e 15,6g de proteína para faixa etária de 16 a 18 anos¹². Das merendas analisadas nenhuma alcançou os valores estabelecidos pela resolução de 2000. A preparação D (suco com biscoito) correspondeu a apenas 75,6% do valor calórico da proposta do PNAE de 2000 e, se fossemos correlacionar com a proposta de 2009, esta preparação corresponderia a 65,18% (valor calórico) para faixa etária de 11 a 15 anos de idade; para uma faixa etária de 16 a 18 anos de idade, o valor cai para 56,71% (valor calórico).

Danelon¹³ avaliou a composição nutricional das refeições que integram os cardápios oferecidos em duas das três escolas integrantes do programa em Piracicaba (SP). Foram observadas diferenças, no tocante ao atendimento das metas nutricionais, quando foram considerados os estratos de idade dos escolares e as unidades de ensino. Os resultados revelaram que, em média, as refeições forneceram cerca de metade de caloria do conteúdo preconizado. No que se refere aos nutrientes selecionados, as refeições reuniram quantidades que se mostraram concordantes no tocante ao atendimento das proteínas e insuficientes no que diz respeito à expressiva parcela das vitaminas e minerais, especialmente quando são consideradas as demandas dos alunos com idade entre 11 e 14 anos.

Outros estudos também têm identificado cardápios do PNAE, administrados por meio da adoção de “autogestão”, com reduzidos conteúdos energéticos. Mazzilli¹⁴ verificou

que as preparações oferecidas aos alunos matriculados nos Centros de Educação e Alimentação do Pré-escolar (CEAPes) contribuíram com 13% a 26% das recomendações diárias de energia. Logo, observou-se que a maioria das merendas oferecidas nesses centros de educação atingiram a proposta do PNAE de corresponder a 15% das necessidades nutricionais. Mais tarde, Salay e Carvalho¹⁵, ao avaliarem o programa de merenda escolar em escolas estaduais de Campinas, encontraram uma adequação para caloria de $48,6 \pm 17,3\%$, enquanto Flávio et al⁷, avaliando a composição química da merenda escolar de uma escola estadual de Lavras-MG, observaram que a média de valor calórico foi de 170,03kcal/dia, representando adequação de $48,58 \pm 22,57\%$, em relação à recomendação do PNAE de fornecer 375kcal/dia.

A merenda E (banana e maçã) foi a que possuía maior teor de umidade (142,99g/porção diária), sendo o alimento em relação às demais merendas oferecidas com maior atividade de água que favorece um maior crescimento microbiano. A alta perecibilidade resultante da umidade se torna um fator desfavorável para que estes alimentos sejam oferecidos com maior frequência já que as compras dos produtos da merenda escolar de Lauro de Freitas-BA são quinzenais.

A merenda C (achocolatado) era a que apresentou maior teor de cinzas, correspondendo então ao maior teor de minerais presentes nesta merenda. O menor teor de cinzas foi verificado na merenda composta de banana com maçã (0,38g/porção diária). Este resultado está de acordo com os valores de cinzas apresentados para frutas frescas¹⁶.

A merenda D era a que possuiu maior teor de carboidrato e lipídio, por isso é também a que apresentou maior valor calórico, provavelmente devido aos ingredientes usados na preparação do biscoito.

Com relação ao teor proteico, nenhuma merenda atingiu a proposta de 6,9g de proteína, sendo a merenda D com maior teor proteico (4,90g de proteína), correspondendo a 71% do recomendado. A merenda E foi a que possuiu menor teor de proteína (1,21g) chegando somente a 17,54% do recomendado pelo PNAE. E quando se deparou com a resolução atual para as faixas etárias de alunos do estudo, observou-se uma maior inadequação referente aos valores de proteína.

Segundo Mazzilli¹⁴, as merendas oferecidas pelos CEAPes corresponderam a proposta do PNAE chegando a 21 a 44% das recomendações nutricionais. Já estudo de Salay e Carvalho¹⁵ encontraram adequação proteica de $52,7 \pm 17,2\%$ e estudo de Flávio et al⁷, o teor proteico verificado foi de $72,2 \pm 2,75$ de adequação em relação à recomendação do PNAE. Logo, nos dois últimos estudos, o teor proteico das merendas não atingiu a proposta do PNAE de 9g de proteínas.

Vários estudos demonstraram que a deficiência energética é mais frequente do que a de proteínas. O fato de existirem quantidades elevadas de proteínas na dieta das crianças aliadas a presença de calorias baixas evidenciam que, em situações de restrições energéticas as proteínas disponíveis são desviadas de suas funções nobres para o fornecimento de energia, o que não deixa de ser uma desvantagem uma vez que as proteínas pertencem ao grupo mais caro dos alimentos⁴.

Análise Sensorial:

Tabela 2. Média de aceitação e Ordenação-Preferência das Merenda

Merenda	Média de Aceitação	Médias de Ordenação-Preferência
Sopa (A)	3,42 ^{dc}	242 ^{dc}
Arroz Doce (B)	4,18 ^{bad}	274 ^c
Achocolatado (C)	3,53 ^{cbd}	300 ^b
Suco e Biscoito (D)	5,63 ^a	440 ^a
Banana e Maçã (E)	4,95 ^a	415 ^a

Médias com a mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$)

Pela Tabela 2, pode-se concluir que a merenda D e a E tiveram as maiores médias de aceitação diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) em relação às amostras A, B e C. A merenda D foi a que apresentou maior teor de calorias, enquanto a E apresentou o menor valor de caloria por porção diária de merenda.

Na análise de preferência observou-se que a merenda D foi significativamente preferida em relação a A, B e C ($p < 0,05$). O mesmo ocorreu com a merenda E, que foi preferida em relação a A, B e C (Tabela 2).

A 7ª série foi a única turma que a merenda E foi a preferida. Nas demais séries a merenda preferida foi a D. Não houve diferença significativa de preferência entre a merenda D e E ($p > 0,05$).

Flávio et al⁷ analisaram também a aceitação da merenda escolar numa escola Municipal em Lavras – MG. Esta merenda se mostrou satisfatória quanto ao aspecto sensorial atendendo as metas do PNAE nesse quesito.

Observou-se que a merenda escolar oferecida está desbalanceada todos os dias, o que pode vir a comprometer a saúde dos escolares, contribuindo para o sobrepeso e obesidade, pois, sendo a merenda escolar definida como refeição leve, lanche, esta deve ser oferecida de forma balanceada nutricionalmente⁸.

CONCLUSÃO

Diante destes resultados pode-se concluir que as preparações de alimentação escolar oferecida não atenderam às metas propostas pelo PNAE, pois apresentaram porcentagem de calorias inferior a 375 kcal.

A merenda suco com biscoito foi a que apresentou o maior valor de kcal e coincidentemente foi a que alcançou a maior média de aceitação e preferência. Seguindo da merenda banana com maçã, que apresentou a segunda maior média de aceitação e preferência, apesar de ser a merenda que apresenta menor valor calórico por porção diária.

Levando-se em conta que o aluno necessita de quantidades maiores de nutrientes para o seu desenvolvimento, seria necessária uma valorização da qualidade nutricional e da aceitação (sabor, aparência etc) ou preferência da merenda escolar desta escola para não interferir de modo negativo no aprendizado e na evasão escolar.

Futuramente novos trabalhos de pesquisa serão realizados para dar continuidade à investigação do balanceamento do cardápio da merenda escolar de outras escolas.

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Fundo Nacional de Desenvolvimento do Ensino. Resolução nº 015, de 25 de agosto de 2000. [Acesso em: 21 de junho de 2007]. Disponível em: [http://www.fnnde.gov.br/programas/pnae/download/planejamento_cardapios.pdf>].

2. Weis B, Chaim NA, Belick W. Manual de gestão eficiente da merenda escolar. 3ª ed, São Paulo: Ed. Margraf; 2007.
3. Peixinho A. CFN (Conselho Federal de Nutricionistas) amplia ações para inserir o nutricionista no PNAE (Programa Nacional de Alimentação Escolar). *Rev CFN* ano IV 2005; 15: 9.
4. Cruz GF, Santos RS, Carvalho CMRG, Moita GC. Avaliação dietética em creches de Teresina-Pi, Brasil. *Rev Nutr*. 2001; 14 (1): 21-32.
5. Pipitone MAP. Atuação dos conselhos municipais de alimentação escolar na gestão do programa nacional de alimentação escolar. *Rev Nutr*. 2003; 16(2): 143-54.
6. Oliveira MN, Brasil ALD, Taddei JAAC. Avaliação das condições higiênico-sanitárias das cozinhas de creches públicas e filantrópicas. *Ciênc Saúde Coletiva*. 2008; 13(3):1051-60.
7. Flávio EF, Barcelos MFP, Lima AL. Avaliação química e aceitação da merenda escolar de uma escola estadual de Lavras – MG. *Ciênc Agrotec*. 2004; 28(4): 840-7.
8. Mahan LK, Escott-Stump S. Alimentos, Nutrição e Dietoterapia. 11ª ed., São Paulo: Roca LTDA; 2005.
9. 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. p.96.
10. Ribeiro P, Morais TB, Colugnati FAB, Sigulem DM. Tabelas de composição química de alimentos: análise comparativa com resultados laboratoriais. *Rev Saúde Pública*. 2003; 37(2): 216-25.
11. Meilgaard MC, Civille GV, Carr BT. Sensory evaluation techniques. 4 ed. Boca Raton, FL: CRC Press; 2007.
12. Brasil. Ministério da Educação. Fundo Nacional de Desenvolvimento da Educação. Resolução/FNDE/CD/N.38, de 16 de Julho de 2009. Dispõe sobre o atendimento da alimentação escolar aos alunos da educação básica no Programa Nacional de Alimentação Escolar - PNAE. Brasília, DF, 2009.
13. Danelon MAS, Danelon MS, Silva MV. Alcance das metas nutricionais do programa “Escola de Tempo Integral”, no município de Piracicaba, SP. Rede Brasileira de Alimentação e Nutrição do Escolar. [acesso em 25 de março de 2007]. Disponível em: [<http://www.rebrae.com.br/>].
14. Mazzili RN. Valor Nutricional da merenda escolar e sua contribuição para as recomendações nutricionais do pré-escolar, matriculado em Centros de Educação e Alimentação do Pré-Escolar (CEAPE). *Rev Saúde Pública*. 1987; 21: 246-54.
15. Salay E, Carvalho JF. Avaliação do programa de merenda escolar do município de Campinas, Brasil. *Arc Latin Nutricion*. 1995; 45 (3): 167-171.
16. Cecchi HM. Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos. 2 ed. São Paulo: UNICAMP; 2003.

Qualidade microbiológica de alimentos servidos em restaurantes *self-service*

Microbiological quality of food from *self-service* restaurants

RIALA6/1287

Karinna CHOUMAN^{1*}, Elisa Helena Giglio PONSANO², Aparecida de Fátima MICHELIN³

*Endereço para correspondência: ¹Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Paulista, Campus Araçatuba, CEP 16018-555, Araçatuba, SP, Brasil, (18) 3623-4778. e-mail: k.chouman@yahoo.com.br;

²Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, Universidade Estadual Paulista, Campus de Araçatuba

³Laboratório I de Araçatuba, Instituto Adolfo Lutz

Recebido: 13.10.2010 – Aceito para publicação: 28.05.2010

RESUMO

Os serviços de alimentação coletiva têm se expandido em todo o mundo, sendo os restaurantes do tipo *self-service* a preferência atual dos consumidores. Considerando-se a importância da qualidade higiênica dos alimentos para a saúde da população, foi investigada a microbiota presente em alimentos prontos para o consumo. No segundo semestre de 2008, foram coletadas 20 amostras de refeições, à base de carne, prontas para o consumo, em diferentes restaurantes *self-service* da cidade de Araçatuba/SP. As análises bacteriológicas realizadas seguiram as metodologias convencionais e os resultados foram comparados com os padrões regulamentados pela legislação brasileira vigente. Das amostras analisadas, 90% foram positivas para coliformes a 35°C. Coliformes a 45°C foram detectados em 55% das amostras e, destes, em 63,63% foi confirmada a ocorrência de *Escherichia coli*. A presença de estafilococos coagulase-positiva foi verificada em 10% das amostras; *Salmonella* spp. e *Bacillus cereus* não foram detectados. Não foram pesquisados os clostrídios sulfite redutores a 42°C. Este estudo aponta a necessidade de atenção rigorosa quanto às condições sanitárias de preparo e exposição dos alimentos prontos para consumo, uma vez que a ingestão de produtos contaminados constitui um potencial risco para a saúde pública.

Palavras-chave. alimentos prontos para consumo, coliformes, estafilococos coagulase-positiva, *Salmonella* spp.

ABSTRACT

Collective food services have been increasing worldwide, and the self-service restaurant has been the current preference by consumers. Considering the importance of hygienic quality of food, the microbiological composition of ready-to-eat food was assessed. In the second semester of 2008, 20 samples of meals, mainly meat-based foods, were collected from different self-service restaurants in Araçatuba city, SP. Bacteriological analyses were performed following the conventional methodologies, and the results were compared with the standards established by the effective Brazilian legislation. Coliforms at 35°C were detected in 90% of analyzed samples. Coliforms at 45°C were found in 55% of the samples and, among these, in 63.63%, the occurrence of *Escherichia coli* was confirmed. Coagulase-positive staphylococci were detected in 10% of samples and no sample showed *Salmonella* spp. or *Bacillus cereus* contamination. Sulfite reducing clostridia at 42°C were not investigated in this study. These findings indicate the need for a rigorous approach for improving the sanitary conditions during preparation and presentation of ready-to-eat food, as the consumption of contaminated products represents a potential risk to public health.

Key words. ready-to-eat food, coliforms, coagulase-positive staphylococci, *Salmonella* spp.

INTRODUÇÃO

O modo de vida contemporâneo dos brasileiros, derivado do crescimento econômico e da globalização, está provocando mudanças nos hábitos culturais da população, inclusive os alimentares. A diminuição do tempo disponível para o preparo dos alimentos leva grande parte da população a optar por refeições mais rápidas, da aquisição ao preparo, e também por refeições fora do domicílio, aumentando a demanda por serviços de alimentação coletiva¹. Dentre esses, os serviços do tipo *self-service* são os preferidos, em função da indiscutível rapidez e variedade que proporcionam. Nos estabelecimentos que oferecem esse serviço, rigorosas práticas higiênicas no preparo são fundamentais para garantir um alimento seguro e, se violadas, podem transformar o alimento em veículos de agentes causadores de doenças de origem alimentar (DTAs). Além disso, nessa modalidade de serviço, após o preparo até o consumo, os alimentos ficam submetidos a uma série de oportunidades de contaminação microbiana devido ao grande número de pessoas envolvidas nas áreas de exposição e consumo². Também se deve considerar que a temperatura e o tempo a que os alimentos ficam submetidos durante a exposição aos consumidores nem sempre são as ideais, podendo favorecer o desenvolvimento de micro-organismos que tenham permanecido após o preparo ou aqueles que contaminaram o produto depois de pronto³.

Outros fatores podem, também, influenciar as condições sanitárias dos alimentos em restaurantes do tipo *self-service*, tais como a qualidade da matéria-prima, o tempo de descongelamento e cozimento, o aproveitamento de sobras alimentares, os equipamentos e os instrumentos utilizados no preparo³. Vale destacar, ainda, que o manipulador de alimentos é um importante disseminador de micro-organismos provenientes de sua microbiota ou de sujidades presentes especialmente nas mãos⁴.

Várias espécies bacterianas são capazes de causar DTAs, podendo-se citar *Staphylococcus aureus*, clostrídios sulfito redutores a 42°C e *Bacillus cereus* como agentes de intoxicação alimentar, enquanto que infecções podem ser transmitidas por salmonelas, shigelas e algumas estirpes de *E. coli*⁵.

As DTAs acarretam sofrimento físico e gastos ao consumidor, prejuízos financeiros e morais ao estabelecimento produtor (representados por pagamento de indenizações, descarte de produtos, queda na produtividade e pela repercussão sobre sua imagem) e gastos para o setor governamental (representados pelo custeio de tratamentos médicos e licenças

trabalhistas)⁶. De acordo com Carmo et al⁷, de 1999 a 2004, foram notificados ao Ministério da Saúde 3.734 surtos de DTAs, com o acometimento de 73.517 pessoas e registro de 38 óbitos. Na realidade, esses números podem ser ainda maiores, já que grande número de pessoas acometidas por DTAs não procuram os serviços médicos, além de haver falta de notificação dos casos para os sistemas oficiais de controle. Esse panorama pode ser minimizado com o uso de Boas Práticas de Fabricação (BPFs), preconizadas pela Resolução da Diretoria Colegiada nº 216 de 15 de setembro de 2004, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária⁸.

A investigação a respeito da qualidade dos alimentos prontos permite verificar o atendimento à legislação, alertando sobre a importância do papel dos estabelecimentos produtores de alimentos e das autoridades sanitárias na segurança alimentar da população. Por esse motivo, tem-se verificado na literatura brasileira, alguns trabalhos que se dedicam a investigar o assunto, em diferentes localidades do país⁹⁻¹¹. Considerando a importância da qualidade higiênica dos alimentos na preservação da saúde do consumidor, este trabalho vem contribuir para essa literatura, apresentando dados regionais. Dessa forma, o presente estudo teve o objetivo de investigar a microbiota presente em refeições prontas para o consumo comercializadas em restaurantes do tipo *self-service*, localizados na cidade de Araçatuba/SP.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Vinte amostras de refeições prontas para o consumo contendo carne, hortaliças, cereais e leguminosas foram colhidas de restaurantes do tipo *self-service* da cidade de Araçatuba, estado de São Paulo, durante o segundo semestre de 2008. As amostras foram embaladas em sacos plásticos, identificadas e encaminhadas, sob refrigeração em caixa térmica, para o Laboratório de Microbiologia da Universidade Paulista, Campus Araçatuba, onde foram analisadas.

Análises microbiológicas

Preparo das amostras

As amostras foram homogeneizadas mecanicamente em triturador com copo esterilizado e utilizadas para o preparo das diluições. Para a pesquisa de coliformes, estafilococos coagulase-positiva e *Bacillus cereus*, 25 g das amostras homogeneizadas foram diluídas

em 225 mL de água peptonada 0,1%, dando origem à primeira diluição decimal. As diluições seriadas foram preparadas em nove mL do mesmo diluente. Para a pesquisa de *Salmonella* spp., a primeira diluição decimal foi obtida a partir de 25 g das amostras em 225 mL de água peptonada 1% e as diluições subsequentes foram preparadas em nove mL do mesmo diluente.

Determinação do Número Mais Provável (NMP) para coliformes

Diluições seriadas das amostras foram semeadas em caldo lauril-sulfato de sódio (Difco) e incubadas a 35-37°C por 24-48 horas. Após este período, alíquotas do caldo lauril-sulfato foram repicadas para caldo lactose bile verde brilhante (Difco) e caldo EC (Difco), ambos contendo tubos de Durham, que foram incubados a 35-37°C e 44-45,5°C, durante 24-48 horas¹².

Identificação de coliformes a 44-45,5°C

As amostras que apresentaram crescimento com formação de gás no tubo de Durham em caldo EC foram isoladas por estriamento em ágar Levine Eosina Azul de Metileno - Levine EMB (Merck) a 35°C durante 24 horas, e submetidas à identificação presumtiva em meio de Rugai modificado (Cecon)¹².

Pesquisa de estafilococos coagulase-positiva

Diluições das amostras foram semeadas em ágar Baird-Parker (Difco) e incubadas a 35°C por 48 horas. As colônias sugestivas de estafilococos coagulase-positiva foram testadas quanto à atividade da catalase e, ao apresentar resultado positivo, foram transferidas para caldo infuso-cérebro-coração (Difco), incubadas por 24 horas a 35°C e, então, submetidas ao teste da coagulase, para confirmação¹².

Pesquisa de *Bacillus cereus*

Diluições das amostras foram semeadas em ágar *Bacillus cereus* (Difco) e incubadas a 30°C por 48 horas para a observação de colônias típicas¹².

Pesquisa de *Salmonella* spp.

Diluições apropriadas das amostras foram incubadas a 35°C por 48 horas para permitir um pré-

enriquecimento. Após este período, alíquotas das diluições foram semeadas em caldos Rappaport-Vassiliadis (Merck) e selenito com cistina (Merck) e incubados a 42°C e 35°C, respectivamente, por 24-48 horas. Os caldos foram, então, estriados em ágar *Salmonella*, *Shigella* - SS (Oxoid), ágar bismuto sulfito - BSA (Difco) e ágar xilose lisina desoxicolato - XLD (Merck) e incubados a 35°C durante 24 horas, para permitir o isolamento e a observação de colônias típicas do micro-organismo¹².

Clostrídios sulfito-redutores a 42°C não foram pesquisados neste trabalho. Os resultados obtidos foram comparados com os parâmetros legais estabelecidos para os grupos bacterianos abrangidos no item 22a (a base de carnes, pescados, ovos e similares cozidos) da Resolução da Diretoria Colegiada nº 12 de 02 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (RDC 12/2001 - ANVISA)¹³, que aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os dados obtidos na avaliação microbiológica das amostras, bem como os valores de tolerância para os grupos microbianos pesquisados, de acordo com a legislação brasileira para o tipo de produto analisado.

Coliformes a 35°C e 45°C compreendem um grupo de bactérias indicadoras de contaminação utilizadas na avaliação da qualidade higiênico-sanitária de alimentos prontos para consumo. O grupo dos coliformes a 35°C compreende bactérias entéricas ou não, da família *Enterobacteriaceae*, com predominância dos gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*. A presença desse grupo microbiano em alimentos não indica necessariamente uma contaminação fecal ou ocorrência de patógenos, mas números elevados indicam, seguramente, falhas higiênicas ao longo da obtenção, do processamento ou da conservação de produtos alimentícios⁵, pontos que devem ser reavaliados pelos estabelecimentos fornecedores. No entanto, o item 22 da RDC 12/2002 não estabelece padrões microbiológicos para este grupo microbiano, o que inviabiliza uma comparação. Poerner et al¹¹ relataram detecção de coliformes totais em 100% das superfícies de manipulação de alimentos em estabelecimentos que oferecem serviços de alimentação em Santa Rosa, RS, alertando para a insuficiente higienização e para o risco de contaminação cruzada.

Tabela 1. Análises microbiológicas de refeições prontas servidas em restaurantes tipo *self service* em Araçatuba, SP (n = 20)

Análise realizada	Limites encontrados		Nº (%) de amostras positivas	Valor de tolerância para amostra indicativa ¹	Nº (%) de amostras dentro do padrão	Nº (%) de amostras fora do padrão
	Mín.	Máx.				
Coliformes a 35°C/g	0	> 1,1 (x 10 ³)	18 (90%)	-	-	-
Coliformes a 45°C/g	0	> 1,1 (x 10 ³)	11 (55%)	2 x 10	18 (90%)	02 (10%)
Estafilococos coagulase positiva/g	0	6 (x 10 ³)	02 (10%)	10 ³	19 (95%)	01 (5%)
<i>Bacillus cereus</i> /g	-	-	0	10 ³	20 (100%)	0
<i>Salmonella</i> spp./25g	-	-	0	ausência	20 (100%)	0

¹RDC nº 12/2001 – ANVISA

A presença de coliformes a 45°C indica a contaminação do alimento com material de origem fecal e, dessa forma, alerta sobre a eventual presença de enteropatógenos⁵. De acordo com Forsythe¹⁴, a incidência desse grupo de bactérias é considerada o melhor indicador da possível presença de outros enteropatógenos. Para este grupo microbiano, 55% das amostras foram consideradas em desacordo com a legislação, indicando o comprometimento da qualidade dos alimentos servidos nos restaurantes do tipo *self-service* da cidade. Os coliformes a 45°C podem se originar da matéria-prima, dos próprios manipuladores dos alimentos, bem como dos utensílios e superfícies que entraram em contato direto com o alimento durante o seu preparo, quando ocorre deficiência na higienização⁵. Costa et al¹⁰ encontraram altas contagens de coliformes a 35 e a 45°C em saladas cruas servidas em restaurantes do tipo *self-service* na cidade de Palmas, TO e atribuíram os achados ao contato dos vegetais já preparados com carnes cruas e ao uso de esterco bovino no cultivo das hortaliças. Bactérias deste grupo também foram isoladas das mãos de manipuladores de alimentos em um estabelecimento de alimentação coletiva⁹.

Dentre as espécies de coliformes a 45°C encontradas, 63,63% foram identificadas como *Escherichia coli*, que possui como habitat natural o trato intestinal de humanos

e de outros animais de sangue quente. *Escherichia coli* é a bactéria mais conhecida e a mais facilmente diferenciada laboratorialmente dos membros não fecais, sendo, por isso, o melhor indicador de contaminação fecal¹⁵. Também se deve considerar que diversas linhagens de *E. coli* são patogênicas para o homem por serem produtoras de toxinas ou causadoras de infecção⁵. A avaliação microbiológica de superfícies utilizadas para o preparo de alimentos de uma unidade de preparo de alimentação coletiva no Ceará também indicou a presença de *E. coli*⁹.

Uma das amostras investigadas apresentou contagem de estafilococos coagulase-positiva superior à permitida pela legislação. Em alimentos processados, a presença de estafilococos usualmente indica contaminação proveniente de pele, boca ou nariz dos manipuladores¹⁶. As bactérias do gênero *Staphylococcus*, principalmente aquelas produtoras de coagulase, como *Staphylococcus aureus*, são as mais comumente envolvidas nos quadros de intoxicação alimentar, resultante da produção de enterotoxinas relativamente resistentes ao calor e às enzimas proteolíticas¹⁷. Os quadros de intoxicação apresentam sintomas característicos como náusea, vômito, cólica abdominal e diarreia, que surgem cerca de duas a quatro horas após a ingestão de alimento que contém a enterotoxina². Faheina Jr et al⁹ encontraram a presença de *Staphylococcus aureus* em 50% das amostras

colhidas das mãos de manipuladores de serviço de alimentação coletiva, alertando para o envolvimento dos manipuladores em surtos de intoxicação alimentar por esse agente. Em um monitoramento microbiológico das mãos de manipuladores de alimentos em um restaurante institucional, Almeida et al⁴ também detectaram a presença de *S. aureus*. Esses dados reafirmam a importância do treinamento dos manipuladores de alimentos em práticas de higiene pessoal e laboral como forma de prevenir a intoxicação alimentar causada por este agente. Além disso, em restaurantes do tipo *self-service*, a exposição do alimento e sua manipulação pelos consumidores também constituem importantes fatores de contaminação, devido à introdução do micro-organismo a partir das mãos, dos braços e da saliva das pessoas no momento de servirem-se.

Estafilococos coagulase-positiva também podem estar presentes em equipamentos e utensílios, em decorrência de falhas nos procedimentos de higienização das superfícies de trabalho. Em condições ideais, eles se aderem, interagem com as superfícies e desencadeiam crescimento celular. Essa multiplicação dá origem a colônias e, quando a massa celular é suficiente para agregar nutrientes, resíduos e outros micro-organismos, forma-se um biofilme¹⁸. Embora a legislação brasileira estabeleça limites toleráveis para a contagem de *Bacillus cereus* em alimentos prontos à base de carne, em nenhuma das amostras analisadas se detectou a presença dessa bactéria. A grande capacidade de multiplicação de *B. cereus* em diferentes alimentos prontos, principalmente naqueles preparados com muita antecedência ao consumo e deixados em temperaturas favoráveis, é um fator importante para desencadear episódios de intoxicações, muitos dos quais sequer vêm a ser diagnosticados¹⁹. De acordo com Germano¹⁶, a incidência de surtos provocados por *B. cereus* tem diminuído consideravelmente em todo mundo, provavelmente devido à melhoria das condições de higiene dos estabelecimentos de manipulação dos alimentos e, também, à diminuição da contaminação de especiarias utilizadas como ingredientes.

De acordo com a legislação brasileira, a presença de *Salmonella* spp. não é tolerada em 25 g de qualquer tipo de alimento. Os alimentos provenientes de aves e aqueles que contêm ovos têm sido frequentemente envolvidos em surtos de gastroenterites em humanos, ocasionados por este agente²⁰. A ausência de *B. cereus* e *Salmonella* spp. também foi verificada em amostras de alimentos prontos para o consumo vendidos em supermercados¹⁰.

Os resultados do presente estudo apontam para a necessidade de uma atenção rigorosa às condições sanitárias de preparo e exposição dos alimentos a serem consumidos, uma vez que a ingestão de alimentos com contaminação microbiana constitui um risco potencial para a saúde pública.

CONCLUSÃO

Coliformes a 35 e a 45°C, *Escherichia coli* e estafilococos coagulase-positiva foram detectados nas amostras de refeições prontas para consumo, indicando a necessidade de cuidados higiênicos mais rigorosos no preparo e na exposição dos alimentos destinados ao consumo humano.

REFERÊNCIAS

1. Germano MIS. Treinamento de Manipuladores de Alimentos: Fator de Segurança Alimentar e Promoção da Saúde. São Paulo: Varela; 2003.
2. Silva Jr EA. Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos. 5ª ed. São Paulo: Varela; 2002.
3. Zoli JA, Negrete IRA, Oliveira TCRM. Avaliação da Contaminação por *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* sp., de maionese de batata comercializada em Londrina, PR. *Rev Hig Aliment*. 2002; 16(96): 62-71.
4. Almeida RCC, Kuaye AY, Serrano AM. Avaliação e controle da qualidade microbiológica de mãos de manipuladores de alimentos. *Rev Saúde Pública*. 1995; 29: 290-4.
5. Franco BDG de M, Landgraf M. Microrganismos Patogênicos de Importância em Alimentos. In: Franco BDG de M, Landgraf M. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Atheneu; 2002. p. 33-71.
6. Downes FP, Ito K. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4ª ed. Washington: American Public Health Association; 2001.
7. Carmo GMI, Oliveira AA, Dimech CP, Santos DA, Almeida MG, Berto LH et al. Vigilância Epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999-2004. *Bol Eletrôn Epidem*. 2005; 5(6): 1-7.
8. Brasil, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004. Dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação, Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 16 set. 2004. Seção 1, p.25.

9. Faheina Jr GS, Rêgo SL, Fonteles TV, Martins CM, Melo VMM, Martins SCS. Avaliação microbiológica de equipamentos, utensílios e manipuladores de alimentos, em Unidade de Alimentação e Nutrição da Universidade Federal do Ceará. *Rev Hig Aliment*. 2008; 22(158): 59-63.
10. Costa AA, Souza Júnior VM, Coelho AFS. Avaliação microbiológica de saladas de vegetais servidas em restaurantes *self service* na cidade de Palmas, TO. *Rev Hig Aliment*. 2008; 22(159): 27-32.
11. Poerner N, Rodrigues E, Palhano AL, Fiorentini, AM. Avaliação das condições higiênico-sanitárias em serviços de alimentação. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2009; 68(3): 399-405.
12. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington APHA. 2002.
13. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1, p.45-53.
14. Forsythe SJ. Microbiologia da segurança alimentar. Porto Alegre: Artmed; 2002.
15. Silva N, Junqueira VCA, Silveira NF de A. Manual e métodos de análise microbiológica de alimentos, 2ª ed. São Paulo: Varela; 2001.
16. Germano PMI, Germano MIS. Higiene e vigilância sanitária de alimentos. São Paulo: Varela; 2001.
17. Costerton JW, Marrie TJ, Cheng KJ. Phenomena of bacterial adhesion. In: Savage, DC, Fletcher, M (Ed.) London: Plenum Press 1985; 3-43.
18. Zottola EA. Microbial attachment and biofilm formation: a new problem for the food industry. *Food technol*. 1994; 48: 107-14.
19. Azeredo RMC. Estimativa de riscos relacionados à contaminação de preparações de arroz por *Bacillus cereus* [dissertação de mestrado]. Campinas (SP): Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP; 1998.
20. Altekruze SF, Cohen ML, Swerdlow DL. Emerging foodborne diseases. *Emerg Infect Dis* 1997; 3: 285-93.

Pesquisa de bacteriófagos em água suspeita de contaminação por vírus da hepatite A

Study of bacteriophages in water suspected of contamination by hepatitis A virus

RIALA6/1288

Ana Maria Ramalho de PAULA^{1*}, Giselle Ibette Lopez LOPES¹, Harumi SAKUMA¹, Ana Paula de SOUZA¹, Christiane Asturiano RISTORI¹, Ruth Estela Gravato ROWLANDS¹, Marli UEDA², Maria Luisa BARBOSA¹, Miyoko JAKABI¹

*Endereço para correspondência: ¹Núcleo de Microbiologia, Centro de Alimentos, Instituto Adolfo Lutz Central. Av. Dr. Arnaldo, 355, Cerqueira César – São Paulo, SP, Fone: (11) 3068 2932. email: aramalho@ial.sp.gov.br

²Núcleo de Microscopia Eletrônica, Centro de Procedimentos Interdisciplinares, Instituto Adolfo Lutz Central
Recebido: 16.04.2010 – Aceito para publicação: 25.05.2010

RESUMO

Os vírus entéricos, quando presentes no trato gastrointestinal de indivíduos infectados, são eliminados pelas fezes em grandes quantidades podendo contaminar, direta ou indiretamente, as águas destinadas ao consumo humano. O ser humano é o único hospedeiro natural do vírus da hepatite A. A detecção de colifago e de fago de *Shigella sonnei* em água pode ser indicativa da presença destes vírus. No presente estudo foi realizado o diagnóstico laboratorial presuntivo de um surto de hepatite A, pela pesquisa de bacteriófagos, em uma amostra de água de poço e o estudo da sobrevivência dos fagos de *S. sonnei* em água. A análise revelou resultado positivo para fagos de *Shigella* e negativo para colifagos. Quanto aos ensaios de sobrevivência, a presença dos fagos de *S. sonnei* foi detectada na água do poço naturalmente contaminada até o nono dia de conservação em temperatura ambiente.

Palavras chave. colifago, fago de *Shigella sonnei*, água de poço, vírus da hepatite A

ABSTRACT

The enteric viruses are present in the gastrointestinal tract of infected individuals, being eliminated in feces in large quantities and can directly or indirectly contaminate water intended for human consumption. Humans are the only natural hosts for hepatitis A. Detection of coliphages and phage of *Shigella sonnei* in water may indicate the presence of these viruses. In the present study was done the presumptive laboratory diagnosis of an outbreak of hepatitis A through search of bacteriophages in a sample of well water and the study of survival of shigelafagos in water. The analysis revealed positive for phages of *S. sonnei* and negative for coliphages. For the tests of survival, the presence of phages of *S. sonnei* was detected in naturally contaminated well water until the ninth day of storage at room temperature.

Key words. coliphages, phage of *Shigella sonnei*, well water, hepatitis A virus

Os vírus entéricos, quando presentes no trato gastrointestinal de indivíduos infectados, são eliminados por meio das fezes em grandes quantidades, podendo contaminar, direta ou indiretamente, as águas destinadas ao consumo humano ou para fins de recreação. A ingestão de água contaminada com esses vírus pode causar diferentes patologias em humanos¹.

Dentre os diversos tipos de vírus entéricos patogênicos ao homem e que podem estar presentes em água contaminada, destaca-se o vírus da hepatite A que é endêmico no Brasil e na América Latina². Devido à dificuldade de detecção do vírus da hepatite A em água, sugere-se a pesquisa de bacteriófagos como indicadores da presença de vírus entéricos, uma vez que esses fagos podem estar presentes em fezes humanas e de animais, apresentam tamanho e morfologia semelhantes às do grupo de vírus entéricos patogênicos e possuem características de sobrevivência similares¹.

A detecção dos bacteriófagos é baseada na capacidade dos fagos de infectar, multiplicar e lisar células bacterianas específicas³. Os colífagos (fagos de *Escherichia coli*) e os fagos de *Shigella sonnei* podem ser considerados indicadores da presença de vírus entéricos em água⁴.

Os objetivos do presente estudo foram a realização do diagnóstico laboratorial presuntivo de um surto de hepatite A, pela pesquisa de bacteriófagos, em uma amostra de água e o estudo da sobrevivência dos fagos de *Shigella sonnei* em água.

As cepas receptoras de fagos utilizadas no presente estudo foram *Escherichia coli* CIP 5530 e *Shigella sonnei* CIP 6310. As mesmas eram mantidas em ágar gelose conservação e antes do seu uso eram semeadas em caldo BHI (*brain heart infusion broth*) e incubadas a 35°C por 18-24h.

A amostra de água suspeita de causar hepatite A foi coletada pela Vigilância Sanitária do município de Francisco Morato, São Paulo. A amostra era proveniente de um poço utilizado para consumo de uma residência, habitada por seis pessoas, localizada em frente a um esgoto a céu aberto. No relato do surto, quatro crianças e um adulto apresentaram suspeita de hepatite A, sendo que um dos pacientes apresentou resultado positivo para o vírus (anti-HAV-IgM). A amostra foi coletada cinco dias após a suspeita clínica.

Foram realizados os seguintes ensaios: pesquisa de bacteriófagos, coliformes totais e *E. coli*. As pesquisas de coliformes totais e *E. coli* foram realizadas em meio cromogênico fluorogênico (Colilert-IDEXX).

A metodologia usada para pesquisa de colífagos e de fagos de *Shigella sonnei* seguiu a descrita por Serres et al⁵, com modificação no tempo e temperatura de incubação. As cepas de *E. coli* CIP 5530 e *S. sonnei* CIP 6310 foram semeadas em caldo BHI e incubadas a 30°C por 18-24h. Em um frasco contendo 50 mL de caldo bacteriófago foi semeado 50 mL da amostra de água suspeita e inoculadas 20 gotas da cultura de *S. sonnei* CIP 6310. Em outro frasco com 50 mL de caldo bacteriófago foi semeado 50 mL de água e inoculadas 20 gotas da cultura de *E. coli* CIP 5530. Os frascos foram incubados a 35°C por 6h. Após a incubação, as culturas foram filtradas em membrana filtrante de 0,22 µm. Simultaneamente as culturas de *E. coli* e *S. sonnei* foram semeadas, separadamente, para um novo caldo BHI e incubadas a 35°C por 6h. Após a semeadura, duas a três gotas de cada cultura, de *E. coli* e de *S. sonnei*, foram separadamente semeadas sobre a superfície de placas de ágar nutritivo, com auxílio de alça de Drigalski. As placas foram incubadas a 35°C por 30 minutos. Após esse período, no centro da placa de ágar nutritivo, contendo cultura de *E. coli*, foi gotejada uma gota do filtrado de *E. coli*. O mesmo procedimento foi realizado com o filtrado de *S. sonnei*. As placas foram mantidas em temperatura ambiente por 30 minutos e após este período foram incubadas a 35°C por 24h.

A área circular, em que foi realizada o gotejamento do filtrado, sem desenvolvimento bacteriano (lise de uma das cepas receptoras), foi submetida à técnica de coloração negativa⁶ utilizando fosfotungstato de potássio 2% (PTK) pH 6.4 para tentativa de detecção de partículas de bacteriófagos por ME (Microscopia Eletrônica). As grades preparadas foram examinadas em um microscópio eletrônico JEOL JEM-1011 operando a 60 kV e os bacteriófagos foram registrados em uma câmera digital CCD.

Os resultados da análise de potabilidade da amostra de água revelaram presença de coliformes totais e *E. coli*, não sendo, portanto, adequada para o consumo humano.

Quanto à pesquisa de bacteriófagos, os ensaios revelaram a inibição da multiplicação de *S. sonnei* no círculo delimitado, ou seja, indicando resultado positivo para a presença de fagos. A placa positiva para os fagos de *S. sonnei* foi submetida à análise por microscopia eletrônica e revelou partículas de bacteriófagos em grandes quantidades. Os fagos apresentavam cabeça em forma hexagonal medindo cerca de 100 nm e uma cauda rígida de aproximadamente 120 nm como mostra a Figura 1.

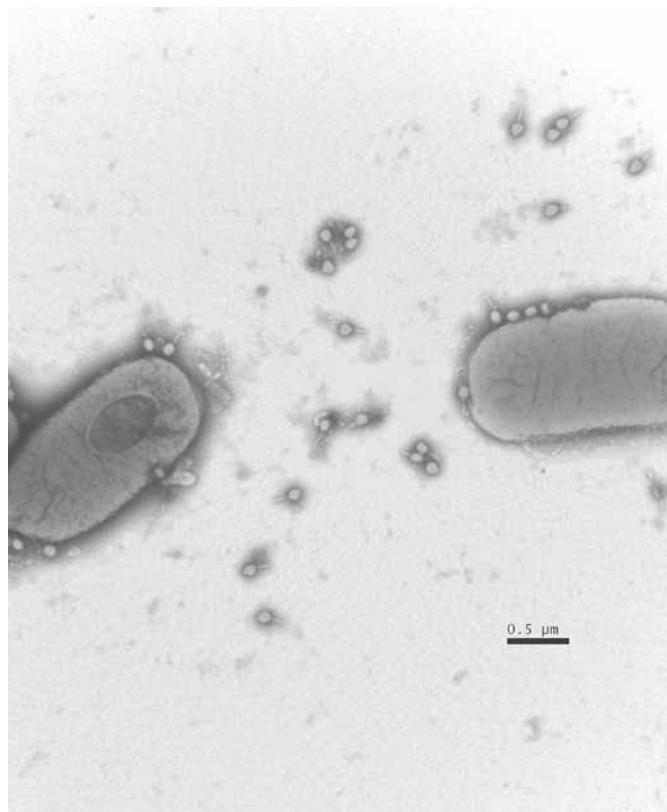


Figura 1. Fotomicrografia demonstrando partículas de fagos de *Shigella sonnei* isolados e acoplados à bactéria

Após a confirmação dos resultados pela microscopia eletrônica, foram realizados ensaios para avaliar a sobrevivência dos fagos de *S. sonnei* em água. A amostra de água enviada para análise foi mantida em temperatura ambiente por 30 dias e, semanalmente, era realizada a pesquisa de fagos de *Shigella*. A presença de fagos de *S. sonnei* foi detectada na água do poço naturalmente contaminada até o nono dia de conservação.

Muitos fatores influenciam a contaminação viral das águas superficiais. Estes fatores incluem a distância da descarga de esgoto percorrido pelo vírus, o período epidêmico, a concentração viral inicial, a sobrevivência e as propriedades de transporte do vírus, ou seja, os vírus podem estar livres ou unidos aos sólidos em suspensão e às condições ambientais (temperatura, circulação de ar, salinidade e pH). Consequentemente, o monitoramento da água do rio, a maior fonte de água potável, é uma tarefa complexa⁷. Além disso, os processos de tratamento convencional da água para consumo humano podem não ser eficientes para a remoção de alguns vírus, tais como o vírus da hepatite A.

Diferentes autores têm evidenciado surtos de hepatite A associados ao consumo de água potável e a uti-

lização de águas de recreação contaminadas⁸. O HAV tem sido detectado em águas de poço⁹, sistemas de tratamento de esgotos, rios, córregos e esgotos¹⁰.

Em amostras ambientais, especialmente em águas, a detecção de vírus, quando comparada à de bactérias, é mais complexa, considerando que normalmente os vírus são encontrados em baixas quantidades, não se multiplicam na água ou no ambiente e sua sobrevivência fora do hospedeiro é curta, sendo necessária a análise de grandes volumes de água para que haja maior concentração das partículas virais.

Os resultados do presente estudo, quanto aos ensaios de sobrevivência dos fagos de *S. sonnei*, demonstram a importância do tempo entre a coleta e o envio da amostra de água para análise de bacteriófagos e elucidação de casos suspeitos de hepatite A.

REFERÊNCIAS

1. Tavares TM, Cardoso DDP, Brito WMED. Vírus entéricos veiculados por água: aspectos microbiológicos e de controle de qualidade da água. *Rev Patol Tropical*. 2005; 34(2):85-104.
2. Ferreira CT, Silveira TR. Hepatites virais: aspectos da epidemiologia e da prevenção. *Rev Bras Epidemiol*. 2004;7 (4):473-87.
3. Gelli DS, Souza A. Bacteriófagos fecais em águas, verduras cruas não lavadas e outros produtos alimentícios: observações quanto ao seu achado durante surto de hepatite infecciosa e em condição normal. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 1992;52(1:2):63-9.
4. Amaral LA, Rossi Júnior OD, Filho NA, Alexandre AV. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária da água de poços rasos localizados em uma área urbana: utilização de colifagos em comparação com indicadores bacterianos de poluição fecal. *Rev Saúde Pública*. 1994;28(5):345-8.
5. Serres L, Amariglio S, Petransxiene D. Ministère de L'Agriculture-Direction des Services Vétérinaires-Contrôle de la Qualité des Produits Laitiers- Tome II Analyse Microbiologique et Analyse Sensorielle, Micr.IV-C; 1973.p.8-9.
6. Brenner S & Horne RW. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochim Biophys Acta*. 1959;34:103-10.
7. Skrabber S, Gassilloud B, Gantzer C. Comparison of Coliforms and Coliphages as Tools for Assessment of Viral Contamination in River Water. *Appl Environ Microbiol*. 2004;70(6):3644-9.
8. Frost FJ, Kund TR, Craun GF. Is contaminated groundwater an important cause of viral gastroenteritis in the United States? *J Environ Health*. 2002;65:9-14.
9. Borchardt MA, Bertz PD, Spencer SK, Batigelli DA. Incidence of Enteric Viruses in Groundwater from Household Wells in Wisconsin. *Appl Environ Microbiol*. 2003;69(2):1172-80.
10. Sassaroli A, Garrafa P, Santos FM, Hársi CM, Vieira MJ, Monezi TA et al. Detection of Hepatitis A in wastewater samples in São Paulo city, Brazil. *Virus Rev Res*. 2000;5:100.

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://bvsmodeo.bvsalud.org/site/lilacs/homepage.htm>. O nome da base de dados, sigla e/ou número do ensaio clínico, assim como o número do processo e o nome da comissão de ética que aprovou o projeto, deverão ser colocados ao final do RESUMO. Nos casos de ensaios envolvendo animais, estes deverão atender a Lei Federal 9605 contra crimes ambientais, a Lei Federal 6638/76 e a Lei 11.794/08, que normatiza a utilização de animais em pesquisa científica. Os autores deverão ter em seu poder todos os documentos referentes a este procedimento, que poderão ser solicitados em qualquer momento pelos editores.

Os autores serão responsáveis por reconhecer e revelar conflitos financeiros, de interesse comercial e/ou associativo, relacionados ao material de trabalho ou outros que possam influenciá-los, apresentando uma declaração sobre a existência ou não de tais conflitos. Os relatores também devem revelar aos editores qualquer conflito que possa influir ou impedir as suas avaliações.

Os manuscritos publicados são de propriedade da RIAL. A transferência de direitos autorais será solicitada após a aprovação do manuscrito para publicação.

INFORMAÇÕES GERAIS

Os manuscritos submetidos à publicação na RIAL devem ser apresentados de acordo com as Instruções aos Autores.

São aceitos manuscritos nos idiomas: português e inglês.

O manuscrito deve ser encaminhado em formato eletrônico (e-mail) ou impresso, aos cuidados do editor-chefe da RIAL, no seguinte endereço:

Revista do Instituto Adolfo Lutz (RIAL)

Núcleo de Acervo

Av. Dr. Arnaldo, 355 - Cerqueira César - São Paulo - SP - Brasil - CEP: 01246-902

Ou por meio eletrônico em rial@saude.sp.gov.br

Pormenores sobre os itens exigidos para apresentação do manuscrito estão descritos a seguir.

1. CATEGORIA DE ARTIGOS

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

INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES:

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

- As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 05 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas.
- As referências bibliográficas, limitadas a 40, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.
- Os resumos em português e em inglês (*abstract*) devem ter até 200 palavras, com a indicação de 3 a 6 palavras-chave (*key words*). A estrutura dos artigos originais de pesquisa é a convencional: Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão e Conclusão, embora outros formatos possam ser aceitos, mas respeitando a lógica da estrutura de artigos científicos.

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

Informações complementares:

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

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

Informações complementares:

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

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

Informações complementares:

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

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

Informações complementares:

- Devem ter até 03 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.
- As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 02 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas.
- As referências bibliográficas, limitadas a 10, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.

- Os resumos em português e em inglês (*abstract*) devem ter até 200 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (*key words*).
- Devem apresentar Introdução, Relato de caso, Discussão e Conclusão, na forma de texto único.

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

Informações complementares:

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

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

2.1 PÁGINA DE IDENTIFICAÇÃO: Deve constar:

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

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

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

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

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

2.2 PREPARO DO MANUSCRITO:

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

Palavras-chave/key words: Devem ser indicados entre 3 a 6 descritores do conteúdo, extraídos do vocabulário Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) da Bireme (disponível em <http://www.bireme.br>) nos idiomas português e inglês. Em inglês, com base no *Medical Subject Headings (MeSH)*. Caso não sejam encontrados descritores adequados para a temática do manuscrito, poderão ser indicados termos não existentes nos conjuntos citados.

Estrutura do texto:

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

B) Material e Métodos: Os procedimentos adotados devem ser descritos claramente, bem como as variáveis analisadas, com a respectiva definição, quando necessária, e a hipótese a ser testada. Devem ser descritas a população e a amostra, instrumentos de medida, com a apresentação, se possível, de medidas de validade e conter informações sobre a coleta e processamento de dados. Deve ser incluída a devida referência para os métodos e técnicas empregados, inclusive os métodos estatísticos; métodos novos ou substancialmente modificados devem ser descritos, justificando as razões para seu uso e mencionando suas limitações. Os critérios éticos da pesquisa devem ser respeitados; os autores devem explicitar que a pesquisa foi conduzida dentro de padrões éticos e foi aprovada por comitê de ética, indicando o nome do comitê de ética, número e data do registro.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Exemplos:

Artigos de periódicos:

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

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

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

Livros:

Ringsven MK, Bond D. *Gerontology and leadership skills for nurses*. 2ª ed. Albany (NY):Delmar Publishers;1996.

Lopez D, organizador. *Estudos epidemiológicos qualitativos*. São Paulo: James Martim; 2009.

Institute of Medicine (US). *Looking at the future of the Medicaid program*. Washington (DC): The Institute; 1992.

Foley KM, Gelband H, editors. *Improving palliative care for cancer*. Washington: National Academy Press 2001 [acesso 2003 Jul 13]. Disponível em: [http://www.nap.edu/catalog.php?record_id=10149].

Capítulos de livro:

Wirdh L. História da Epidemiologia. In: Lopez D, organizador. Estudos epidemiológicos qualitativos. São Paulo: James Martim; 2009.p.64-76.

Dissertações, teses e monografias:

Santos EP. Estabilidade química da manteiga da terra [dissertação de mestrado]. Bananeiras (PB): Universidade Federal da Paraíba;1995.

Moreschi ECP. Desenvolvimento e validação de métodos cromatográficos e avaliação da estabilidade de vitaminas hidrossolúveis em alimentos [tese de doutorado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2006.

Trabalhos de congressos, simpósios, encontros, seminários e outros:

Barboza et al. Descentralização das políticas públicas em DST/AIDS no Estado de São Paulo. III Encontro do Programa de Pós-Graduação em Infecções e Saúde Pública; agosto de 2004; São Paulo: Rev Inst Adolfo Lutz. p. 34 [resumo 32-SC].

Dados eletrônicos:

Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo – SABESP. O que fazemos/Qualidade da água. [acesso 2008 Set 17]. Disponível em: [http://www.sabesp.com.br/CalandraWeb/CalandraRedirect/?temp=4&proj=sabesp&pub=T&db=&doc].

Legislação:

Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1, nº7-E. p.45-53.

Autoria institucional:

Instituto Adolfo Lutz (São Paulo - Brasil). Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 4ª ed. Brasília (DF): ANVISA; 2005.

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 electrophysiology of the heart. US patent 5,529,067. 1995 Jun 25.

Casos não contemplados nesta instrução devem ser citados conforme indicação do *Committee of Medical Journals Editors (Grupo Vancouver)*, disponível em: <http://www.cmje.org>.

Referências a documentos não indexados na literatura científica mundial, em geral de divulgação circunscrita a uma instituição ou a um evento (teses, relatórios de pesquisa, comunicações em eventos, dentre outros) e informações extraídas de documentos eletrônicos, não mantidas permanentemente em sites, se relevantes, devem figurar no rodapé das páginas do texto onde foram citadas.

2.5 NÚMEROS DE FIGURAS E TABELAS: A quantidade de figuras e tabelas de cada manuscrito deve respeitar a quantidade definida para cada categoria de artigos aceitos pela RIAL. Todos os elementos gráficos ou tabulares apresentados serão identificados como *figura* ou *tabela*, e numerados sequencialmente a partir de um, e não como *quadros*, *gráficos* etc.

A) Tabelas: Devem ser apresentadas em arquivos separados, numeradas consecutivamente com algarismos arábicos, na ordem em que foram citadas no texto. A cada uma deve-se atribuir um título breve, não se utilizando traços internos horizontais ou verticais. As notas explicativas devem ser limitadas ao menor número possível e colocadas no rodapé das tabelas e não no cabeçalho ou título. Se houver tabela extraída de outro trabalho, previamente publicado, os autores devem solicitar formalmente autorização da revista que a publicou, para sua reprodução.

B) Figuras: As ilustrações (fotografias, desenhos, gráficos etc.) devem ser citadas como Figuras apresentadas em arquivos separados e numeradas consecutivamente com algarismos arábicos, na ordem em que foram citadas no texto. Devem conter título e legenda apresentados na parte inferior da figura. Só serão admitidas para publicação figuras suficientemente claras e com qualidade digital que permitam sua impressão, preferencialmente no formato vetorial. No formato JPEG, a resolução mínima deve ser de 300 dpi. Figuras em cores serão publicadas quando for necessária à clareza da informação e os custos deverão ser cobertos pelos autores. Se houver figura extraída de outro trabalho, previamente publicado, os autores devem solicitar autorização, por escrito, para sua reprodução.

3. DECLARAÇÕES E DOCUMENTOS SOLICITADOS: Em conformidade com as diretrizes do *International Committee of Medical Journal Editors*, são solicitados alguns documentos e declarações do(s) autor(es) para a avaliação de seu manuscrito. Observe a relação dos documentos abaixo e, nos casos em que se aplique, anexe o documento ao processo. O momento em que tais documentos serão solicitados é variável:

Documento/declaração	Quem assina	Quando anexar
Carta de Apresentação	Todos	Submissão
Responsabilidade pelos Agradecimentos	Autor responsável	Aprovação
Transferência de Direitos Autorais	Todos	Aprovação

A carta de Apresentação do manuscrito, assinada por todos os autores, deve conter:

- Um parágrafo declarando a responsabilidade de cada autor: ter contribuído substancialmente para a concepção e planejamento ou análise e interpretação dos dados; ter contribuído significativamente na elaboração do rascunho ou na revisão crítica do conteúdo; e ter participado da aprovação da versão final do manuscrito. Para maiores informações sobre critérios de autoria, consulte a página do ICMJE (<http://www.icjme.org>).
- Um parágrafo contendo a declaração de potenciais conflitos de interesses dos autores.
- Um parágrafo contendo a declaração que o trabalho não foi publicado, parcial ou integralmente, em outro periódico. Todos os autores devem ler, assinar e enviar documento transferindo os direitos autorais. O artigo só será liberado para publicação quando esse documento estiver de posse da RIAL.

4. VERIFICAÇÃO DOS ITENS EXIGIDOS NA SUBMISSÃO:

1. Nome e instituição de afiliação de cada autor, incluindo e-mail e telefone do autor responsável.
2. Título do manuscrito, em português e inglês.
3. Texto apresentado em letras *Times New Roman*, corpo 12, em formato *Word* ou similar (doc, txt, rtf).
4. Resumos em dois idiomas, um deles obrigatoriamente em inglês.
5. Carta de Apresentação assinada por todos os autores.
6. Nome da agência financiadora e número(s) do processo(s).
7. No caso de artigo baseado em tese/dissertação, indicar o nome da instituição/Programa, grau e o ano de defesa.
8. Referências normalizadas segundo estilo Vancouver, ordenadas pela citação no texto e numeradas, e se todas estão citadas no texto.
9. Tabelas numeradas sequencialmente, com título e notas, e no máximo com 12 colunas.
10. Figura no formato vetorial ou 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