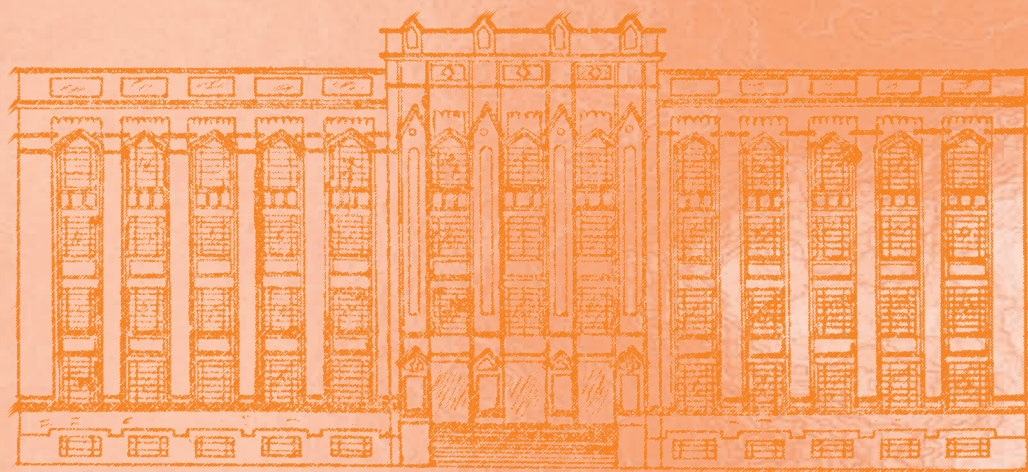


# REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO  
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE

ISSN 0073-9855  
RIALA6



Volume 69 número 1, 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 1, 2010  
Janeiro – Março 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

**Setor de Publicações**

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(1)

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](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](mailto:rial@saude.sp.gov.br)

■ ARTIGOS ORIGINAIS/ORIGINAL ARTICLES

- 1249 **A importância de programas de monitoramento da qualidade da água para diálise na segurança dos pacientes**  
The relevance of the program for monitoring dialysis water quality for the patient safety  
MÁRCIA LIANE BUZZO, ADRIANA BUGNO, ADRIANA APARECIDA BUZZO ALMODOVAR, CARMEM SILVIA KIRA,  
MARIA DE FÁTIMA HENRIQUES CARVALHO, ARLETE DE SOUZA, MARIA ANITA SCORSAFAVA.....1-6
- 1250 **Monitoramento da qualidade do leite humano ordenhado e distribuído em banco de leite de referência**  
Monitoring the quality of human milk distributed by a reference milk banks  
PATRÍCIA PINHEIRO RAFAEL DE SOUSA, JOÃO ANDRADE SILVA.....7-14
- 1251 **Desenvolvimento de material de referência para ensaio de proficiência em microbiologia de alimentos**  
Development of reference materials for proficiency tests in food microbiology  
CARLA DE OLIVEIRA ROSAS, MARCELO LUIZ LIMA BRANDÃO, SILVIA MARIA LOPES BRICIO, VALÉRIA DE MELLO  
MEDEIROS, SAMARA PINTO CUSTÓDIO BERNARDO, MARCUS HENRIQUE CAMPINO DE LA CRUZ,  
PAOLA CARDARELLI-LEITE.....15-22
- 1252 **Qualidade do leite na indústria de laticínios**  
The quality of the milk stored in dairy industries silos  
MARCO ANTÔNIO PEREIRA DA SILVA, PRISCILA ALONSO DOS SANTOS, KAREN MARTINS LEÃO,  
RODRIGO BALDUÍNO SOARES NEVES, KÁTIA CYLENE GUIMARÃES, EDMAR SOARES NICOLAU.....23-28
- 1253 **Microrganismos indicadores de qualidade higiênico-sanitária em ostras (*Crassostrea gigas*) e águas salinas de fazendas marinhas localizadas na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina, Brasil**  
Hygienic sanitary indicator of microorganisms in oysters (*Crassostrea gigas*) and saline waters from sea farms in Baía Sul at Santa Catarina's Island, Brazil  
ROBERTA JULIANO RAMOS, MURILO ANDERSON PEREIRA, LETICIA ADÉLIA MIOTTO,  
LUIZ FERNANDO BLEYER DE FARIA, NELSON SILVEIRA JUNIOR, CLEIDE ROSANA WERNECK VIEIRA.....29-37
- 1254 **Evolução da microbiota contaminante em linha de processamento de queijos Minas frescal e ricota**  
Evolution of microbial contaminants in the processing line of Minas frescal and ricotta cheeses  
Vidiany Aparecida Queiroz SANTOS, Fernando Leite HOFFMANN.....38-46
- 1255 **Avaliação da contaminação por matérias estranhas em carne de sol comercializada em “casas do norte”**  
Study on contaminats materials in “sun meat” on the market at the “houses of the North”  
TATIANA ALMEIDA MENNUCCI, MARIA APARECIDA MORAES MARCIANO, MÁRCIA BITTAR ATUI,  
ADELINO POLI NETO, PEDRO MANUEL LEAL GERMANO.....47-54
- 1256 **Avaliação do perfil microbiológico e microscópico do caldo de cana *in natura* comercializado por ambulantes**  
Study on microbiological and microscopic profiles of *in natura* sugar-cane juice marketed by street vendors  
SONIA DE PAULA TOLEDO PRADO, ALZIRA MARIA MORATO BERGAMINI, ELIANA GUIMARÃES ABEID RIBEIRO,  
MARIAMÉLIA DE CAMPOS SELLI CASTRO, MARIA APARECIDA DE OLIVEIRA.....55-61

- 1257 **Avaliação dos itens obrigatórios na rotulagem nutricional de produtos lácteos fermentados**  
Evaluation of mandatory nutritional on labels in the fermented dairy products available onto market  
ALINE ZAGO DE GRANDI, DAISE APARECIDA ROSSI.....62-68
- 1258 **Uso da *Spirulina platensis* na recuperação de ratos submetidos à dieta de restrição proteica**  
Use of *Spirulina platensis* for recovering rats under protein restriction diet feeding  
NILCIMELLY RODRIGUES DONATO, JOÃO ANDRADE DA SILVA, MARIA JOSÉ DE CARVALHO COSTA,  
MAYARA QUEIROGA BARBOSA, FRANCISCA MARTINS BION, EDVALDO VASCONCELOS DE CARVALHO FILHO,  
ROBSON CAVALCANTE VERAS, ISAC ALMEIDA DE MEDEIROS .....69-77
- 1259 **Teores de carotenoides em produtos de tomate**  
Carotenoid contents in Brazilian tomato products  
CINTIA NANCI KOBORI, LÍZIA SENGER HUBER, MIEKO KIMURA, DELIA B. RODRIGUEZ-AMAYA.....78-83
- 1260 **Elaboração de massa fresca de macarrão enriquecida com pescado defumado**  
Production of fresh pasta enriched with smoked fish  
MÁRCIA LUZIA FERRAREZI MALUF, CARLOS EDUARDO WEIRICH, JACKELINE M. DALLAGNOL,  
MÁRCIA REGINA SIMÕES, ALDI FEIDEN, WILSON ROGÉRIO BOSCOLO.....84-90
- 1261 **Avaliação da qualidade de óleos e gorduras de fritura em bares, restaurantes e lanchonetes**  
Assessment of used frying oils and fats in bars, restaurants and snack bars  
VALÉRIA MACEDO ALMEIDA CAMILO, DEUSDÉLIA TEIXEIRA DE ALMEIDA, MARIA DA PURIFICAÇÃO NAZARÉ ARAÚJO,  
LAFAIETE ALMEIDA CARDOSO, JÚLIA CARVALHO ANDRADE, MARINA BONELLI.....91-98
- 1262 **Melhoria das condições de higiene em pontos de venda de cachorro-quente**  
Improvement of the hygiene conditions in hot dog points of sale  
FERNANDA BERBICZ, TÂNIA MARIA DE SOUZA GENTA, CAMILA SAMPAIO MANGOLIN,  
JULIANA CATTI FLORES FIDELIS, LÍVIA ROSAS FERREIRA, JULIA REGINA TEDESCO RODELLA,  
MÁRCIA PORTILHO, GRACIETTE MATIOLI.....99-105
- 1263 **Capacidade antioxidante da microalga *Spirulina platensis* em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* submetidas ao estressor paraquat**  
Antioxidant capacity of microalgae *Spirulina platensis* on *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells exposed to paraquat estressor  
CÍNTIA GUARIENTI, TELMA ELITA BERTOLIN, JORGE ALBERTO VIEIRA COSTA.....106-111
- 1264 **Variação da qualidade do leite cru refrigerado em função do período do ano e do tipo de ordenha**  
Change in quality of cooled raw milk by the effect of the year period and the type of milking  
MARCO ANTÔNIO PEREIRA DA SILVA, PRISCILA ALONSO DOS SANTOS, JOSÉ WALDEMAR DA SILVA,  
KAREN MARTINS LEÃO, ANTÔNIO NONATO DE OLIVEIRA, EDMAR SOARES NICOLAU.....112-118
- 1265 **Comparação dos resultados de exames preventivos e de rastreamento de câncer de colo do útero em mulheres brasileiras**  
A Comparison of results of preventive examinations and screening of uterine cervix cancer in brazilian women  
FERNANDA ARCARO, NICOLLE DE ARAÚJO MACHADO, PAULO SCHIAVOM DUARTE, PATRÍCIA HAAS.....119-125

#### COMUNICAÇÃO BREVE/BRIEF COMMUNICATION

- 1266 **Epidemiological surveillance and susceptibility of *Staphylococcus aureus* among healthcare workers to a reference hospital: a preliminary assessment**  
Vigilância epidemiológica e susceptibilidade de *Staphylococcus aureus* em profissionais de saúde de um hospital de referência: Uma avaliação inicial  
EDUARDO CAETANO BRANDÃO FERREIRA DA SILVA, MARIA AMÉLIA VIEIRA MACIEL, FÁBIO LOPES DE MELO,  
ANA CATARINA DE SOUZA LOPES, IVANIZE DA SILVA ACA.....126-130

---

■ NOTA CIENTÍFICA/SHORT COMMUNICATION

**1267 Implantação e otimização da PCR em tempo real para o diagnóstico da influenza A (H1N1) pandêmica no Instituto Adolfo Lutz e perspectivas para 2010**

Implementation and optimization of real time PCR for diagnosis of pandemic influenza A (H1N1) at IAL and perspectives for 2010  
LUCILA OKUYAMA FUKASAWA, DANIELA BERNARDES SILVA, FABIANA CRISTINA PEREIRA DOS SANTOS,  
ISABEL TAKANO OBA, ADELE CATERINO-DE-ARAUJO, MARIA GISELE GONÇALVES, MARISTELA MARQUES SALGADO,  
CLAUDIO TAVARES SACCHI E GRUPO DE TRABALHO DE INFLUENZA A (H1N1) – INSTITUTO ADOLFO LUTZ, SÃO PAULO,  
SP, BRASIL\*\* .....131-135

**1268 Provável surto de toxinfecção alimentar em funcionários de uma empresa no litoral da região sudeste do Brasil**

Presumptive outbreak of food-borne disease among employees working for a company in the southeastern coastal region of Brazil  
ESTEVÃO DE CAMARGO PASSOS, ANA RUTH PEREIRA DE MELLO, CÍCERO VAGNER DE SOUSA,  
CARLOS ROBERTO DA SILVA, ANA CAROLINA BUCHALLA ALONSO, EDUARDO GONZALEZ, MÁRIO TAVARES.....136-140

**1269 A modified method for detecting of *Cryptosporidium* oocysts using DNA templates extracted from environmental samples**

Método modificado para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* utilizando DNA extraído de amostras ambientais  
RONALDA SILVA DE ARAÚJO, THEREZINHA TRAVASSOS DE CARVALHO, GLAVUR ROGÉRIO MATTÉ,  
LÍCIA NATAL FERNANDES, LÍVIA CARMINATO BALSALOBRE, MARIA HELENA MATTÉ.....141-143

■ RESUMOS DE TESES E DISSERTAÇÕES

**Characterization of oils extracted of fruit seeds: fatty acid composition, tocopherols and carotenoids**

Caracterização de óleos extraídos de sementes de frutas: composição de ácidos graxos, tocoferóis e carotenoides  
MALACRIDA, CR.....144



## A importância de programas de monitoramento da qualidade da água para diálise na segurança dos pacientes

The relevance of the program for monitoring dialysis water quality for the patient safety

RIALA6/1249

Márcia Liane BUZZO<sup>1\*</sup>, Adriana BUGNO<sup>2</sup>, Adriana Aparecida Buzzo ALMODOVAR<sup>3</sup>, Carmem Silvia KIRA<sup>1</sup>, Maria de Fátima Henriques CARVALHO<sup>1</sup>, Arlete de SOUZA<sup>4</sup>, Maria Anita SCORSAFAVA<sup>4</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Núcleo de Contaminantes Inorgânicos, Centro de Contaminantes, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil, 3068-2923. e-mail: marcialiane@ial.sp.gov.br

<sup>2</sup>Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil

<sup>3</sup>Núcleo de Ensaios Biológicos e de Segurança, Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil

<sup>4</sup>Núcleo de Embalagens Águas, Centro de Contaminantes, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil

Recebido: 19.01.2010 – Aceito para publicação: 30.03.2010

### RESUMO

Considerando a importância da qualidade da água tratada nos serviços de diálise para prevenção de riscos de infecção aos pacientes com insuficiência renal crônica, foi estabelecido o programa de monitoramento nos serviços de diálise do Estado de São Paulo, com base nos parâmetros estabelecidos pela Resolução RDC nº 154/2004. Foi atestada a efetividade das ações de vigilância sanitária que tem resultado em aumento dos níveis de qualidade da água tratada em vários dos parâmetros analisados, o que indica a importância da continuidade dos programas de monitoramento com intuito de garantir a segurança dos pacientes.

**Palavras-chave.** água para diálise, monitoramento da água, contaminantes da água, serviço de diálise, vigilância sanitária.

### ABSTRACT

Considering the relevance of the quality of treated water in dialysis units to prevent the risks for patients with chronic kidney diseases, a Monitoring Program has been established in order to evaluate the quality of treated water used in the dialysis units of the state of São Paulo, based on the parameters established by Resolution RDC # 154/2004. The effectiveness of the sanitary surveillance activities was evidenced because the consistent water quality has been improved on several analyzed parameters, which indicates the importance of keeping up the treated water-monitoring program at hemodialysis units in order to guarantee the patients safety.

**Key words.** dialysis water, water monitoring, water contaminants, hemodialysis unit, health surveillance.



## INTRODUÇÃO

A insuficiência renal crônica consiste em perda progressiva e irreversível da função dos rins, sendo um importante problema de saúde pública. De acordo com a Sociedade Brasileira de Nefrologia<sup>1</sup> há progressão anual no número de pacientes com insuficiência renal crônica no país da ordem de 8%, sendo estimados 87.044 pacientes em 2008, dos quais 90% em hemodiálise.

A hemodiálise é empregada para normalizar o balanço eletrolítico e a remoção de substâncias tóxicas do organismo com o uso de um rim artificial (ou dialisador) e de solução de diálise, composta principalmente por água. Considerando que o paciente é exposto a cerca de 18.000 litros de água ao ano, e que a água também é utilizada no reprocessamento (reuso) de dialisadores de uso múltiplo, sua qualidade química e microbiológica é essencial para evitar riscos adicionais ao paciente.

A presença de contaminantes químicos pode causar anemias, osteopatias, hipertensão, hipotensão, acidose, distúrbios neurológicos<sup>2-4</sup>. Contaminantes microbiológicos, como micro-organismos e endotoxinas, podem ser responsáveis por complicações agudas como infecções, reações pirogênicas, hipotensão, instabilidade cardiovascular, dor de cabeça e náuseas, ou crônicas relacionadas à presença de endotoxinas, como inflamação sistêmica crônica e desnutrição<sup>2,4,5</sup>. Considerando que as características da água podem influenciar a qualidade do tratamento dialítico e a sobrevivência dos pacientes<sup>3,4,6</sup>, foram estabelecidos padrões mínimos de qualidade, sendo que no Brasil, tais padrões foram inicialmente definidos na Portaria nº 2042/96<sup>7</sup> e atualmente, na Resolução RDC nº 154/2004<sup>8</sup>.

Em literatura, encontramos diversos relatos de surtos associados à qualidade da água tratada para diálise<sup>4,6,9-13</sup>, entretanto, como somente ocorrências catastróficas tendem a ser publicadas, não temos ideia real da frequência de efeitos adversos do tratamento dialítico relacionados a água tratada. Sendo a qualidade da água uma das principais fontes de risco em diálise, a prevenção pode ser efetiva se houver um sistema de vigilância que envolva coleta sistemática de informações, análise e interpretações de dados de forma organizada e periódica. Considerando isso, o Centro de Vigilância Sanitária do Estado de São Paulo (CVS/SP) realizou inspeções nos serviços de diálise, sendo que a primeira avaliação (1995) apontou procedimentos inadequados no tratamento da água em 74% deles. A

partir dos diagnósticos, ação conjunta entre CVS/SP e o Instituto Adolfo Lutz foi organizada para implantar programa de monitoramento da água tratada nos serviços de diálise, delineado para inspecionar todos os serviços do Estado e avaliar amostras coletadas nos pontos definidos na legislação.

Este estudo teve a finalidade descrever a condição das clínicas de diálise do Estado no que se refere à qualidade da água tratada e avaliar a efetividade dos programas de monitoramento na redução dos riscos aos pacientes dialíticos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os programas de monitoramento foram delineados para avaliar os serviços de diálise, quanto à qualidade da água utilizada no tratamento. Para esta avaliação utilizamos: a) questionários, aplicados pelos técnicos de vigilância sanitária durante a inspeção da clínica, que nos forneceram informações sobre o tipo de tratamento de água utilizado; b) coleta de amostras nos pontos definidos em legislação<sup>8</sup>: uma amostra na entrada da máquina de diálise (ponto contíguo à máquina) e outra na sala de reprocessamento (reuso) do dialisador.

Em 2008, as equipes técnicas de vigilância sanitária realizaram a coleta de 314 amostras provenientes dos 155 serviços de diálise do Estado de São Paulo. Em 2009, não aplicamos o programa nas clínicas da capital e, portanto, foram coletadas 216 amostras de 108 clínicas.

### Amostra

Para garantir a qualidade dos resultados, fornecemos todo material para coleta às equipes de vigilância sanitária, adequado ao tipo de análise que seria efetuado: frascos estéreis para análise microbiológica; frascos despirogenizados para determinação de endotoxinas bacterianas; quimicamente descontaminados e sem adição de conservantes para análises físico-químicas e com adição de conservantes apropriados para análise de contaminantes inorgânicos.

Também padronizamos as condições para a coleta e transporte de amostras, considerando as recomendações da *American Public Health Association* (APHA)<sup>14</sup>: os pontos de coleta foram desinfetados com álcool 70%; em seguida, a água foi mantida em escoamento por 3 a 5 minutos e, então, foi realizada a

coleta. As amostras foram mantidas sob refrigeração durante seu transporte ao laboratório.

### Critérios para rejeição de amostras

Amostras não refrigeradas foram rejeitadas pelo laboratório. Para as análises microbiológicas, foram rejeitadas as amostras recebidas após 12 horas da coleta.

### Procedimentos

As amostras foram avaliadas quanto aos parâmetros de qualidade definidos em legislação específica<sup>8</sup>.

### Análise Microbiológica

- Bactérias do grupo coliforme, por método da Presença-Ausência<sup>14</sup>
- Contagem de bactérias heterotróficas, por semeadura em profundidade, em Ágar R2A e incubação a 36° C por 96 horas<sup>14</sup>

### Análise de Endotoxina

- Método de *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL) por gelificação<sup>15</sup>

### Análise Físico-química

- Nitrato, por espectrofotometria na região ultravioleta-visível<sup>16</sup>
- Sulfato, por turbidimetria<sup>16</sup>
- Fluoreto, por potenciometria com eletrodo seletivo<sup>16</sup>
- Condutividade<sup>16</sup>
- pH<sup>16</sup>

### Análise de Contaminantes Inorgânicos

- Alumínio, antimônio, arsênio, bário, berílio, cádmio, cálcio, chumbo, cobre, cromo, magnésio, potássio, prata, selênio, sódio, tálio e zinco, por espectrometria de massas com plasma de argônio indutivamente acoplado<sup>17</sup>
- Mercúrio, por espectrometria de absorção atômica com gerador de vapor frio e amalgamador

### Critérios para rejeição de dados

Teores elevados de sódio, potássio, cálcio e magnésio indicam falha no procedimento de coleta, por ter sido coletada água adicionada da solução concentrada para diálise, que não constituiu o objeto da avaliação. Assim, amostras que apresentaram estas características não foram consideradas no estudo.

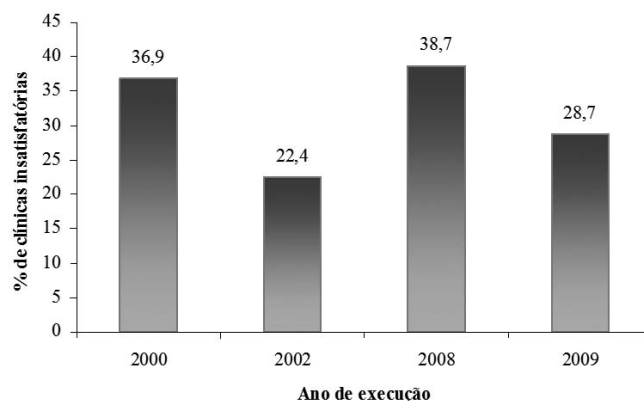
### Análise estatística

Utilizamos o teste T na comparação estatística entre os pontos de coleta.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

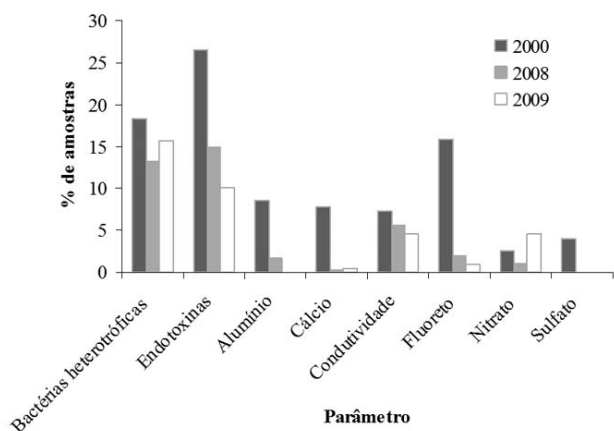
Verificamos que 13 amostras de 2008 e 05 amostras de 2009, coletadas no ponto contíguo à máquina, indicaram falha na coleta e, portanto, não foram consideradas no estudo.

O programa de monitoramento da água para diálise iniciou em 2000 com avaliação de 106 clínicas do estado e, em 2002, de 134 clínicas. Nova etapa do programa ocorreu em 2008 em 155 clínicas, que correspondiam ao total de clínicas no estado; entretanto em 2009, a avaliação não foi realizada em clínicas da capital e, portanto, o programa contemplou somente 108 clínicas. A partir dos dados obtidos em cada uma destas etapas do programa de monitoramento, verificamos a importância das ações de vigilância sanitária para garantir a adequação e manutenção dos sistemas de tratamento e distribuição que permitam obter água com a qualidade requerida para o tratamento dialítico (Figura 1).



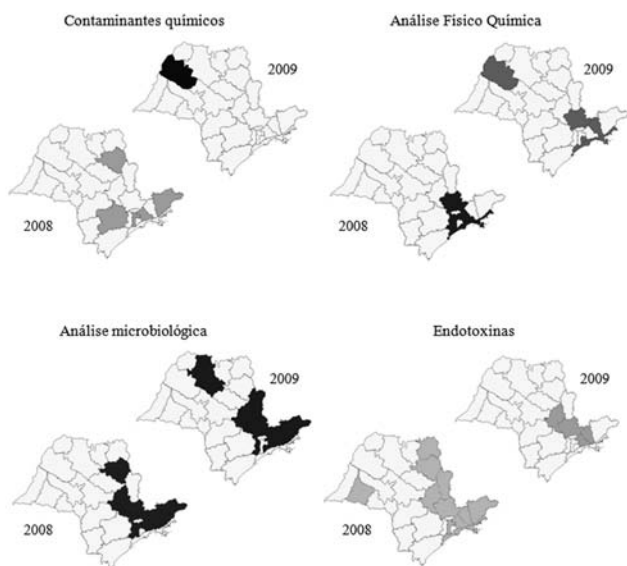
**Figura 1.** Nível de adequação das clínicas quanto à qualidade da água tratada ao longo dos programas de monitoramento

Ao considerarmos os programas de monitoramento realizados em 2000, 2008 e 2009, verificamos diminuição da porcentagem de amostras insatisfatórias, exceto para os parâmetros relativos à carga de bactérias heterotróficas e à presença de nitratos na água (Figura 2), indicando também a importância da continuidade dos programas de monitoramento.



**Figura 2.** Frequência de parâmetros insatisfatórios obtidos nos programas de monitoramento

Verificamos que as clínicas insatisfatórias estão distribuídas na mesma região do Estado e, assim, como evidenciamos redução no número de clínicas em desacordo em 2009 em relação a 2008, verificamos maior concentração das regiões em que estas clínicas estão localizadas (Figura 3). Estas informações são importantes no planejamento dos futuros programas na medida em que direciona as prioridades para estas regiões.



**Figura 3.** Distribuição das clínicas de diálise em desacordo em função da região no estado e tipo de parâmetro

A partir das informações coletadas durante e a inspeção sanitária, verificamos que 95,7% das clínicas do estado utilizam sistema de tratamento composto por osmose reversa. Apesar de sua capacidade para produzir água com alta qualidade química e microbiológica<sup>3-5,18,19</sup>, somente sua presença não é suficiente para garantir a manutenção dos níveis de qualidade da água necessários a sua utilização em diálise, principalmente quanto à contaminação microbiológica. Enquanto a presença de contaminantes químicos na água tratada está relacionada à qualidade da água de alimentação e à eficiência do sistema de tratamento<sup>2,3,5</sup>, a contaminação microbiológica está mais associada à manutenção do sistema de tratamento e distribuição da água tratada e menos à qualidade da água de alimentação<sup>2,3,5,9,19</sup>.

A presença de contaminantes químicos evidenciou que o sistema de tratamento não foi eficiente para remoção dos contaminantes, seja devido à baixa qualidade da água de alimentação, por dimensionamento inadequado do sistema de tratamento, deterioração progressiva dos componentes do sistema ou ruptura da membrana da osmose reversa.

A contaminação microbiana detectada pode ser devido à qualidade da água de alimentação, mas também pode estar relacionada a falhas nos procedimentos de manutenção e desinfecção do sistema de tratamento e distribuição, considerando que todos os seus componentes são suscetíveis à contaminação<sup>9,18</sup>, que a deterioração progressiva e rupturas da membrana de osmose reversa podem permitir a passagem de microrganismos e endotoxinas<sup>5,9</sup>, a remoção de cloro e cloraminas da água associada a áreas de baixo fluxo e estagnação na tubulação aumentam a suscetibilidade de crescimento microbiano e formação de biofilme<sup>2,3,5,9,19</sup>.

A qualidade da água tratada é de responsabilidade direta dos gestores dos Serviços de Diálise. A escolha do tipo de sistema de tratamento tem grande influência, porém a melhor escolha não é suficiente para garantir e manter o padrão de qualidade adequado, que depende também da manutenção e do monitoramento do sistema. Neste sentido, a legislação brasileira<sup>8</sup> estabelece que as clínicas de diálise devam realizar a avaliações periódicas da qualidade da água, com coletas em pontos específicos do sistema de distribuição: no ponto contíguo à máquina e na sala de reuso. Considerando a legislação vigente, os programas de monitoramento do sistema de vigilância sanitária

foram delineados para coleta de amostras nestes pontos. Entretanto, verificamos que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os pontos de coleta (Figura 4) e concluímos que, para fins de programas de monitoramento em vigilância sanitária, a coleta em um único ponto é suficiente para a avaliação. Além disso, considerando a possibilidade de falhas na coleta no ponto contíguo à máquina, concluímos que o melhor é a utilização do ponto no reuso.

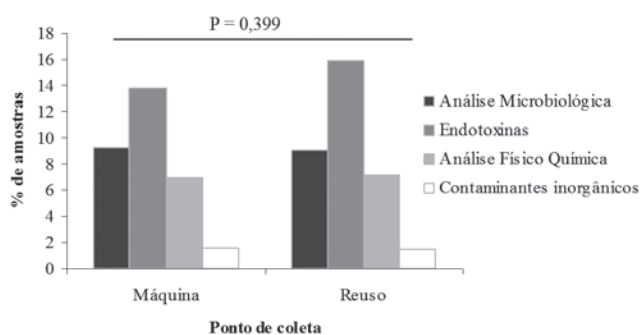


Figura 4. Influência do ponto de coleta sobre os resultados

## CONCLUSÃO

Programas de monitoramento são importantes instrumentos de ação sanitária para garantir a implementação de rotinas de manutenção nos sistemas de tratamento e distribuição da água tratada para diálise visando à prevenção dos riscos a que se expõem os pacientes renais crônicos.

A efetividade dos programas de monitoramento foi demonstrada pelo aumento do nível de qualidade da água tratada para diálise.

A garantia da qualidade da água para diálise não depende somente da escolha do sistema de tratamento, mas depende também de manutenção eficiente de seus componentes.

Em programas de monitoramento delineados pelo Sistema de Vigilância Sanitária, a coleta em um único ponto do sistema de distribuição é suficiente para avaliar a qualidade da água tratada para diálise.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Maria Isabel S. J. Marcatto e demais técnicos do Grupo Técnico Clínico Terapêutico da Divisão de Serviços de Saúde do Centro de Vigilância Sanitária do Estado de São Paulo que participaram conosco do delineamento dos Programas de Monitoramento; às equipes técnicas dos Grupos de Vigilância Sanitária do Estado e dos municípios, pela coleta de amostras; e aos técnicos dos Laboratórios Regionais do Instituto Adolfo Lutz.

## REFERÊNCIAS

1. Censo de Diálise SBN 2008 [Internet]. Available from: <http://www.sbn.org.br/Censo/2008/censoSBN2008.pdf>
2. Hoenick NA, Ronco C, Levin R. The importance of water quality and haemodialysis fluid composition. *Blood Purif*. 2006; 24: 11-8.
3. Vorbeck-Meister I, Sommer R, Vorbeck F, Hörl WH. Quality of water used for haemodialysis: bacteriological and chemical parameters. *Nephrol Dial Transplant*. 1999; 14: 666-75.
4. Ahmad S. Essentials of water treatment in hemodialysis. *Hemodial Int*. 2005; 9: 127-34.
5. Pontoriero G, Pozzoni P, Andrulli S, Locatelli F. The quality of dialysis water. *Nephrol Dial Transplant*. 2003; 18(suppl 7): vii21-5.
6. Ouseph R, Ward RA. Water treatment for hemodialysis: ensuring patient safety. *Semin Dial*. 2002; 15: 50-2.
7. Brasil. Portaria nº 2042, de 11 out. 1996 do Ministério da Saúde. Estabelece o Regulamento Técnico para o Funcionamento dos Serviços de Terapia Renal Substitutiva e as Normas para Cadastramento desses Estabelecimentos Junto ao Sistema Único de Saúde. *Diário Oficial [da] União, Brasília, DF*, 14 out. 1996.
8. Brasil. Resolução RDC nº 154, de 15 jun. 2004. Estabelece o Regulamento Técnico para Funcionamento dos Serviços de Diálise. *Diário Oficial [da] União, Brasília, DF*, 17 jun 2004.
9. Roth VR, Jarvis WR. Outbreaks of infection and or pyrogenic reactions in dialysis patients. *Semin Dial*. 2000; 13(2): 92-6.
10. Azevedo SMFO, Carmichael WW, Jochimsen EM, Rinehart KL, Lau S, Shaw GR et al. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru - Brazil. *Toxicol*. 2002; 181-182: 441-6.
11. Beck-Sague CM, Jarvis WR, Bland LA, Arduino MA, Aguero SM, Verosic G. Outbreak of gram-negative bacteremia and pyrogenic reactions in a hemodialysis center. *Am J Nephrol*. 1990; 10: 397-403.
12. Welbel, SF, Schoendorf K, Bland LA et al. An outbreak of gram-negative bloodstream infections in chronic hemodialysis patients. *Am J Nephrol*. 1995; 15: 1-4.
13. Rudnick JR, Arduino MJ, Bland LA et al. An outbreak of pyrogenic reactions in chronic hemodialysis patients associated with hemodialyzer reuse. *Artif Organs*. 1995; 19: 289-94.

14. American Public Health Association (US). Standard methods for the examination of water and wastewater. 20<sup>a</sup> ed. Baltimore: United Book Press Inc; 1998.
15. United States Pharmacopeia. (US). Farmacopeia de los Estados Unidos de América. 31<sup>a</sup> ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention; 2008.
16. Instituto Adolfo Lutz. Águas. In: Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos. 4<sup>a</sup> ed. São Paulo (SP): Instituto Adolfo Lutz; 2008. Available from: <http://www.ial.sp.gov.br>
17. U.S. Environmental Protection Agency (US). Determination of trace elements in waters and wastes by inductively coupled plasma - mass spectrometry. Method 200,8, Revision 5.4. Cincinnati, Ohio: EPA; 1994.
18. Silva AMM, Martins CTB, Ferraboli R, Jorgetti V, Romão Jr JE. Revisão/Atualização em diálise: Água para hemodiálise. *J Bras Nefrol*. 1996; 18(2): 180-8.
19. Smeets E, Kooman J, van der Sande F, Stobberingh E, Frederik P, Claessens P et al. Prevention of biofilm formation in dialysis water treatment systems. *Kidney Int*. 2003; 63: 1574-6.

# Monitoramento da qualidade do leite humano ordenhado e distribuído em banco de leite de referência

## Monitoring the quality of human milk distributed by a reference milk bank

RIALA6/1250

Patrícia Pinheiro Rafael de SOUSA<sup>1</sup>, João Andrade SILVA<sup>2\*</sup>

<sup>2\*</sup>Endereço para correspondência: Departamento de Nutrição da Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária, s/n. Castelo Branco. CEP. 58059-900. João Pessoa, PB, Brasil. Fone (083) 3216 7998. e-mail: andradebr@yahoo.com.br

<sup>1</sup>Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil. e-mail: patriciapr@gmail.com

Recebido: 27.08.2009 – Aceito para publicação: 14.12.2009

### RESUMO

O leite humano (LH) coletado, processado e distribuído em Bancos de Leite humano (BLH), deve configurar-se como uma alternativa inócua e nutricionalmente satisfatória aos recém-nascidos que o utilizem. Com o propósito de monitorar a qualidade do LH em um BLH de referência, foram avaliadas 20 amostras de LH quanto aos parâmetros microbiológicos, físico-químicos, bem como as condições higiênico-sanitárias do BLH em relação à qualidade do ar ambiental, recipientes de armazenamento do leite e mãos dos manipuladores. As amostras de leite analisadas apresentaram quantidade de contaminantes deterioradores, que foi reduzida com a pasteurização, contudo os coliformes não foram eliminados. Não foi detectada a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva. Na composição centesimal, foram verificadas grandes perdas do valor energético total, 23,28% nas amostras de leite congelado (LC) e 23,86% das amostras após a pasteurização (LAP), em decorrência da grande perda lipídica. Quanto aos parâmetros de pH, acidez em graus Dornic e umidade, verificaram-se alterações significativas ( $p < 0,05$ ) entre as amostras de leites antes e depois do congelamento e LAP. Pode-se inferir que o monitoramento e os processos de conservação melhoraram a qualidade microbiológica do leite, todavia os processos de pasteurização e de congelamento influenciaram negativamente na composição físico-química e no valor nutricional.

**Palavras-chave.** leite humano, crescimento microbiano, avaliação físico-química.

### ABSTRACT

Human milk is the best nourishment for newborns and babies, and when, for any reason, there is no possibility to get milk from their own mother or by direct breast suction, the human milk-bank is an innocuous alternative. Thereby, after being milked, the processed sample is distributed by human-milk banks, and the product should be harmless and high quality. The present study aims at monitoring the quality of the human milk available at a reference human-milk bank. Twenty human-milk samples were analyzed on microbiological and physical-chemical parameters; and the hygienic-sanitary conditions of the milk bank were assessed by monitoring the quality of environmental air, product storage containers and the hands of milk handlers. The pasteurization reduced the deteriorating contaminants, although neither aerobic mesophilic bacteria nor coliforms were eliminated. The coagulase-positive *Staphylococcus* was not isolated. Under physical agent treatments, the milk samples showed a change on centesimal composition. Thus, significant losses of the total energy values were detected in 23.28% of frozen milk samples, and in 23.86% of pasteurized ones, deriving from lipid contents inactivation. The monitoring of variables and the suitable preservation processes have improved the microbiology quality of milk samples, nonetheless, pasteurization and freezing procedures negatively interfered in the physical-chemical composition and nutritional value.

**Key words.** human milk, microbial growth, physical-chemical evaluation.

## INTRODUÇÃO

Por definição, o leite é um produto secretado pelas glândulas mamárias das fêmeas logo depois do parto. É um alimento indispensável aos mamíferos, nos primeiros meses de vida, enquanto não podem digerir e assimilar totalmente outras substâncias necessárias a sua subsistência<sup>1</sup>.

O leite humano, por sua vez, é um fluido aquoso, cujas características lhe conferem a propriedade de particionar muito bem substâncias e moléculas, tanto polares e hidrossolúveis, como as lipossolúveis<sup>2</sup>, considerado o alimento mais adequado às necessidades da criança, serve como referência para estabelecer os requerimentos nutricionais nessa faixa etária<sup>3</sup>, possui características que lhe atribuem a função de um suplemento de fatores de proteção para o lactente, além de restringir e/ou inibir o crescimento de bactérias patogênicas<sup>4</sup>.

Nas situações em que a mãe apresenta dificuldades para amamentar o filho, o leite coletado e processado em Bancos de Leite Humano deve constituir-se como uma alternativa segura que garanta o desenvolvimento da criança<sup>5</sup>. Em 2000, o Brasil tinha a maior rede de Bancos de Leite Humano do mundo: já existiam 151 unidades, distribuídas em 22 estados, que beneficiavam mais de 80 mil crianças prematuras e de baixo peso<sup>6</sup>.

O Leite Humano Ordenhado é o produto manipulado em Bancos de Leite Humano, onde são selecionados como receptores os lactentes incluídos nas categorias: prematuros e recém-nascidos de baixo peso que não sugam, recém-nascidos infectados, especialmente com enteroinfecção, portadores de deficiências imunológicas, diarreia protraída, alergia a proteínas heterólogas e casos especiais, nos quais a mãe encontra-se impossibilitada de amamentar<sup>6,7</sup>. Obrigatoriamente, esse leite deve estar adequado aos quesitos de inocuidade e valor nutritivo, suficientes para garantir o desenvolvimento sadio e pleno da criança<sup>5</sup>.

Nos Bancos de Leite Humano, a qualidade dos produtos processados, estocados e distribuídos deve ser parte de um sistema integrado que permeie todas as etapas, sem se restringir exclusivamente a análises laboratoriais. Pode ter caráter preventivo ou retrospectivo. No aspecto operacional, o controle preventivo é o mais importante, uma vez que a qualidade do produto a ser oferecido para consumo depende desse controle. O controle retrospectivo

tem como objetivo identificar a origem de problemas relacionados à qualidade do produto, quando não há mais a possibilidade de controle<sup>8</sup>.

Todo leite humano recebido pelo Banco de leite deve ser submetido a procedimentos iniciais de seleção e classificação, sendo etapas da seleção a verificação da embalagem, presença de sujidades, cor, *off-flavor* e Acidez Dornic. A classificação compreende a parâmetros como o período de lactação, verificação da Acidez Dornic e conteúdo energético por meio do Crematócrito<sup>9</sup>.

Os produtos que não preencherem as especificações determinadas quanto aos aspectos sensoriais (ausência de sujidades, cor e *off-flavor* característicos), físico-químicos (acidez Dornic entre 1 e 8°D e crematócrito) e microbiológicos (ausência de coliforme a 35°C), deverão ser descartados. Produtos que preenchem todas as especificações serão pasteurizados e categorizados de acordo com seu valor energético para em seguida serem encaminhados a administração conforme necessidades dos recém-nascidos<sup>10</sup>.

A inocuidade e a qualidade dos alimentos são o conjunto das características individuais do produto, que apresentam grande importância na determinação da aceitabilidade do alimento pelo consumidor, avaliado segundo parâmetros físico-químicos, higiênico-sanitários, sensoriais e legais<sup>11</sup>. O objetivo deste trabalho foi monitorar os parâmetros físico-químicos e higiênicos sanitários do leite humano ordenhado e distribuído em um banco de leite de referência, como forma de garantir a inocuidade deste alimento e detectar possíveis falhas nesses procedimentos.

## MATERIAL E MÉTODOS

O banco de leite humano configura-se como um serviço especializado vinculado a um hospital de atenção materna e/ou infantil, sendo responsável por ações de promoção, proteção e apoio ao aleitamento materno, além de executar atividades de coleta do leite materno, seleção, classificação, processamento, controle de qualidade e distribuição, sendo proibida a comercialização dos produtos por ele distribuídos<sup>10</sup>, com base nesta definição pontuamos o local de coleta como banco de leite de referência por cumprir com todas as exigências determinadas pela ANVISA<sup>9</sup>.

Para a realização deste trabalho, foram coletadas 20 amostras (200 mL) independentes, totalizando um volume de 4 litros de leite humano, 10 amostras

do ar ambiental, 10 dos recipientes utilizados para o armazenamento do leite e 10 das mãos dos manipuladores, provenientes de um banco de leite humano de referência, situado no município de João Pessoa – PB, no período de novembro de 2004 a setembro de 2005. A coleta foi realizada, seguindo procedimentos recomendados pela ICMSF<sup>12</sup> e as amostras, transportadas assepticamente sob refrigeração para os laboratórios de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos (DN/CCS/UFPB), onde foram realizadas as análises.

#### **Análises microbiológicas**

Foram realizadas em duplicata para amostras de leite humano antes do congelamento, após o congelamento, e após a pasteurização, foram realizadas as seguintes análises.

▪ **Contagem de bactérias aeróbias mesófilas:** Foi feita empregando-se a técnica “Pour Plate” em placas de Petri, usando Plate Count Agar e incubação a 37°C/48h<sup>12</sup>.

▪ **Contagem de bolores e leveduras:** Foi realizada em Potato Dextrose Agar acidificado com ácido tartárico a 10% (pH=3,5), seguida de incubação a 25°C/5 dias<sup>13</sup>.

▪ **Pesquisa do Número Mais Provável de Coliformes Totais e Fecais:** Foi realizada pela técnica de tubos múltiplos, usando-se Lauryl-sulfato triptose e incubação a 35°C/48h. Os tubos gás-positivos foram repicados para tubos contendo caldo bile verde brilhante, seguidos de incubação a 35°C/48h, para verificar a presença de coliformes totais e para tubos contendo caldo *Escherichia coli* (EC), incubados a 45°C/24h, em banho-maria, para verificar a presença de coliformes fecais<sup>12,13</sup>.

▪ **Contagem de *Staphylococcus aureus* coagulase positiva:** Foi realizada mediante a semeadura de 0.1 ml das diluições em Ágar Baird Parker, adicionado de telurito de potássio e emulsão de gema de ovo, seguido de incubação a 35°C ± 0,2/48h, sendo feita à confirmação com a prova da coagulase e catalase<sup>14</sup>. Para as amostras de ar ambiental, recipientes de armazenamento do leite, e mãos dos manipuladores foram realizadas em duplicata as análises de *Staphylococcus aureus* coagulase positiva.

#### **Análises Físico-Químicas**

As análises físico-química feitas em triplicata para as amostras de leite antes do congelamento, após o congelamento e após a pasteurização foram:

▪ **Determinação do Teor de Proteínas:** O teor de Nitrogênio Total da amostra foi determinado pelo método de Kjeldahl, utilizando-se o fator de conversão 6,25<sup>15</sup>.

▪ **Determinação do Teor de Lipídios:** Determinado pelo método de Gerber, que se baseia na quebra da emulsão do leite pela adição de soluções específicas, com a posterior centrifugação<sup>15</sup>.

▪ **Determinação do Teor de Carboidratos Totais:** Utilizando-se dos índices obtidos pela análise da umidade, RMF, proteínas e lipídios, foi calculado o teor de carboidratos totais pela diferença<sup>15</sup>.

▪ **Determinação do Teor de Minerais:** Foi determinado pelo método gravimétrico após evaporação em banho-maria, carbonização e incineração da matéria orgânica em forno mufla a 500°C<sup>15</sup>.

▪ **Valor Energético Total:** Foi calculado, segundo Instituto Adolfo Lutz<sup>15</sup>, pela soma e multiplicação dos macroelementos, pela quantidade de calorias fornecidas, por cada um.

▪ **Determinação da Densidade:** Determinada com o auxílio de um termolactodensímetro de Quevene, que afere a temperatura e a densidade do leite<sup>15</sup>.

▪ **Determinação Eletrométrica do pH:** Determinada diretamente com o auxílio do aparelho medidor de pH<sup>15</sup>.

▪ **Determinação da acidez em graus Dornic:** Determinada por processo de titulação que estabelece uma correlação entre o volume gasto de NaOH e os graus Dornic<sup>15</sup>.

▪ **Determinação da Umidade:** Determinada pelo método direto que se fundamenta na secagem do material em estufa estabilizada a 105°C<sup>15</sup>. Não sendo utilizado um N igual a 20 para todas as análises físico-químicas.

#### **Análise Estatística**

Os dados foram agrupados em: leite antes do congelamento, após o congelamento e após a pasteurização. Após a verificação da normalidade



(Komogorov-Smirnov), foi aplicado a ANOVA, tendo como nível de significância 5%, sendo para esta última, o teste de Tukey como prova final de comparação entre os resultados. Para as análises microbiológicas, os dados foram transformados em escala logarítmica (LogUFC/ml ou placa), e foram utilizados os procedimentos da estatística descritiva por meio de médias, desvio padrão e Teste t de Student, com a utilização do *software* SPSS for Windows, versão 14.0<sup>16</sup>.

## RESULTADOS

As análises microbiológicas realizadas foram a Contagem padrão em placas de bactérias aeróbias mesófilas (CPP) e a contagem padrão de bolores e leveduras (CPBL), sendo o leite avaliado após o congelamento e após a pasteurização. Os resultados obtidos para esta análise estão expostos na Tabela 1, sendo observado pela realização do teste t que não houve diferenças significativas para as variáveis analisadas a saber, CPP ( $p > 0,05$ ) e CPBL ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 1.** Resultados das Análises Microbiológicas do Leite Humano, após o congelamento e após a pasteurização

Leite Humano	Contagem Padrão de Bactérias Aeróbias Mesófilas (CPP) Log UFC/mL		Contagem Padrão de Bolores e Leveduras (CPBL) Log UFC/mL	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Após o congelamento	2,20	1,75	2,23	2,16
Após a pasteurização	1,46	0,21	1,94	2,01

Em apenas duas amostras de leite, após o congelamento e uma de leite após a pasteurização, detectou-se a presença de coliformes a 35°C, sendo encontrada também a presença de coliformes a 45°C em uma amostra obtida após o congelamento. Depois da pasteurização, não se detectou a presença de coliformes a 45°C.

**Tabela 2.** Teor de Carboidratos, Proteínas e Minerais no leite Humano, antes do congelamento, após o congelamento e após a pasteurização

Leite Humano	Carboidratos (%)	Proteínas (%)	Minerais (%)
Antes do congelamento	8,16 ± 0,68	0,93 ± 0,32	0,15 ± 0,06
Após o congelamento	7,28 ± 1,87	1,87 ± 1,40	0,15 ± 0,04
Após a pasteurização	6,85 ± 2,87	1,98 ± 1,18	0,14 ± 0,03

Valores médios e desvio padrão dos resultados das análises ( $p > 0,05$ )

Não foi observada a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva no leite, no ambiente, nos recipientes nem nas mãos dos manipuladores avaliados.

Na Tabela 2, estão expostos os resultados das análises de teor de carboidratos ( $p > 0,05$ ), proteína ( $p > 0,05$ ) e minerais ( $p > 0,05$ ), não havendo diferenças significativas entre os valores médios.

Pelo teste da ANOVA, pode ser verificado que, para a variável da composição centesimal designada como teor de lipídios ( $p < 0,05$ ) e valor energético total ( $p < 0,05$ ), foi encontrada uma diferença significativa entre os valores médios (Tabela 3).

**Tabela 3.** Teor lipídico e valor energético total do leite humano, antes do congelamento, após o congelamento e após a pasteurização

Leite Humano	Teor de lipídios totais (%)	Valor energético total - VET (Calorias)
Antes do congelamento	4,07 ± 0,30	73,00 ± 2,68
Após o congelamento	2,51 ± 0,88	56,19 ± 7,59
Após a pasteurização	1,97 ± 0,33	55,58 ± 3,62

Na Tabela 4, pode ser verificado o resultado do teste de Tukey realizado com os valores das análises do teor de lipídios e o valor energético total, sendo verificada uma diferença externamente significativa ( $p < 0,001$ ) entre o leite antes do congelamento e o leite após a pasteurização, com um percentual de 23,28% de perda calórica após o congelamento e uma perda total de 23,86% após a pasteurização.

**Tabela 4.** Teste de Tukey para teor lipídico e valor energético total do leite humano, antes do congelamento, após o congelamento e após a pasteurização

Leite Humano	Antes do congelamento	Após o congelamento	Após a pasteurização
Antes do congelamento	**	***	—
Após o congelamento	—	ns	**
Após a pasteurização	ns	—	***

ns – Não significativo estatisticamente  $p > 0,05$  / \* -  $p < 0,05$  / \*\*  $p < 0,01$  / \*\*\*  $p < 0,001$

Dos parâmetros físico-químicos analisados para avaliar a qualidade, a densidade ( $p > 0,05$ ) não apresentou resultados significativos, no entanto, nas análises de pH ( $p < 0,05$ ), acidez dornic ( $p < 0,05$ ) e teor de umidade ( $p < 0,05$ ), quando submetidos à análise pela ANOVA, demonstraram resultados significativos entre os valores médios (Tabela 5).

**Tabela 5.** pH, acidez titulável e teor de umidade do leite humano antes do congelamento, após o congelamento e após a pasteurização

Leite Humano	pH	Acidez titulável (Graus Dornic)	Teor de umidade (%)
Antes do congelamento	6,97 ± 0,39	2,83 ± 2,36	86,70 ± 0,58
Após o congelamento	6,26 ± 0,17	7,91 ± 3,93	89,00 ± 1,21
Após a pasteurização	6,86 ± 0,24	3,61 ± 1,69	88,67 ± 0,74

## DISCUSSÃO

A resolução RDC nº 12 de janeiro de 2001, do Ministério da Saúde<sup>17</sup>, estabelece, pela primeira vez no Brasil, critérios para o controle microbiológico do leite humano. Nessa resolução, a quantidade de microrganismos aeróbios mesófilos viáveis permitida é de até 2 LogUFC/mL, ausência tanto de coliformes a 35°C como de *Staphylococcus coagulase positiva* em 1 mL de leite após a pasteurização.

Nesta pesquisa, a média das contagens de bactérias aeróbias mesófilas (CPP) no leite humano após o congelamento foi de 2,20 LogUFC/mL e no leite após a pasteurização, 1,46 LogUFC/ml, estando, portanto, dentro dos padrões preconizados pela ANVISA<sup>17</sup> para o leite humano, indicando que as técnicas de ordenha e processamento estão sendo utilizadas corretamente.

A presença de bolores e leveduras em alimentos pode indicar contaminação proveniente do meio ambiente ou resultado de manipulação em condições higiênico-sanitárias insatisfatórias<sup>11</sup>. Foram encontrados valores médios para a CPBL de 2,23 LogUFC/mL no leite após o congelamento e 1,94 LogUFC/mL no leite após a pasteurização. Mesmo não sendo preocupantes, esses resultados podem ser indicativos de possíveis falhas no manuseio do produto.

O leite Humano obtido de doadoras saudáveis é livre de microrganismos patogênicos. Quando presentes podem ser provenientes de fontes externas de contaminação. Entre os contaminantes externos, os coliformes ocupam lugar de destaque devido ao seu próprio significado e elevada probabilidade de sua ocorrência quando o leite não é obtido em condições higiênico-sanitárias satisfatórias<sup>18</sup>.

Do total de 20 amostras analisadas, apenas quatro (20%) encontravam-se fora dos padrões estabelecidos pela ANVISA<sup>17</sup>. Na pesquisa de coliformes a 35°C, duas amostras de leite após o congelamento e uma após a pasteurização, numa delas, do leite após congelamento, foi detectada a presença de coliformes a 45°C. Após a pasteurização em apenas uma amostra, foi detectada a presença de coliformes a 35°C, estando, portanto, fora dos padrões estabelecidos<sup>17</sup>. Destaca-se a importância da determinação de bactérias do grupo coliforme no controle da qualidade microbiológica do leite humano, uma vez que a sua presença pode indicar contaminação, mesmo que indireta, de origem fecal, sem implicar necessariamente a identificação de *Escherichia coli*<sup>19</sup>.

Segundo a American Public Health Association<sup>20</sup>, os padrões microbiológicos para recipientes de leite e água são de 1UFC/mL da capacidade do recipiente, neste trabalho, foram encontrados resultados médios menores que 1UFC/mL de capacidade dos recipientes analisados, atestando, portanto, a higiene sanitária desses recipientes.

Nas mãos dos manipuladores, não foi detectada a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva. Estudos de rastreamento epidemiológico identificam o manipulador de alimentos como ponto chave no processo de disseminação dos *Staphylococcus*, sendo de extrema importância o controle dos portadores assintomáticos<sup>21</sup>.

A presença de números elevados de *S. aureus* é uma indicação de perigo potencial à saúde pública, devido à toxicidade da enterotoxina estafilocócica, bem como ao questionamento da sanificação, especialmente quando envolve a manipulação de alimentos<sup>22</sup>.

Dependendo das condições, quando o descongelamento é realizado de forma muito lenta ou quando o alimento é deixado à temperatura ambiente, os microrganismos têm a possibilidade de multiplicar-se e desenvolver atividades como a produção de toxinas. As espécies de microrganismos que se multiplicam dependem da temperatura a que se realizou o descongelamento e do tempo em que o alimento, uma vez descongelado, ficou exposto à temperatura ambiente<sup>23</sup>.

Fraizer e Westhoff<sup>23</sup> consideram que o congelamento pode diminuir o número de microrganismos viáveis existentes no alimento devido aos efeitos letais e subletais que exerce sobre eles, porém não é considerado como um processo de esterilização de alimentos, o que indica a necessidade da pasteurização, que é definida como o processo capaz de destruir no leite, pelo emprego do calor, a quase totalidade da microbiota deterioradora e a totalidade de sua microbiota patogênica, procurando alterar o mínimo possível a sua estrutura física e o seu equilíbrio químico<sup>24</sup>.

Trombino, Hernandez e Rios<sup>25</sup>, em um trabalho com leite humano, encontraram em 94% das amostras de leite analisadas valores menores que 1LogUFC/mL de bactérias aeróbias mesófilas e *Staphylococcus aureus* e menos de 1 UFC/mL para coliformes a 35°C, comprovando a eficiência da pasteurização para melhorar a qualidade e a obtenção de alimentos seguros.

Alencar e Araújo<sup>26</sup>, analisando amostras de leite humano coletadas em dois bancos de leite do Município do Rio de Janeiro, demonstraram que a pasteurização foi eficaz em 98,69% das amostras. Em amostras de leite

pasteurizado analisadas por Kamiya e Ramos<sup>27</sup>, não foi detectada a presença de coliformes a 35°C.

Segundo Wyk<sup>28</sup>, a possível desvantagem ocorrida na pasteurização do leite ofertado a crianças prematuras é o ritmo mais lento de ganho de peso, que pode ser atribuído a pasteurização, que pode levar a destruição da lipase do leite, que é sensível ao calor. Outros estudos mostram que os resultados do tratamento térmico por meio da pasteurização, podem levar a uma redução ou eliminação de propriedades do leite que são fundamentais para o lactente<sup>29,30,31</sup>. Por outro lado tem sido demonstrado que a capacidade bactericida do leite humano após a pasteurização se prolonga por 72 horas ou mais<sup>32</sup>.

Segundo Calil e Falcão<sup>33</sup>, a necessidade de proteínas para o recém-nascido a termo é estimada em cerca de 2,0 a 2,5g/kg/dia, diminuindo gradualmente até um valor de 1,3g/kg/dia. O leite humano maduro fornece, em média, 1,2g de proteína/100mL de leite. Os resultados encontrados para o teor de proteína do leite, após o congelamento, e o leite, após a pasteurização, foram 1,87 e 1,98% respectivamente, atendendo às necessidades do recém-nascido.

O perfil de aminoácidos do leite humano é bastante adequado às características metabólicas do recém-nascido, especialmente o prematuro, devido à imaturidade de alguns sistemas enzimáticos, que se traduzem pela limitada capacidade para a utilização e conversão de determinados aminoácidos<sup>33</sup>.

Dentre os componentes do leite, temos a lactose como carboidrato de maior concentração que fornece de 45 a 50% do conteúdo energético total do leite humano. Elevadas concentrações de lactose são consideradas como de grande importância para o RN, visto que seu produto metabólico, a galactose, entra na constituição dos galactolipídios, integrantes do sistema nervoso central<sup>33</sup>. O teor de carboidratos das amostras de leite analisadas não apresentou diferença significativa, mas foi inferior à necessidade do recém-nascido.

Os lipídios do leite humano são facilmente digeríveis e absorvíveis em decorrência da ação combinada de vários fatores, tais como a organização dos glóbulos de gordura, a composição de ácidos graxos e comprimento de suas cadeias<sup>33</sup>.

Lopes, Amâncio e Juliano<sup>34</sup> observaram um percentual de 20,42% de perda de lipídio entre o leite humano recém ordenhado e o leite humano após o congelamento, com a utilização do método de Crematocrito. Neste trabalho a quantificação de lipídios

foi realizada pelo método de Geber<sup>12</sup>, que também detectou uma diferença significativa no teor lipídico de 23,3% entre o leite antes do congelamento e o leite após o congelamento, sendo a perda global após a pasteurização de 23,9% do valor energético total.

As perdas ocorridas podem ser consequência da quebra da membrana do glóbulo de gordura, sob ação da lipase do leite humano, reduzindo os teores de lipídios. Outra possibilidade se baseia no fato do congelamento e posterior descongelamento influírem na estrutura física das proteínas do leite, desestabilizando a emulsão. Com isso, há a formação de uma camada de gordura que pode aderir à parede do recipiente ou formar uma camada sobrenadante, dificultando a homogeneização da amostra e diminuindo os valores da gordura analisados<sup>34</sup>.

Vieira, Moreira e Rocha<sup>35</sup> avaliaram 462 amostras de leite humano, encontrando um percentual de gordura e um conteúdo energético significativamente menor no leite humano processado em relação ao leite humano cru, sugerindo que o processamento pode afetar a qualidade do leite humano oferecido aos recém nascidos.

A densidade é uma constante física importante na verificação da qualidade do leite, sendo relacionada com a riqueza do leite em sólidos totais<sup>36</sup>. No presente estudo, não foram encontradas diferenças significativas entre os valores da densidade, podendo ser justificado pelo fato de ser um alimento com baixo percentual de matéria seca total, que compreende a todos os elementos do leite, exceto a água, com um percentual médio de 12,5%<sup>1</sup>.

O pH do leite humano ordenhado encontra-se entre 5,47 e 7,84, variando diretamente com as semanas de lactação e inversamente com o teor de lipídios, sendo coerente afirmar que quanto maior a concentração de gordura total maior a possibilidade do leite desenvolver acidez elevada<sup>37</sup>. Os resultados encontrados na determinação do pH do leite apresentaram diferenças significativas entre as médias, como ilustrado na Tabela 5.

A acidez titulável do leite humano imediatamente após a ordenha encontra-se entre 3° e 6°D<sup>29</sup>. A acidez determinada neste trabalho foi de 2,83°D no leite antes do congelamento e 7,91° após o congelamento. Segundo Cavalcante et al<sup>38</sup>, a temperatura atua como modificador da acidez titulável, podendo variar de 8 a 13°D.

Quantitativamente, a água é o elemento mais importante na composição química do leite, representando, aproximadamente, 9/10 do total<sup>16</sup>. Na determinação da umidade, foram verificadas diferenças significativas ( $p < 0,01$ ) entre as médias das amostras de

leite antes e após o congelamento e entre o leite após a pasteurização e antes do congelamento ( $p < 0,05$ ), sendo o teor de umidade menor no leite antes do congelamento, o que indica possíveis perdas de solutos durante o processamento e manipulação do leite.

O leite humano processado em bancos pode ter a composição de macro e micronutrientes inadequados para o recém-nascido de baixo peso, seja porque as necessidades desses nutrientes são maiores nesse grupo, o que requer uma complementação, seja em função das perdas associadas à coleta, armazenamento e procedimentos na sua administração<sup>5</sup>.

## CONCLUSÃO

O monitoramento de todas as variáveis envolvidas, ordenha, congelamento e pasteurização do leite humano e distribuição possibilitaram a identificação de influências positivas e negativas a qualidade do leite humano. A pasteurização foi importante para a manutenção da qualidade microbiológica do leite, no entanto, se mostrou vulnerável as contaminações do ar ambiente, recipiente de armazenamento e mão de manipuladores.

Por outro lado, foi detectada uma redução significativa no teor de lipídios possivelmente provocada pelos processos de congelamento e pasteurização o que indica a necessidade desenvolver novas tecnologias capazes de preservar o leite, sem afetar significativamente o seu valor nutritivo e suas propriedades físico-químicas.

## REFERÊNCIAS

1. Behmer MLA. Tecnologia do Leite. 15a ed. São Paulo: Nobel; 1987.
2. Sim MR, MC'Neil JJ. Monitoring Chemical exposure using breast milk. A methodological review. *Am J Epidemiol*. 1992; 136(1):1-11.
3. Organização Mundial de Saúde. Alimentação Infantil: Bases Fisiológicas. James Akre Editor. São Paulo; 1994.
4. Stevenson DK, Yang C, Kerner Jr. JA, Yeager AS. Intestinal flora in the second week of life in hospitalized preterm infants fed stored frozen breast milk or a proprietary formula. *Clin Pediatr*. 1985; 24(3):338-41.
5. Popper IOP. Produção de leite humano ordenhado "zero defeitos": uma proposta. *Hig Alim*. 2001; 15(81):44-9.
6. Brasil. Ministério da Saúde. Informe Saúde ano 4. 2000.
7. Góes HCA, Torres AG, Donangelo CM, Trugo NMF. Nutrient composition of banked milk in Brazil and influence of processing on zinc distribution in milk factors. *Nutrition*. 2002; 18:590-4.

8. Rêgo JD. *Aleitamento Materno*. São Paulo: Atheneu, 2000.
9. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Banco de Leite Humano: funcionamento, prevenção e controle de riscos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, DF: ANVISA, 2008; 115-49.
10. Brasil. Resolução RDC nº 171, de 4 de setembro de 2006 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o Funcionamento de Bancos de Leite Humano. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder executivo, Brasília, DF, 5 set. 2006.
11. Chaves JBP. Controle de qualidade para indústria de alimentos (princípios gerais) Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 1980.
12. International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). Ecologia microbiana de los alimentos 1: Factores que afectan a la supervivencia de los microorganismos em los alimentos. Zaragoza: Acribia; 1982.
13. Vanderzante C, Spillitstoesser DF. Compendium of methods for the Microbiological examination of Foods. 3ed. Washington: Am Public Health Assoc; 1992.
14. Silva N, Junqueira VAC, Silveira NFA. Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos. São Paulo: Varela; 1997.
15. Instituto Adolfo Lutz. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 2ª ed. São Paulo; 1985.
16. SAS INSTITUTE. User's Guide to Statistics. [computer program] Versão 6.12. Cary, USA: North Carolina State University; 1996.
17. Ministério da Saúde Resolução nº 12/2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. Regulamento técnico sobre Padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial [da] União. Brasília, DF, 10 de jan. de 2001.
18. Almeida JAG. Amamentação: Repensando o paradigma. Ed. Fiocruz. Rio de Janeiro; 1998.
19. Almeida JAG, Novak KFR, Almeida CHG, Serva VB. Avaliação parcial da flora microbiana do leite humano ordenhado do IMIP. *Rev Inst Mat Inf Pernambuco*. 1989; 3(1):13-6.
20. American Public Health Association (APHA). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4ed. Washington,DC; 2002.
21. Pontes MRA, Ivsaki Y, Oliveira YS. Avaliação das condições higiênicas sanitárias do leite humano pasteurizado distribuído pelo banco de leite de um hospital público do Distrito Federal. *Higiene Alimentar*. 2003; 17(107):43-9.
22. Franco, BDGM, Landgraf M. - *Microbiologia de Alimentos*. Atheneu, São Paulo; 1996.
23. Frazier WC, Westhoff DC. *Food microbiology*. 5 ed. New York: Mc Graw-Hill; 1993.
24. Veisseyre R. *Lactologia Técnica*. Zaragoza; 1972.
25. Trombino V, Hernandez M, Rios SM. Efecto de los procesos de higienización sobre la calidad microbiológica de la leche humana del Banco de Leche del Hospital Universitario de Caracas (HUC). *Inst Nacional Hig*. 2003; 34(1):10-6.
26. Alencar AP, Araújo HJ, Gonçalves MF. Avaliação microbiológica do leite materno de dois bancos de leite do município do Rio de Janeiro-RJ, Brasil. In: Congresso Latino Americano de Microbiológica e Higiene de Alimentos, Água de Lindóia. Resumos SBM, 1998; 115.
27. Kamiaya E, Ramos MIL. Avaliação microbiológica e calórica do leite humano coletado e distribuído no banco de leite humano do Hospital Universitário/NHU/UFMS. *Hig Alim*. 2003; 17(109):64-8.
28. Wyk EV. The effect of pasteurization on the composition of expressed human milk from HIV positive mothers, and its adequacy in reduction to the growth of their very low birth weight premature infants [Dissertação de mestrado]. Jonkershoek Valey, South Africa, 2008. 190pp.
29. Silvestre D, Ferrer E, Gayá J. Available lysine content in human milk: stability during manipulation prior to ingestion. *Biofactors*. 2006; 26:71-9.
30. Chen HY, Allen JC. Human milk antibacterial factors: the effect of temperature on defense systems. *Adv Exp Med Biol*. 2001; 501:341-8.
31. Silvestre D, Ruiz P, Martinez-Costa C, Plaza A, Lopez MC. Effect of pasteurization on the bactericidal capacity of human milk. *J Hum Lact*. 2008; 24(4):371-6.
32. Ogundele MO. Effect of storage on the physicochemical and antibacterial properties of human milk. *Br J Biomed Sci*. 2002; 59:205-11.
33. Calil VMLT, Falcão MC. Human milk composition: the ideal nutrition for infants. *Rev Med São Paulo*. 2003; 82(1):1-10
34. Lopes LA, Amâncio OM, Juliano Y. Influencia do congelamento na determinação de gordura total e do valor calórico total de colostro humano pelo método de crematocrito. *Rev Paul Pediatr*. 1992; 10(39): 116-9.
35. Vieira LA, Moreira MEL, Rocha AD. Análise do conteúdo energético do leite humano administrado a recém-nascido de muito baixo peso ao nascimento. *J Pediatr*. 2004; 80(6): 490-4.
36. Goursaud J. Composition et propriéts physico-chimiques. In: Luquet FM. *Lait et produits laitiers*. Paris: Tec Doc Lavoiser. 1985; 1 parte 1 cap1: 1-93p.
37. Cavalcante JLP, Telles FJS, Peixoto MMLV, Rodrigues RCB. Uso da acidez titulável no controle de qualidade do leite humano ordenhado. *Cienc Tecnol Aliment*. 2005; 25(1):103-8.
38. Bartolozzo EAFQ, Tiboni EB, Candido LMB. Leite humano processado em bancos de leite para o recém-nascido de baixo peso: análise nutricional e proposta de um novo complemento. *Rev Panam Salud Publica*. 2004;16 (3):199-205.

# Desenvolvimento de material de referência para ensaio de proficiência em microbiologia de alimentos

## Development of reference materials for proficiency tests in food microbiology

RIALA6/1251

Carla de Oliveira ROSAS<sup>1\*</sup>, Marcelo Luiz Lima BRANDÃO<sup>1</sup>, Sílvia Maria Lopes BRICIO<sup>1</sup>, Valéria de Mello MEDEIROS<sup>1</sup>, Samara Pinto Custódio BERNARDO<sup>1</sup>, Marcus Henrique Campino DE LA CRUZ<sup>2</sup>, Paola CARDARELLI-LEITE<sup>1</sup>

\*<sup>1</sup>Endereço para correspondência: Departamento de Microbiologia – Instituto Nacional de Controle Qualidade em Saúde/Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, CEP 21040-900. e-mail: carla.rosas@incqs.fiocruz.br

<sup>2</sup>Comissão de Ensaio de Proficiência - I Instituto Nacional de Controle Qualidade em Saúde/Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, CEP 21040-900

Recebido: 30.10.2009 – Aceito para publicação: 22.03.2010

### RESUMO

Ensaio de proficiência (EP) são considerados importantes ferramentas para a condução de programas de controle de qualidade, que possibilitam efetuar a avaliação da habilidade de laboratórios em obter resultados precisos. No Brasil é restrita a oferta de EP na área de microbiologia de alimentos. Além disso, os altos custos diminuem a participação regular de laboratórios nacionais nesses ensaios. O presente estudo teve como objetivo realizar a avaliação da técnica de liofilização no preparo de materiais de referência (MR) para EP destinados ao ensaio de detecção de *Salmonella* spp. em leite. Foi determinada a concentração do inóculo utilizado no preparo de dois lotes e, também, foi padronizado o procedimento de contaminação da matriz. Para monitorar a qualidade dos MR produzidos foram estabelecidos ensaios de controle, dentre eles o teste da homogeneidade e da estabilidade em longo e curto prazo. A técnica de liofilização mostrou ser adequada para a produção de MR de qualidade e aplicável para EP. Os MR apresentaram estabilidade à temperatura de estoque (-20°C) durante os três primeiros meses, porém foi observada perda de viabilidade após doze meses de armazenamento. Na estabilidade em curto prazo, os MR foram estáveis a 4°C, contudo apresentaram redução significativa no número de células quando mantidos a temperaturas de 25°C e 37°C durante sete dias. **Palavras-chave.** ensaios de proficiência, materiais de referência, microbiologia de alimentos.

### ABSTRACT

Proficiency tests are considered relevant tools of quality control programs used to monitor the laboratory performance and to assess the reliability of tests results. In Brazil, the provision of proficiency testing (PT) is restricted to food microbiology area. Furthermore, high costs reduce the regular participation of national laboratories in these tests. This study evaluated the freeze-drying technique employed for preparing reference materials (RM) to be used in the PT schemes for detecting *Salmonella* spp. in milk. The concentration of inoculums used for preparing two batches of RM was determined, and the procedures for matrix contamination were standardized. The control trials were established in order to monitor the quality of the produced RM, and among them, there are long and short-term homogeneity and stability assays. The freeze-drying technique proved to be a suitable procedure for producing RM for PT. The RM were stable for the first three months when stored at -20°C, nevertheless, viability loss could be observed after 12-month storage. The RM were stable at 4°C at short-term stability, although when the products were kept at 25°C and 37°C for seven days, a significant reduction in the number of cells could be observed.

**Key words.** proficiency testing, reference material, food microbiology.

## INTRODUÇÃO

A utilização de sistemas da qualidade em laboratórios de ensaio promove melhorias nos procedimentos empregados, desde a amostragem até a liberação dos resultados de análises<sup>1,2</sup>.

Segundo Camargo<sup>3</sup>, a NBR ISO/IEC 17025:2005<sup>4</sup> tem sido o sistema da qualidade mais reconhecido e utilizado em laboratórios de ensaios analíticos. Esta norma descreve os requisitos que os laboratórios de ensaio e de calibração devem atender para demonstrarem competência técnica e capacidade de produzir resultados tecnicamente precisos, confiáveis e rastreáveis. Dentre os requisitos apontados na Norma, para o controle da qualidade dos resultados das análises estão: o uso de métodos validados, a utilização de materiais de referência (MR) para o controle laboratorial interno e a participação periódica do laboratório em programas de ensaios de proficiência (EP) e/ou em comparações interlaboratoriais.

Ensaio de proficiência são descritos por Roberts<sup>2</sup>, como ferramentas da qualidade, que possibilitam a avaliação da habilidade de um laboratório em obter resultados precisos. A participação em EP permite a comparação do desempenho obtido, com o de outros laboratórios ao analisarem analitos idênticos, específicos para um parâmetro de ensaio<sup>5</sup>.

De acordo com Emons et al<sup>6</sup>, a definição de material de referência (MR) da NBR ISO/GUIA 30:2000<sup>7</sup> se encontra em processo de revisão, tendo sido recentemente aprovada pelo *Comitê sobre Material de Referência da Organização Internacional de Padronização – ISO REMCO*. Esses MR passam a ser definidos como “*Materiais suficientemente homogêneos e estáveis com relação a uma ou mais propriedades específicas, estabelecidas, para serem utilizados em um processo de medição*”. O documento descreve MR como um termo genérico, com propriedades que podem ser de caráter qualitativo ou quantitativo e que devem apresentar a indicação do uso para apenas uma finalidade em um sistema de medição, como calibrador ou como controle de qualidade.

O grande desafio na produção de MR para EP destinados a ensaios microbiológicos é a instabilidade natural dos microrganismos, que dificulta o desenvolvimento, a produção e o uso desses materiais<sup>1,8</sup>. Na produção do MR as células bacterianas são fortemente afetadas por fatores como variações de temperatura e estresse sofrido durante o processo de dessecação<sup>7,9</sup>.

Quando preparados para serem utilizados em EP, os MR devem ser suficientemente homogêneos e estáveis, garantindo aos laboratórios participantes de um EP o recebimento de unidades com propriedades semelhantes, próximas a um valor padrão<sup>10</sup>.

O ensaio da estabilidade tem como objetivo a verificação do grau da instabilidade de um material candidato a ser MR. Tendo em vista as variações que os MR podem sofrer antes de serem analisados, dois tipos de teste de estabilidade devem ser realizados separadamente: o teste de estabilidade em longo prazo, que verifica a estabilidade do material a uma temperatura de armazenamento e o teste de estabilidade em curto prazo, que simula as condições de transporte durante a distribuição do material. O teste em curto prazo é realizado com a exposição do material a diferentes temperaturas em diferentes intervalos de tempo<sup>11</sup>.

Para a avaliação estatística da homogeneidade e da estabilidade, as Normas NBR ISO/IEC GUIA 43-1:1999<sup>12</sup> e a ILAC G13:08/2007<sup>13</sup> recomendam a utilização dos procedimentos citados por Thompson, Ellison e Wood<sup>9</sup>, as orientações da ISO 13528:2005<sup>14</sup> e da ISO GUIDE 35:2006<sup>10</sup>.

Apesar do aumento da procura da participação em EP, a disponibilidade destes ensaios no país é escassa. A grande maioria das ofertas é dada por provedores internacionais, fazendo com que os valores cobrados para a participação sejam bastante elevados. Além disso, devem ser destacadas as exigências burocráticas feitas pelos países exportadores na liberação das amostras. A dificuldade na liberação alfandegária no Brasil constitui também outro problema, algumas vezes fazendo com que o material chegue ao laboratório de análise fora das especificações de temperatura, ou mesmo com o prazo de início de análise ultrapassado<sup>15</sup>.

O presente trabalho teve como objetivo principal a padronização da metodologia de produção e de controle de MR para EP referente ao ensaio de “*Deteção de Salmonella spp. em alimentos*”, utilizando a técnica de liofilização.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Produção do material de referência

A partir de um levantamento sobre o sorotipo e fagotipo de *Salmonella* spp. de maior prevalência no Brasil nos últimos anos, foi selecionada uma cepa de *Salmonella* Enteritidis fagotipo PT-4, isolada de

uma amostra de sobre coxa de frango congelada. Esta foi depositada na Coleção de Pesquisa de Bactérias do INCQS, com número P3440. A caracterização sorológica e a classificação do fagotipo foram realizadas pelo Laboratório de Enterobactérias do Departamento de Bacteriologia do Instituto Oswaldo Cruz da FIOCRUZ.

A cepa selecionada foi cultivada em caldo infusão cérebro coração (BHI) a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ . Após 24 horas, 3 mL da cultura foram centrifugados a 10.000 rpm por 5 minutos (Centrífuga Eppendorf, 5415D). O sedimento obtido foi ressuspensionado em 6 mL de solução salina fisiológica contendo peptona a 0,1%, obtendo-se assim a suspensão de células para o preparo do material.

A suspensão de células foi ajustada em espectrofotômetro (SHIMADZU, UV-visible, W-601), em comprimento de onda de 530 nm, até uma transmitância na faixa de 5 a 9%, com o objetivo de se atingir uma concentração aproximada de  $5 \text{ a } 9 \times 10^8$  células/mL.

A partir do conhecimento aproximado da concentração de células da suspensão preparada, foi calculado o fator de diluição a ser aplicado, para se obter a concentração desejada no MR liofilizado. A suspensão obtida foi utilizada para o preparo de dois diferentes lotes ( $S_1$  e  $S_2$ ), que foram liofilizados em diferentes ciclos de liofilização. O procedimento teve como objetivo avaliar a reprodutibilidade da técnica no preparo de dois diferentes lotes, utilizando uma mesma suspensão de células. A equivalência entre os lotes foi verificada utilizando o programa Microsoft Excel. A partir dos dados obtidos no teste da homogeneidade foi aplicado o Teste F de equivalência entre as variâncias e posteriormente o Teste t de Student com nível de significância de 5%.

Dois mililitros da suspensão foram homogeneizados com 198 mL de uma solução de Skim Milk a 10%. Volumes de 0,5 mL foram transferidos para 120 frascos de vidro estéreis com capacidade de 4 mL. Após o envase, tampas de borracha estéreis foram encaixadas nos frascos e, em seguida, foram congelados em freezer a  $-70^\circ\text{C}$ , por um intervalo mínimo de 24 horas. O material foi liofilizado (LIOTOP, K 105) por 24 horas.

### Ensaio de controle

Os ensaios de verificação de vácuo, determinação da umidade residual e verificação da pureza foram incluídos no estudo com a intenção de avaliar a qualidade final dos MR liofilizados.

### Verificação de vácuo

Logo após a liofilização foi realizada a verificação de vácuo dentro de cada frasco, através da utilização de aparelho emissor de centelha elétrica (Tesla Coil, 2-12-8). Os frascos com vácuo foram lacrados com tampa de metal, etiquetados e estocados em freezer a  $-20^\circ\text{C}$ .

### Determinação da Umidade Residual

Três frascos de cada lote foram utilizados para a determinação da umidade residual por gravimetria, a partir dos procedimentos descritos no POP INCQS 65.3130.001<sup>16</sup>. A umidade residual foi calculada pela média dos 3 liófilos analisados.

A avaliação dos resultados foi realizada segundo recomendações do Guideline for the Determination of Residual Moisture in Dried Biological Products<sup>17</sup>, que descreve a faixa percentual de 1 a 3% de umidade residual, como ideal para a maioria dos produtos biológicos liofilizados.

### Verificação da pureza

Para a verificação da pureza foram utilizados doze frascos por lote, número correspondente a 10%, conforme recomendações descritas no POP INCQS 65.3230.001<sup>18</sup>.

Os liófilos foram reconstituídos com 1 mL de solução salina fisiológica contendo peptona a 0,1%, e deixados em repouso por 15 minutos. Após a reconstituição uma alçada de cada frasco foi semeada em placas de ágar sangue, através da técnica de esgotamento. Em paralelo foi realizada a semeadura de uma cepa de referência de *S. Typhimurium* INCQS 0150 (ATCC 14028).

As placas foram incubadas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ , por  $24 \pm 2$  horas. Após o período de incubação o crescimento nas placas semeadas foi comparado com a morfologia colonial da cepa de referência. Os MR que apresentaram placas com crescimentos de apenas um tipo de colônia e similares à cepa de referência foram considerados puros.

### Estudos de homogeneidade

Dez frascos de cada lote, selecionados aleatoriamente, foram utilizados para o teste da homogeneidade, que ocorreu em um período máximo de 1 mês após a liofilização.

Os liófilos foram reconstituídos, como descrito no ensaio da verificação da pureza, e então homogeneizados com 9 mL de solução salina fisiológica contendo peptona



a 0,1%. Volumes de 1 mL foram transferidos para duas placas de Petri estéreis. A enumeração foi baseada na metodologia descrita por Schulten et al<sup>19</sup>.

Após o período de incubação, foi realizada a contagem das colônias. Foram selecionadas placas contendo de 15 a 150 Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/mL.

Para a análise estatística da homogeneidade foram utilizados os procedimentos descritos por Thompson, Ellison e Wood<sup>9</sup>. Primeiramente as contagens das placas foram convertidas em  $\log_{10}$ . Em seguida foi aplicado o teste de Cochran aos resultados, com o propósito de eliminar possíveis valores dispersos. Foi então realizada a análise de variância (ANOVA), utilizando o programa Microsoft Excel. A avaliação da homogeneidade foi realizada a partir da comparação dos valores de variância entre as amostras ( $S_{am}^2$ ) e o “c” crítico. Para cada um dos lotes foram atribuídos diferentes valores de desvio padrão ( $\sigma_p$ ), de modo a se obter  $S_{am}^2 < c$ . Os materiais foram considerados homogêneos, com 95% de confiança, quando  $S_{am}^2 < c$ .

Foi realizada a avaliação da precisão do teste da homogeneidade, segundo Fearn e Thompson<sup>20</sup>, que estabelecem a relação  $\sigma_{an}/\sigma_p < 0,5$ .

#### ▪ Estudo da estabilidade

O teste de estabilidade em longo prazo foi realizado por 3 meses consecutivos e um ano após o preparo dos lotes. A cada análise mensal, seis frascos, de cada lote, estocados a -20°C foram submetidos à contagem como descrito no estudo da homogeneidade. As médias das contagens realizadas durante os testes da homogeneidade foram utilizadas representando o tempo zero de armazenamento.

Para a avaliação da estabilidade em curto prazo foram utilizados três grupos de quatorze frascos de cada lote. Para a simulação do transporte em diferentes temperaturas, foi aplicada a metodologia do “isochronous design”<sup>21</sup>, que recomenda a análise dos analitos sob condições de repetitividade. A cada dia, dois frascos de cada lote foram incubados nas temperaturas de 4°C, 25°C e 37°C, em embalagens próprias para transporte de material biológico, com duas unidades de gelo reciclável dentro de cada caixa. As condições de tempo e temperatura foram mantidas para todos os 14 frascos de cada grupo. Sete dias após a primeira incubação, os frascos foram analisados, sob as mesmas condições de análise descritas anteriormente.

Para a avaliação estatística da estabilidade foi aplicada a metodologia indicada pela ISO GUIDE

35:2006<sup>10</sup>, que estabelece a utilização da análise de regressão linear simples para a verificação da relação entre as duas variáveis (concentração x tempo).

Na análise de regressão linear foi utilizado o programa Microsoft Excel, obtendo-se o valor do intercepto, da inclinação e dos intervalos de confiança do intercepto e da declividade.

A partir dos intervalos de confiança da inclinação pôde-se inferir a correlação linear entre a variável explicativa e a de resposta, que segundo Barros, Scarminio e Bruns<sup>22</sup> ocorre quando os intervalos de confiança de  $\beta$  diferem de zero, indicando assim a inexistência de relação linear entre as variáveis ao longo do tempo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Avaliação da equivalência entre os lotes

Os resultados obtidos mostraram que os materiais foram equivalentes, com nível de significância de 5%, indicando que a técnica de preparo apresentou uma boa reprodutibilidade.

### Controles dos lotes produzidos

#### ▪ Verificação do vácuo

O percentual de frascos que apresentaram resultados satisfatórios para vácuo foi de 100% (120 frascos) no lote  $S_1$  e 99,2% (119 frascos) no lote  $S_2$ . Esses resultados confirmam a adequação do sistema de fechamento empregado no final do processo de liofilização.

#### ▪ Verificação da pureza

A verificação da pureza foi satisfatória para os dois lotes analisados evidenciando a ausência de contaminação dos MR produzidos, com bactérias indesejáveis, durante todo o processo de produção dos materiais.

#### ▪ Determinação da umidade residual

As médias das contagens dos três frascos utilizados para umidade residual foram de 2,29 para o lote  $S_1$  e de 2,21 para o lote  $S_2$ . Estes resultados encontram-se em conformidade com preconizado pelo Guideline for the Determination of Residual Moisture in Dried Biological Products<sup>11</sup>, que descreve a faixa de 1,0 a 3,0% de umidade residual, como ideal para a maioria dos produtos biológicos liofilizados. Os resultados obtidos demonstram a eficiência do processo de liofilização nos dois ciclos distintos.

### ■ Estudo da Homogeneidade

Os resultados das contagens obtidas na avaliação da homogeneidade para os dois lotes produzidos estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Resultado das contagens (UFC<sup>a</sup>/mL) dos lotes S<sub>1</sub> e S<sub>2</sub> no teste de homogeneidade

Frascos	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>
1	140 e 150	164 e 147
2	167 e 140	152 e 148
3	151 e 168	143 e 130
4	141 e 139	133 e 131
5	144 e 175	154 e 152
6	160 e 176	125 e 119
7	212 e 224	176 e 158
8	170 e 191	159 e 157
9	154 e 160	161 e 153
10	103 e 98	148 e 140

a – Unidade formadora de colônias

Os valores das contagens foram convertidos em log<sub>10</sub>. O teste de Cochran, não identificou valores dispersos em nenhum dos dois lotes. Os dados obtidos a partir da análise da variância (ANOVA) e os valores de  $\sigma_p$  são citados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Valores obtidos a partir da análise da variância ANOVA e resultados da avaliação da homogeneidade dos lotes S<sub>1</sub> e S<sub>2</sub>

Valores	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>
Valor do desvio padrão analítico ( $\sigma_{an}$ )	0,0344	0,0199
Valor do desvio padrão atribuído ( $\sigma_p$ )	0,27	0,10
Variâncias entre amostras ( $S_{am}^2$ )	0,0067	0,0015
Valor crítico do teste de homogeneidade	0,0073	0,0021
Resultado	Homogêneo	Homogêneo

Ao serem aplicados os limites sugeridos por Fearn e Thompson<sup>19</sup> para a avaliação da precisão do teste da homogeneidade ( $\sigma_{an}/\sigma_p < 0,5$ ), foi observado que os lotes preparados obedeceram à relação citada, sendo, portanto, considerados homogêneos (Tabela 2).

O “Food Examination Performance Assessment Scheme–FEPAS”, provedor de EP de alimentos da Inglaterra, utiliza o valor de  $\sigma_p$  de 0,25 para avaliação da homogeneidade dos MR produzidos e para o cálculo do Z-score a ser aplicado na avaliação dos resultados dos EP. Ao serem comparados os valores de  $\sigma_p$  obtidos neste estudo, foi verificada a proximidade com o limite utilizado pelo FEPAS, indicando que os procedimentos aplicados para a obtenção de MR homogêneos foram adequados (Tabela 2).

A comparação dos resultados obtidos no teste da homogeneidade, com a de outros estudos, foi dificultada pela diversidade dos testes estatísticos utilizados para esta avaliação. Peterz e Steneryd<sup>23</sup> obtiveram resultados satisfatórios para a homogeneidade de MR preparados pela técnica de liofilização ao utilizarem o teste-F. Beckers et al<sup>24</sup>, In’t Veld<sup>25</sup> e In’t Veld, e Van Strijp-Lockeffer<sup>26</sup> verificaram a homogeneidade dos MR produzidos pela técnica de spray-dryer utilizando a distribuição de “Poison”.

### ■ Estudo da Estabilidade

Como os lotes produzidos foram considerados equivalentes, a verificação da estabilidade em longo e curto prazo foi realizada com as médias das contagens dos dois lotes.

Os resultados das médias das contagens da estabilidade em longo prazo estão descritos na Tabela 3.

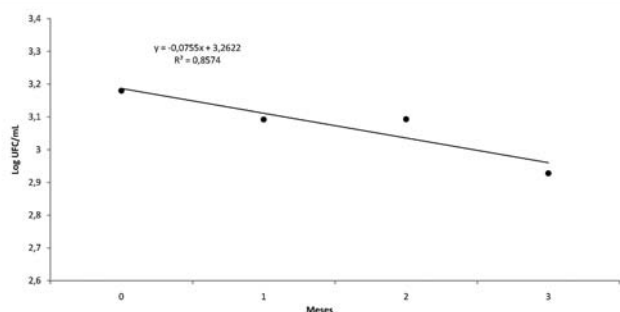
**Tabela 3.** Médias das contagens (UFC<sup>a</sup>/mL) dos lotes S<sub>1</sub> e S<sub>2</sub> obtidas no estudo da estabilidade em longo prazo

Frascos	1º mês	2º mês	3º mês	12º mês
1	1275	1260	910	528
2	1615	1185	845	468
3	1140	1075	770	393
4	1290	1405	840	398
5	1165	1315	825	665
6	1045	1385	910	483

a - Unidade formadora de colônias

A análise estatística de regressão aplicada aos dados indicou que os MR produzidos se mantiveram estáveis durante o período inicial do estudo de 3 meses à temperatura de -20°C (Figura 1). Entretanto, após um ano de estoque foi evidenciada queda na viabilidade do número de células, acarretando na instabilidade dos MR. Diferentemente, Janning et al<sup>8</sup> descreveram a temperatura de -20°C como adequada para o estoque de MR contendo *S. typhimurium* produzido pela técnica de spray-dryer por um período de 4 anos sem apresentarem perdas expressivas na viabilidade das células.

A média da concentração de células dos lotes S<sub>1</sub> e S<sub>2</sub> ao longo de 3 meses se encontra na Figura 1. Os valores dos limites de confiabilidade de 95% do coeficiente angular de inclinação da análise de regressão linear, que definem a estabilidade do material, estão descritos abaixo da figura.



**Figura 1.** Variação das médias de concentração de células, dos lotes S<sub>1</sub> e S<sub>2</sub>, ao longo de 3 meses de estoque a -20°C

**Limites de confiabilidade 95%:** Inferiores (-0,169228122), Superiores (0,018187555)

**Resultado:** Estável em três meses de estoque.

Cabe ressaltar que resultados do teste da estabilidade em longo prazo indicando queda na concentração de uma característica estudada, não devem ser considerados como limitantes para a utilização de MR. No entanto, se faz necessário a realização deste controle durante todo o período de uso do material, a fim de verificar se a perda da estabilidade ocorre de forma homogênea.

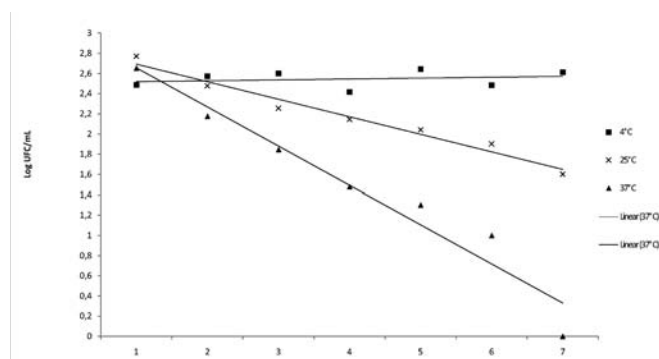
O estudo da estabilidade em curto prazo revelou as perdas das concentrações de células ocorridas diariamente nas diferentes temperaturas (Tabela 4). A análise estatística de regressão linear foi aplicada aos dados obtidos.

**Tabela 4.** Médias das contagens (UFC<sup>a</sup>/mL) dos lotes S<sub>1</sub> e S<sub>2</sub> obtidas no estudo da estabilidade em curto prazo nas temperaturas de 4°C, 25°C e 37°C

Tempo de incubação (dias)	Temperatura de transporte		
	4°C	25°C	37°C
1	306	590	450
2	375	300	150
3	398	180	70
4	261	140	30
5	440	110	20
6	305	80	10
7	410	40	1

a - Unidade formadora de colônias

O perfil da variação na concentração de células dos lotes estudados ao longo de 7 dias nas temperaturas de 4°C, 25°C e 37°C se encontra na Figura 2. Os valores dos limites de confiança de 95%, que definem a estabilidade do material para cada uma das temperaturas estudadas estão descritos abaixo da figura.



**Figura 2.** Gráfico de regressão linear das médias de concentração de células, dos lotes S<sub>1</sub> e S<sub>2</sub>, durante simulação de transporte nas temperaturas de 4°C, 25°C e a 37°C, por 7 dias

**Limites de confiabilidade 95%**

Temperatura de 4°C: Inferiores (-0,034509455); Superiores (0,052030458) – Estável;

Temperatura de 25°C: Inferiores (-0,209614679); Superiores (-0,13812235) – Não Estável;

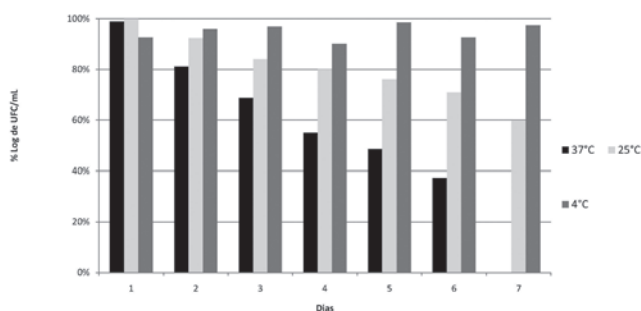
Temperatura de 37°C: Inferiores (-0,493462371); Superiores (-0,281958207) – Não Estável.

Foi verificado que dentre as temperaturas estudadas, a de 4°C seria a ideal para o transporte dos lotes, uma vez que os resultados estatísticos obtidos indicaram a manutenção da concentração de células dos MR durante os sete dias. Porém, a média das contagens na temperatura de 4°C foi de 410 UFC/mL no sétimo dia de transporte, concentração ideal para ensaios quantitativos.

Para ensaios microbiológicos qualitativos, a concentração de células deve ser reduzida objetivando a verificação da capacidade do laboratório na detecção do microrganismo pesquisado. Estudos do limite mínimo de detecção (LMD) para a pesquisa de *Salmonella* em alimentos são descritos na literatura. Bricio<sup>27</sup>, utilizando a metodologia do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, obteve LMD de 12 UFC/25 g de alimento. Nunes<sup>28</sup>, ao estudar o LMD com culturas de *Salmonella* utilizando metodologia da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC), encontrou valores de LMD variando entre 1 a 8 UFC/25 mL. Desta forma, sugerimos que MR para ensaios qualitativos a serem transportados a 4°C devem ser preparados com suspensões de células em concentrações mais baixas que as utilizadas neste estudo.

O envio desses materiais, à temperatura ambiente, para laboratórios localizados em diferentes regiões do país acarretaria no recebimento de MR com diferentes concentrações de células, o que comprometeria a correta avaliação dos resultados de um EP.

A Figura 3 ilustra o percentual de perdas de viabilidade do número de células verificadas nos materiais produzidos ao longo dos sete dias de estudo nas temperaturas de transporte.



**Figura 3.** Percentual de perda diária, da média dos lotes S<sub>1</sub> e S<sub>2</sub>, durante simulação de transporte nas temperaturas de 4°C, 25°C e a 37°C

Os dados indicam uma perda expressiva na concentração de *Salmonella* spp. já no segundo dia de

transporte a 25°C e a 37°C, com médias percentuais de perda de viabilidade de 10% e 19%, respectivamente. As perdas a 37°C se acentuaram nos dias subsequentes, chegando a apresentar percentuais de 50% no 5º dia e acima de 90% no 7º dia.

In't Veld<sup>24</sup> avaliou, semanalmente, a estabilidade de MR contendo *Salmonella* Panama, preparado pela técnica de spray-dryer mantido nas temperaturas de 22°C, 30°C e 37°C. O autor indicou redução percentual da concentração de células, na primeira semana, de 2,5% para o MR mantido a 22°C; de 9,7%, a 30°C e de 16,2%, a 37°C.

Ao compararmos os resultados encontrados com os descritos no estudo acima, observamos que as médias de perdas apresentadas pelos MR liofilizados e mantidos a 25°C e 37°C por 7 dias, foram bem mais elevadas (40% e 99%, respectivamente) que as indicadas com MR preparados pela técnica de spray-dryer. Tais resultados sugerem que os MR produzidos por spray-dryer sejam mais estáveis nas faixas de temperatura estudadas do que os MR liofilizados.

## CONCLUSÃO

A técnica de liofilização foi considerada adequada para a produção de MR de qualidade e aplicável a EP.

Os MR apresentaram estabilidade à temperatura de estoque (-20°C) durante os três primeiros meses, porém, foi observada perda de viabilidade após um ano de armazenamento.

Os resultados do teste de estabilidade em curto prazo mostraram que os MR se mantiveram estáveis apenas na temperatura de 4°C, limitando o transporte do MR a essa temperatura. Entretanto, transporte de materiais a baixas temperaturas constitui uma prática complicada e de custo bastante elevado. Desta forma, outras temperaturas entre 4°C e abaixo de 25°C poderiam ser estudadas.

Novos estudos são necessários na tentativa de induzir a tolerância das células bacterianas às variações de temperatura durante o transporte de MR destinados a EP.

## AGRADECIMENTOS

A Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) pelo apoio financeiro ao Projeto: "Comparações Interlaboratoriais em Microbiologia de Alimentos".

Ao Laboratório de Enterobactérias do Departamento de Bacteriologia do Instituto Oswaldo Cruz – IOC/ FIOCRUZ.

Ao Laboratório de Bactérias de Referência do Departamento de Microbiologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS/FIOCRUZ.

## REFERÊNCIAS

1. Hayes D. Quality assurance in the microbiology laboratory. *Accredit Qual Assur*. 1996; 1: 18-23.
2. Roberts D. Proficiency testing in the food microbiology laboratory. *Arh Hig Rada Toksikol J*. 1999; 50(1): 55-65.
3. Camargo, TSP. Proposta de Integração das Normas ISO/IEC 17025 e BPL a um Software de Gerenciamento e Controle Laboratorial. [monografia de graduação]. Minas Gerais: Universidade Federal de Itajubá, 2006.
4. NBR ISO/IEC 17025. Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro: ABNT, 2005. 31p.
5. Rosengren A, Heneryd AC. Proficiency testing schemes – their role in quality assurance. *Int J Food Microbiol*. 1998; 45: 55.
6. Emons H, Fajgelj A, Van der Veen AMH, Watters R. New definitions on reference materials. *Accredit Qual Assur*. 2006; 10: 576-8.
7. NBR ISO/GUIA 30. Termos e definições relacionados com materiais de referência. Rio de Janeiro: ABNT, 2000.
8. Philipp WJ, Iwaarden PV, Schimmel H, Meeus N, Kollmorgen N. Development of reference materials for microbiological analysis. *Accredit Qual Assur*. 2007; 12: 134-8.
9. Janning B, Veld PHL, Mooijman KA, Havelaar AH. Development, production and certification of microbiological reference materials. *Fresenius J Anal Chem*. 1995; 352: 240-5.
10. Thompson M, Ellison SLR, Wood R. International harmonized protocol for proficiency testing of (chemical) analytical chemistry laboratories. *Pure Appl Chem*. 2006; 78(1): 145-96.
11. International Organization for Standardization – ISO GUIDE 35. Reference Materials – General and statistical principles for certification. 2006.
12. NBR ISO/IEC GUIA 43-1. Ensaios de proficiência por comparações interlaboratoriais - Parte 1 - Desenvolvimento e operação de programas de ensaios de proficiência. Rio de Janeiro: ABNT, 1999.
13. ILAC-G 13:08/2007. Guidelines for the requirements for the competence of providers of proficiency testing schemes. ILAC, 2007.
14. International Organization for Standardization – ISO 13528. Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons. 2005.
15. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS). Oficina Sobre Ensaios de Proficiência e Produção de Materiais de Referência no Brasil, II. Rio de Janeiro 15 a 16 de abril de 2008. Relatório. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2008.
16. Determinação de Umidade Residual por Gravimetria em Vacinas Liofilizadas. Rev. 03. In: Manual da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2008. Seção 4.3. 5p. (65.3130.001).
17. Food and Drug Administration – FDA, Guideline for the Determination of Residual Moisture in Dried Biological Products. 1990. [Acesso em 17 Nov. 2008.]. Disponível em: [http://www.fda.gov/Cber/gdlns/moisture.htm].
18. Produção e Preservação pelo Método de Liofilização de Bactérias da Coleção de Culturas. Rev. 03. In: Manual da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2005. Seção 10. 14p. (65.3230.001).
19. Schulten SM, in Veld PH, Ghameshlou Z, Schimmel H, Linsinger T. The certification of the number of colony forming particles of *Salmonella* Typhimurium and number fraction of negative capsules from artificially contaminated milk powder – CRM 507 R. European Commission, bcr information, 2000.
20. Fearn T, Thompson M. A new test for “sufficient homogeneity”. *Analyst*. 2001; 126: 1414-7.
21. Lamberty A, Schimmel H, Pauwels J. The study of the stability of reference materials by isochronous measurements. *Fresenius J Anal Chem*. 1998; 360: 359–61.
22. Barros NB, Scarminio IS, Bruns RE. Como Fazer Experimentos – Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria, 2 ed. Campinas, SP: Editora Unicamp, 2003.
23. Peterz M, Norberg P. Freeze dried mixed cultures as samples for proficiency tests and collaborative studies in food microbiology. *J Assoc Anal Chem*. 1983; 66(6): 1510-3.
24. Beckers HJ, Van Lesden FM, Meijssen MJM, Kampelmacher EH. Reference material for the evaluation of a standard method for the detection of *Salmonella* in food and feeding stuffs. *J Appl Bacteriol*. 1985; 59: 507-12.
25. In't Veld, PH. The use of reference materials in quality assurance programmes in food microbiology laboratories. *Int J Food Microbiol*. 1998; 45(1): 35-41.
26. In't Veld PH, Havelaar AH, Van Strijp-Lockfeer NGWM. The certification of a reference material for the evaluation of methods for the enumeration of *Bacillus cereus*. *J Appl Bacteriol*. 1999; 86: 266-74.
27. Bricio SML. Avaliação da Qualidade Microbiológica de Salpicão de Frango e Salada de Maionese com Ovos Servidos em Restaurantes Self-service da Cidade do Rio de Janeiro. [tese de doutorado]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2004.
28. Nunes FFV. Limite Mínimo de Detecção de Métodos de Análise de *Salmonella* spp. para Alimentos: Uma Contribuição Metodológica. [dissertação de mestrado]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2006.

## Qualidade do leite na indústria de laticínios

### The quality of the milk stored in dairy industries silos

RIALA6/1252

Marco Antônio Pereira da SILVA<sup>1\*</sup>, Priscila Alonso dos SANTOS<sup>1</sup>, Karen Martins LEÃO<sup>1</sup>, Rodrigo Balduino Soares NEVES<sup>2</sup>, Kátia Cylene GUIMARÃES<sup>1</sup>, Edmar Soares NICOLAU<sup>2</sup>

\*<sup>1</sup>Endereço para correspondência: Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, Rodovia Sul Goiana, Km 01, Zona Rural, Caixa Postal – 66, fone (64) 3620 5626, CEP – 75901-970, Rio Verde, GO, Brasil, e-mail: marcotonyrv@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Laboratório de Qualidade do Leite, Centro de Pesquisa em Alimentos, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil

Recebido: 01.11.2009 – Aceito para publicação: 19.02.2010

#### RESUMO

Com o objetivo de avaliar a qualidade das amostras de leite conservadas nos silos de estocagem de duas indústrias de laticínios, foram coletadas sete amostras da indústria A e seis da indústria B. As amostras foram analisadas quanto aos parâmetros CCS, CBT, composição centesimal, contagem de microrganismos psicrotrofos e acidez titulável. A comparação de resultados entre os tipos de amostra foi realizada por meio do teste F da análise de variância. As análises estatísticas foram feitas por meio do programa de *software* SISVAR. Foram encontradas más condições de higiene dos utensílios e equipamentos usados nos silos; a temperatura e o tempo de estocagem estavam acima dos respectivos limites máximos permitidos pela legislação. Os resultados obtidos indicaram que as autoridades pertinentes não tem monitorado a qualidade do leite cru refrigerado recebido pelas indústrias de laticínios.

**Palavras-chave.** higiene, leite a granel, silo industrial, temperatura de armazenamento.

#### ABSTRACT

The present study analyzes the milk samples collected from the storing silos of two dairy industries, being seven samples from industry A and six from industry B. The SCC, TBC, centesimal composition, psychrotrophic microorganism counting and the titratable acidity were investigated. The results on types of milk samples were statistically compared by means of test F of the variance analysis, employing the SISVAR software. Unsuitable hygienic conditions in appliances and equipments were found, and the milk storage time-period and temperature were found to be over the respective maximum limits established by the legislation in force. Inadequate procedures in storing raw milk samples produce hazards that must be mitigated by monitoring the quality of products.

**Key words.** bulk milk container, hygiene, industrial silo, storage temperature.

## INTRODUÇÃO

As alterações nas características físico-químicas e microbiológicas do leite, ocorrem desde o momento da ordenha até o beneficiamento pela indústria. Os fatores que podem influenciar tais alterações são as condições higiênicas de obtenção do leite, a higiene dos utensílios e equipamentos envolvidos na estocagem, a sanidade do rebanho, o tempo e a temperatura de estocagem nos tanques de expansão, o transporte e as condições de estocagem na indústria, dentre outros fatores.

Em função da elevação da temperatura durante o transporte, após a chegada na indústria, o leite passará por um resfriamento e em seguida será armazenado nos silos industriais até o processamento. Pinto et al<sup>1</sup> informaram que os leites cru refrigerados mantidos em silos apresentaram contagens microbianas superiores às dos leites mantidos em tanques de expansão. Além disso, a refrigeração do leite, por períodos prolongados, na propriedade ou na indústria, comprometeu a qualidade, devido à possibilidade de seleção de bactérias psicotróficas proteolíticas.

Nos silos de estocagem das indústrias de laticínios o processamento poderá ocorrer dentro de algumas horas ou até mesmo de alguns dias, essa dependência está na capacidade de estocagem do leite pelos laticínios e principalmente na demanda de leite para o processamento dos derivados lácteos. Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a qualidade do leite recebido por duas indústrias de laticínios, e verificar se os resultados obtidos atendem ao pressuposto pela legislação brasileira.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta das amostras

A pesquisa foi realizada no período de julho a agosto de 2008, com amostras de leite coletadas dos silos de estocagem de dois laticínios localizados no Sudoeste Goiano. As indústrias foram identificadas como Empresa A e Empresa B. A indústria A recebia aproximadamente 30 mil L/dia e a indústria B recebia 200 mil L/dia.

Para a Indústria A foram coletadas sete amostras de leite cru refrigerado e para a Indústria B foram coletadas seis amostras. Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em caixas

isotérmicas contendo gelo e encaminhadas para realização das análises.

As amostras foram coletadas em frascos contendo conservante bronopol (contagem de células somáticas – CCS e composição centesimal) e azidiol (Contagem bacteriana total – CBT), e  $\pm$  250 mL de leite foram armazenados em frascos de cor âmbar previamente esterilizados para serem realizadas as análises microbiológicas e de acidez titulável.

A CCS, CBT e composição centesimal foram realizadas no Laboratório de Qualidade do Leite do Centro de Pesquisa em Alimentos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás. As análises microbiológicas e de acidez titulável foram realizadas nos Laboratórios da Unidade de Agroindústria do Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde.

### Análises microbiológicas

Para avaliar a qualidade microbiológica do leite cru refrigerado, foram realizadas as análises de microrganismos psicotróficos, psicotróficos proteolíticos e *Pseudomonas* spp.

#### ▪ Contagem de microrganismos psicotróficos

A diluição das amostras de leite foi realizada em água peptonada ( $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ ). Foi adicionado 1 mL das diluições em placas de Petri contendo de 15 a 17 mL de ágar padrão para contagem (APHA<sup>2</sup>). As placas foram incubadas invertidas a 7°C/10 dias<sup>3</sup>. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônia (UFC)/mL.

#### ▪ Contagens de microrganismos psicotróficos proteolíticos

Foi adicionado 1 mL de cada diluição em placas de Petri esterilizadas e adicionados de 15 a 17 mL de ágar leite (Agar padrão acrescido de 10% de leite em pó desnatado reconstituído a 10%). As placas foram incubadas a 21°C/72 horas<sup>3</sup>. Efetuou-se a contagem de colônias (UFC/mL) que possuíam halo transparente ao redor.

#### ▪ Contagem de *Pseudomonas* spp.

Após a realização das diluições decimais, foi adicionado 0,1 mL em placas de Petri esterilizadas e adicionados de 15 a 17 mL de *Pseudomonas* Agar Base com 5 mL de glicerol. Sendo imediatamente incubada a temperatura de 28°C por 48 horas. Ao fim desse período,

realizou-se a leitura e interpretação<sup>4</sup>. Os resultados foram expressos em UFC/mL.

### Análises físico-químicas

#### ▪ Acidez titulável

A análise foi realizada segundo os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos<sup>5</sup>. Os resultados foram expressos em gramas (g) de ácido láctico/100 mL.

#### ▪ Composição centesimal

Os teores de gordura, proteína, lactose, extrato seco total (EST) e extrato seco desengordurado (ESD) foram determinados utilizando-se o equipamento Milkoscan 4000 (Foss Electric A/S. Hillerod, Denmark). Os resultados foram expressos em porcentagem.

#### Contagem de células somáticas

A análise de células somáticas (CS) foi realizada através do equipamento Fossomatic 5000 Basic (Foss Electric A/S. Hillerod, Denmark). O resultado foi expresso em CS/mL.

#### Contagem bacteriana total

A CBT foi realizada por meio do equipamento Bactoscan FC (Foss Electric A/S. Hillerod, Denmark). Os resultados foram expressos em UFC/mL.

#### Análises Estatísticas

Para atender as pressuposições da análise de variância, os dados da contagem de psicotróficos, psicotróficos proteolíticos, *Pseudomonas* spp., CCS e CBT foram transformados por meio do logaritmo na base 10. A comparação entre os tipos de amostra foi realizada por meio do teste F da análise de variância. As análises estatísticas foram realizadas por meio do Software SISVAR<sup>6</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 são apresentados os valores médios dos parâmetros de qualidade do leite cru refrigerado de duas indústrias de laticínios.

Os resultados da acidez titulável, lactose e ESD da empresa B diferiram ( $p < 0,05$ ) dos resultados apresentados pela empresa A. Os teores de gordura, proteína e EST não diferiram ( $p > 0,05$ ) entre as empresas.

**Tabela 1.** Valores médios da acidez titulável, gordura, proteína, lactose, EST, ESD, CCS, CBT, contagem de psicotróficos, psicotróficos proteolíticos e *Pseudomonas* spp. do leite cru refrigerado de dois laticínios da região Sudoeste do Estado de Goiás

Variáveis	Empresas	
	A	B
Acidez titulável (g de ácido láctico/100 mL)	0,186b	0,193a
Gordura (%)	3,66a	3,66a
Proteína (%)	3,20a	3,20a
Lactose (%)	4,41b	4,45a
EST (%)	12,17a	12,23a
ESD (%)	8,52b	8,57a
CCS (CS/mL)	4,1 x 10 <sup>5</sup> b	5,3 x 10 <sup>5</sup> a
CBT (UFC/mL)	14,2 x 10 <sup>7</sup> b	28,3 x 10 <sup>7</sup> a
Psicotróficos (UFC/mL)	7,8 x 10 <sup>6</sup> a	11,7 x 10 <sup>7</sup> a
Proteolíticos (UFC/mL)	5,5 x 10 <sup>6</sup> a	3,7 x 10 <sup>6</sup> a
<i>Pseudomonas</i> spp. (UFC/mL)	1,0 x 10 <sup>6</sup> a	4,3 x 10 <sup>6</sup> a

Médias seguidas de letras distintas na linha diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

O valor médio da acidez titulável da empresa B foi de 0,193 g de ácido láctico/100 mL, enquanto que, na empresa A, o resultado médio foi de 0,186 g de ácido láctico/100 mL. Nos dois laticínios os resultados da acidez titulável foram ligeiramente maiores que o permitido pela legislação brasileira, que admite uma variação de 0,14 a 0,18 g de ácido láctico/100 mL de leite<sup>7</sup>.

Os resultados da acidez titulável apresentaram-se mais elevados devido à alta CBT das amostras destes laticínios. A utilização da lactose como substrato para a proliferação dos microrganismos pode ter resultado em aumento da acidez titulável. No momento da coleta do leite nos laticínios a acidez titulável já estava acima do limite máximo permitido pela legislação brasileira.

Os teores de gordura e proteína não diferiram ( $p > 0,05$ ) e os resultados médios foram respectivamente



de 3,66% e 3,20%, para as duas empresas avaliadas. Esses componentes estão diretamente relacionados ao rendimento industrial dos queijos e derivados lácteos, e podem ser utilizados como parâmetros para o pagamento do leite por qualidade pelas indústrias. O pagamento do leite de acordo com a composição centesimal visa melhorar a qualidade da matéria-prima, aumentando o rendimento industrial para a fabricação de derivados lácteos<sup>8</sup>. Teores acima de 3,0% de gordura e 2,9% de proteína são considerados como ideais para o recebimento do leite cru refrigerado pelas indústrias<sup>7</sup>.

Os resultados do teor de lactose diferiram ( $p > 0,05$ ) entre as empresas. O laticínio B obteve média de 4,45% e o laticínio A média de 4,41%. A legislação brasileira não estabelece o teor mínimo de lactose para o recebimento do leite cru refrigerado pelos laticínios.

O EST não diferiu ( $p > 0,05$ ) entre as empresas, os valores obtidos foram de 12,17% e 12,23% para os laticínios A e B, respectivamente. Considerando que a legislação estabelece o mínimo de 3,0% de gordura e 8,4% de ESD o EST acima de 11,40% seria o adequado para o recebimento do leite cru refrigerado pelos laticínios. A implantação de sistemas de pagamento por qualidade, com base nos resultados de sólidos totais, e da CCS, possibilitaria ao país enquadrar-se nos padrões internacionais de qualidade, necessários à manutenção e conquista de oportunidades de mercado<sup>8</sup>.

O ESD diferiu significativamente ( $p > 0,05$ ) entre os laticínios, os resultados foram de 8,60% e 8,50% para os laticínios B e A, respectivamente. Considerando que a legislação brasileira estabelece o mínimo de 8,40%, os dois laticínios atenderiam aos padrões estabelecidos<sup>7</sup>. Resultados da composição centesimal ligeiramente maiores que os do presente estudo foram observados por Bueno et al<sup>9</sup> que relataram para o intervalo de CCS de 401 mil CS/mL a 750 mil CS/mL os teores de gordura, proteína, lactose e sólidos totais do leite cru refrigerado de 3,72%; 3,23%; 4,49% e 12,39% respectivamente, em amostras analisadas no estado de Goiás.

Os resultados da CCS diferiram ( $p < 0,05$ ) entre os dois laticínios estudados. O laticínio B apresentou média de  $5,3 \times 10^5$  CS/mL e no laticínio A, a média foi de  $4,1 \times 10^5$  CS/mL. Embora os resultados observados para a CCS sejam elevados, os mesmos estão dentro do limite máximo de 750 mil CS/mL estabelecido pela legislação brasileira<sup>7</sup>.

Os resultados da CCS revelaram a incidência de mastite no leite granelizado obtido dos laticínios. Para

Andrews et al<sup>10</sup>, os animais que apresentaram CCS acima de 250 mil CS/mL de leite foram considerados portadores de mastite clínica. No estudo conduzido por Machado et al<sup>11</sup>, foi observado que o leite de tanques de expansão com CCS mais altas apresentaram maior porcentagem de gordura, menor de proteína e lactose e igual de sólidos totais, sendo que as mudanças significativas nas concentrações dos componentes do leite ocorreram a partir de 1 milhão CS/mL para gordura e 500 mil CS/mL para proteína e lactose.

Bueno et al<sup>9</sup> relataram que a elevação da CCS está relacionada à redução das concentrações de proteína, lactose e sólidos totais e que, no Estado de Goiás, o leite apresenta CCS mais elevada no período das secas.

A incidência de mastite no rebanho resulta no aumento da CCS que é um dos principais parâmetros utilizados para avaliação da qualidade do leite, pois está relacionada a diminuição das concentrações dos componentes do leite e alteração nas características sensoriais dos derivados lácteos. De acordo com Santos et al<sup>12</sup>, o leite com alta CCS apresentou maior taxa de proteólise durante o período de armazenamento que o leite de baixa CCS.

Os valores da CBT do leite cru refrigerado diferiram ( $p < 0,05$ ) entre as empresas. Os resultados foram de  $14,2 \times 10^7$  UFC/mL e  $28,3 \times 10^7$  UFC/mL para os laticínios A e B respectivamente, e estavam acima do limite máximo permitido pela legislação brasileira que é de 750 mil UFC/mL<sup>7</sup>.

No momento da coleta do leite cru refrigerado nos silos industriais, a CBT já apresentava resultados elevados, no laticínio A e B a CBT foi de  $6 \times 10^6$  UFC/mL e  $8,9 \times 10^6$  UFC/mL respectivamente. As condições de estocagem e higiene dos tanques de expansão e tanques isotérmicos influenciaram na alta CBT, além disso, os microrganismos psicotróficos (Tabela 1) constituíram-se no grupo de microrganismos dominantes. Antunes et al<sup>13</sup> relataram a presença de microrganismos psicotróficos, representando 23% da microbiota do leite *in natura*, os quais, em condições de refrigeração, multiplicam-se mais rapidamente do que a microbiota mesofílica, tornando-se predominante. Arcuri et al<sup>14</sup> informaram que o nível de contaminação do leite cru com bactérias psicotróficas e a mistura do leite de vários produtores em tanques coletivos podem aumentar os riscos de contaminação.

Os resultados obtidos para a CBT estão de acordo com o observado por Pinto et al<sup>1</sup>, que relataram que o leite cru refrigerado mantido no silo industrial não

atendeu ao padrão microbiológico e apresentou contagens maiores que as do leite mantido em tanques individuais ou coletivos. Na pesquisa realizada por Martins et al<sup>15</sup>, no leite armazenado em tanque de expansão no estado de Goiás foi possível observar que dos 30 tanques amostrados nove estavam com CBT acima de  $10^6$  UFC/mL, 14 entre  $10^5$  e  $10^6$  UFC/mL e sete abaixo de  $10^5$  UFC/mL.

Os resultados da contagem de microrganismos psicotróficos, psicotróficos proteolíticos e *Pseudomonas* spp., não diferiram ( $p > 0,05$ ) entre as empresas avaliadas. A contagem desse grupo de microrganismos foi mais elevada que o limite máximo estabelecido para a CBT do leite cru refrigerado.

Para a contagem de microrganismos psicotróficos os resultados médios obtidos foram de  $7,8 \times 10^6$  UFC/mL e  $11,7 \times 10^7$  UFC/mL para os laticínios A e B respectivamente. A manutenção do leite cru refrigerado em temperaturas baixas favoreceu o crescimento de microrganismos psicotróficos. A contaminação dos produtos lácteos por bactérias psicotróficas pode originar-se do suprimento de água de qualidade inadequada, deficiências de procedimentos de higiene e mastite<sup>16</sup>. Portanto, procedimentos de higienização empregados na cadeia produtiva do leite constituem pontos críticos para a obtenção de uma matéria prima de alta qualidade<sup>1</sup>. Silva<sup>17</sup> também registrou uma maior contagem de psicotróficos em amostras de leite cru coletadas em silos industriais dos estados de São Paulo, Rio Grande do Sul e Goiás, as contagens variaram de  $1,4 \times 10^6$  UFC/mL a  $8,8 \times 10^7$  UFC/mL.

Os microrganismos psicotróficos são importantes do ponto de vista da deterioração e com a adoção da refrigeração do leite desde a ordenha até o recebimento nos laticínios, a substituição da microbiota de bactérias mesófilas produtoras de ácido láctico por uma microbiota psicotrófica produtora de enzimas tem sido favorecida e tem levado a diferentes alterações na qualidade do leite e derivados<sup>18,19</sup>.

A contagem de psicotróficos proteolíticos foi de  $5,5 \times 10^6$  UFC/mL e  $3,7 \times 10^6$  UFC/mL para os laticínios A e B, respectivamente. A contagem de *Pseudomonas* spp., foi de  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL e  $4,3 \times 10^6$  UFC/mL para as empresas A e B, respectivamente.

De acordo com Sørhaug<sup>20</sup>, um dos principais fatores que influenciaram a qualidade dos produtos lácteos fabricados com matéria-prima mantida a 7°C ou menos por períodos prolongados, foi a multiplicação da microbiota psicotrófica contaminante produtora de proteases termoestáveis. A refrigeração é importante

na manutenção das condições microbiológicas do leite cru até o beneficiamento. Na indústria de laticínios, onde grandes volumes de leite ficam armazenados a temperatura de refrigeração por longos períodos, as bactérias psicotróficas podem desenvolver-se causando mudanças indesejáveis no leite e derivados. A presença desses microrganismos indica a baixa qualidade do leite e insatisfatórias condições sanitárias no processamento<sup>21</sup>.

Os psicotróficos são responsáveis pela produção de enzimas, e os processos de pasteurização do leite eliminam a maioria dos microrganismos inicialmente presentes no leite cru. Existe, porém, a possibilidade de sobrevivência de microrganismos ou de enzimas produzidas por estes no leite pasteurizado. Existe também a possibilidade de uma recontaminação por essas bactérias durante as fases de processamento do leite<sup>22</sup>.

Segundo Pinto et al<sup>1</sup>, a refrigeração do leite, por períodos prolongados, na fonte de produção ou na indústria, comprometeu a qualidade, considerando a possibilidade de seleção de bactérias psicotróficas proteolíticas, sendo necessários investimentos contínuos em boas práticas para prevenção da contaminação e do crescimento microbiano na cadeia produtiva do leite para reduzir problemas tecnológicos e econômicos na indústria de laticínios.

## CONCLUSÃO

A estocagem do leite cru refrigerado na indústria resultou em leite ácido, com CBT e contagem de psicotróficos acima dos limites máximos permitidos pela legislação brasileira. Os resultados indicaram más condições de higiene dos utensílios e equipamentos, além da temperatura e tempo de estocagem acima do limite máximo permitido pela legislação. Faz-se necessário que os órgãos responsáveis pela fiscalização atuem no monitoramento da qualidade do leite cru refrigerado recebido pelas indústrias de laticínios, para evitar problemas de saúde pública.

## REFERÊNCIAS

1. Pinto CLO, Martins ML, Vanetti MCD. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicotróficas proteolíticas. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2006; 26 (3): 645-51.

2. Apha – American Public Health Association. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4. ed. Washington: APHA; 2001.
3. Marshall RT. Standard Methods for the Examination of Dairy Products. 16 ed. American Public Health Association; 1992.
4. King EO, Ward MK, Raney DE. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J Lab Clin Med*. 1954; 44: 301-7.
5. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. Diário Oficial [da] União de 14/12/2006, Seção 1, Página 8 Brasília, DF, 2006. v. II, cap. 14, p. 1.
6. Ferreira DF. Sisvar: versão 4.3 (Build 43). Lavras: Departamento de Ciências Exatas, Universidade Federal de Lavras; 2003.
7. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa no 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova e Oficializa o Regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru refrigerado. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, n. 172, p. 13-22, 20 set. 2002. Seção I.
8. Ribas NP, Hartmann W, Monardes HG, Andrade UVC. Sólidos totais do leite em amostras de tanque nos Estados do Paraná, Santa Catarina e São Paulo. *Rev Bras Zootec*. 2004; 33 (6): 2343-50.
9. Bueno VFE, Mesquita AJ, Nicolau ES, Oliveira AN, Oliveira JP, Neves RBS, Mansur JRG, Thomaz LW. Contagem celular somática: relação com a composição centesimal do leite e período do ano no Estado de Goiás. *Ciênc Rural*. 2005; 35 (4): 848-54.
10. Andrews RJ, Kitchen BJ, Kwee WS. Relationship between individual cow somatic cell count and the mastitis infection status of the udder. *Austr J Dairy Technol*. 1983; 8: 71-4.
11. Machado PF, Pereira AR, Sarries GA. Composição do leite de tanques de rebanhos brasileiros distribuídos segundo sua contagem de células somáticas. *Rev Bras Zootec*. 2000; 29 (6): 1883-6.
12. Santos MV, Oliveira CAF, Lima YVR, Botaro BG. Remoção de células somáticas pela microfiltração não afeta a composição e a proteólise do leite. *Ciênc Rural*. 2006; 36 (5): 1486-93.
13. Antunes VC, Junior WMS, Valente PP, Barros AP, Conde CBC, Rosa R et al. Contagem Total de Microrganismos Mesófilos e de Psicrófilos no Leite Cru e Pasteurizado, Transportado via Latão ou Ganelizado. *Rev Inst Lat Cândido Tostes*. 2002; 57 (327): 199.
14. Arcuri EF, Silva PDL, Brito MAVP, Brito JRF, Lange CC, Magalhães MMA. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrófilas contaminantes de leite cru refrigerado. *Ciênc Rural*. 2008; 38 (8): 2250-5.
15. Martins ML, Pinto CLO, Vanetti MCD, Mezêncio JMS. Detecção de Proteases Bacterianas em Leite por Métodos Imunológicos. *Rev Inst Lat Cândido Tostes*. 2004; 59 (339): 61.
16. Murphy SC, Boor KJ. Trouble-shooting sources and causes of high bacteria counts in raw milk. *Dairy, Food Environm Sanit*. 2000; 20: 606-11.
17. Silva PHF. Leite UHT: Fatores determinantes para sedimentação e gelificação [tese de doutorado]. Lavras, Minas Gerais: Universidade Federal de Lavras, 2003. 147 pp.
18. Almeida AAP. Anais do XV Congresso Nacional de Laticínios. 1998; 53 (304): 26-9.
19. Guimarães JA. Programa nacional de melhoria da qualidade do leite. *Anais*; 1998: 95-153.
20. Sørhaug T, Stepaniak L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. *Trends in Food Sci Tech*. 1997; 8: 35-41.
21. Ravanis S, Lewis MJ. Observations on the effect of raw milk quality on the keeping quality of pasteurized milk. *Lett Appl Microbiol*. 1995; 20(3): 164-7.
22. Gomes, MIFV. Alterações na qualidade do leite pasteurizado pela ação de lipase microbiana. Piracicaba: ESALQ, 1988. 85p.

# Microrganismos indicadores de qualidade higiênico-sanitária em ostras (*Crassostrea gigas*) e águas salinas de fazendas marinhas localizadas na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina, Brasil

## Hygienic sanitary indicator microorganisms in oysters (*Crassostrea gigas*) and saline waters from sea farms in Baía Sul at Santa Catarina's Island, Brazil

RIALA6/1253

Roberta Juliano RAMOS<sup>1\*</sup>, Murilo Anderson PEREIRA<sup>1</sup>, Leticia Adélia MIOTTO<sup>1</sup>, Luiz Fernando Bleyer de FARIA<sup>1</sup>, Nelson SILVEIRA JUNIOR<sup>2</sup>, Cleide Rosana Werneck VIEIRA<sup>1</sup>

\*<sup>1</sup>Endereço para correspondência: Núcleo de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil. CEP 88040-900; (48) 37215379. email: robertajulianoramos@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Associação de Maricultores do Sul da Ilha (AMASI), Florianópolis, SC, Brasil

Recebido: 10.11.2009 – Aceito para publicação: 02.02.2010

### RESUMO

Esta investigação teve como objetivo efetuar o monitoramento da qualidade higiênico-sanitária em ostras (*Crassostrea gigas*) e águas salinas de fazendas marinhas da Baía Sul da Ilha de Santa Catarina, por meio de microrganismos indicadores, durante o período de um ano. As amostras de ostras e águas salinas foram submetidas a ensaios microbiológicos para enumeração de coliformes a 35°C, coliformes a 45°C e *Escherichia coli*. Foram avaliados os parâmetros físico-químicos de temperatura, salinidade, turbidez e pH nas águas e pH nas ostras. Foram observadas correlações positivas entre as contagens de coliformes a 35°C, coliformes a 45°C e *E. coli* nas amostras de águas salinas e de carne das ostras; e diferenças estatísticas significativas foram verificadas entre as contagens de coliformes a 45°C nas amostras de águas salina provenientes da região E. Os parâmetros físico-químicos apresentaram pouca ou nenhuma correlação estatística com as contagens bacteriológicas. Considerando-se a Baía Sul em toda sua extensão, observou-se a influência do índice pluviométrico sobre as contagens bacteriológicas obtidas nas águas e nas ostras. As contagens de coliformes a 45°C observadas nas águas salinas estavam de acordo com os parâmetros descritos na legislação brasileira, contudo, ressalta-se a importância da implantação de saneamento básico em regiões de cultivo de moluscos bivalves, assim como o constante monitoramento bacteriológico de indicadores de qualidade nas águas e nos moluscos.

**Palavras-chave.** microrganismos indicadores, água salina, ostras, coliformes a 45°C, *Escherichia coli*

### ABSTRACT

This investigation was conducted for one year in order to monitor the hygienic sanitary conditions of oysters (*Crassostrea gigas*) and saline waters from sea farms at the South Bay of Santa Catarina Island, by means of microorganism indicators. Oysters and saline waters samples were assayed by bacteria counting technique for coliforms at 35°C, coliforms at 45°C and *Escherichia coli*. Physical and chemical parameters were assessed in water samples (pH, salinity, turbidity and temperature) and oyster samples (pH). Positive correlations on coliform counts at 35°C and at 45°C, and *E. coli* were observed within saline waters and samples of oyster meat. Statistically significant differences on coliforms counting at 45°C were observed among saline water samples collected from the region E. Physical-chemical parameters showed somewhat no statistical correlation with microorganism counting. Nonetheless, the influence of rainfall indices in the Great Florianópolis region over the bacteriological counting in saline waters and oysters could be observed. The coliforms counting at 45°C in saline water samples complied with the parameters established by the Brazilian legislation, although the basic sanitation at bivalve shellfish growing sites and a regular bacteriological quality monitoring by using specific indicators are demanded for the culturing water and for growing oysters.

**Key words.** microorganisms indicator, saline water, oysters, coliforms at 45°C, *Escherichia coli*

## INTRODUÇÃO

Face ao grande declínio dos recursos pesqueiros costeiros, ocasionado principalmente pela intensa exploração, aliada à degradação ambiental, os mexilhões e as ostras garantem a subsistência de parte da população ligada à pesca artesanal, tanto em termos de consumo como de comércio, em vários estados litorâneos brasileiros<sup>1</sup>.

A maricultura vem sendo amplamente praticada no estado de Santa Catarina, e a liderança ocupada pelo estado na produção de ostras e mexilhões é justificada por dois fatores essenciais: existência de condições oceanográficas favoráveis aos cultivos, tais como: existência de inúmeras áreas protegidas formadas por baías, enseadas, estuários e íntima afinidade entre os produtores na grande maioria advindos da pesca artesanal<sup>2</sup>.

O município de Florianópolis é o maior produtor de ostras de Santa Catarina e, por conseguinte, do Brasil<sup>3</sup>. A safra 2006 foi responsável pela produção de 51,26% do total de ostras produzido em todo Estado, sendo que a Baía Sul responde por cerca de 90% do total produzido em Florianópolis, estando a maioria destes cultivos localizados no distrito do Ribeirão da Ilha<sup>4</sup>.

Essa considerável produção vem sendo comercializada para diferentes regiões do Brasil, e apesar do inegável potencial socioeconômico contido nestas experiências, o atual padrão de desenvolvimento acelerado e intensivo das práticas de maricultura no Estado não está isento de riscos, dentre os quais, a ameaça à saúde pública pelo fato dos cultivos serem realizados na ausência de um sistema realmente eficaz de monitoramento da qualidade das águas e dos produtos cultivados<sup>5</sup>.

Para que possa ganhar novos mercados, é indispensável um controle sanitário eficiente, incluindo monitoramento constante das águas de cultivo e dos moluscos cultivados, principalmente devido à característica filtradora dos moluscos bivalves, os quais se alimentam através de filtração branquial da água do mar, de onde retiram seu alimento do plâncton<sup>6</sup>. Dessa forma, os microrganismos presentes na água do mar são acumulados no interior do molusco, o que pode vir a representar um perigo quando os moluscos são coletados ou cultivados em locais que recebem efluentes, já que as bactérias e vírus dessa fonte contaminante são acumulados e, no interior do corpo dos moluscos, a concentração desses microrganismos torna-se muitas vezes superior à da água em que se encontram<sup>7</sup>.

Dentre os indicadores de qualidade higiênico-sanitários mais utilizados destacam-se o grupo dos coliformes

fecais e a *Escherichia coli*. Esses microrganismos fazem parte da microbiota do trato digestivo do homem e dos animais de sangue quente e são excretados em suas fezes, por este fato, a presença desses no ambiente pode indicar contaminação de origem fecal e risco de aparecimento de microrganismos patogênicos<sup>8</sup>. A correlação entre a presença de bactérias indicadoras e de diversos agentes patogênicos na água e nos moluscos bivalves tem sido bastante questionada. A concentração de microrganismos nos moluscos filtradores varia de um animal para outro e também depende de condições meteorológicas, da temperatura e da atividade geral do molusco<sup>9</sup>.

Esta pesquisa teve por objetivo monitorar microrganismos indicadores de qualidade higiênico-sanitária em ostras (*Crassostrea gigas*) e águas salinas de fazendas marinhas localizadas na Baía Sul da Ilha de Florianópolis, no estado de Santa Catarina, durante o período de um ano.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta de amostras

As amostras de ostras e de águas foram coletadas em seis diferentes regiões geográficas localizadas no distrito do Ribeirão da Ilha, onde está concentrado o maior número de cultivos de ostras: Caieira da Barra do Sul (27°48'84,9"S/48°33'98,1"W), Tapera do Ribeirão (27°46'98,9" S/48°34'31,8"W), Costeira do Ribeirão (27°44'35,0"S/48°33'89,0"W), Freguesia do Ribeirão (27°43'17,4"S/48°33'57,8"W), Barro Vermelho (27°42'11,1"S/48°33'33,7"W) e Tapera da Base Aérea (27°41'39,7"S/48°34'23,0"W), as quais foram identificadas, respectivamente, como pontos: A, B, C, D, E e F (Figura 1).



**Figura 1.** Localização dos pontos de coleta de ostras e águas nas seis diferentes regiões geográficas do distrito do Ribeirão da Ilha na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina

Foram coletadas 15 amostras de ostras e de água salina de cada região geográfica, sendo que 12 unidades de ostras e um litro de água constituíram cada amostra, respectivamente. As coletas foram realizadas entre os meses de março de 2006 e fevereiro de 2007. As amostras foram transportadas ao Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina em caixas isotérmicas contendo gelo potável, e as análises eram realizadas em até duas horas.

### Preparo das amostras

As ostras foram lavadas com escova sob água potável corrente e todo material aderido às conchas foi raspado e escovado sob água corrente, para então serem secas ao ar livre em bandeja plástica previamente desinfetada com álcool 70%. Foram então abertas com faca estéril e, o líquido intervalvar e a carne, transferidos assepticamente para saco estéril, constituindo o *pool* de cada amostra, que foram desintegrados em Bagmixer® (Interscience, France).

### Enumeração de Coliformes a 35°C, Coliformes a 45°C e *Escherichia coli* em ostras<sup>10</sup>

A enumeração de coliformes a 35°C, coliformes a 45°C e *Escherichia coli* foi realizada segundo American Public Health Association (APHA) 2001. Em uma alíquota de 25 g de amostra foram adicionados 225 ml água peptonada 0,1% e, posteriormente, desintegrada em homogeneizador *Bagmixer*. A partir dessa diluição ( $10^{-1}$ ), foram efetuadas as demais diluições decimais ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ), e 1 ml de cada diluição foi inoculado em cada tubo de uma série de três tubos contendo Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST-Oxoid®), e incubou-se a 35,0°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) por 48 horas. De cada tubo de LST com turvação e produção de gás, foram transferidos 100  $\mu\text{l}$  para tubos de Caldo Verde Brilhante 2% lactose (BVB-Oxoid®) e para tubos com Caldo *Escherichia coli* (EC-Oxoid®). Os tubos de BVB foram incubados a 35,0°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) por 48 horas e os tubos de EC em banho-maria a 45,0°C ( $\pm 0,5^\circ\text{C}$ ), por 48 horas. A partir dos tubos de EC com turvação e produção de gás, foi realizada inoculação em placas de Ágar Eosina Azul de Metileno (EAM-Oxoid®), incubando-as a 35,0°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) por 24 horas. As colônias típicas de *Escherichia coli* foram submetidas à série bioquímica: Indol, Vermelho de Metila, Voges Proskauer e Citrato (IMVIC). O resultado final de coliformes a 35°C e coliformes a 45°C foi expresso a partir da tabela do Número Mais Provável (NMP). As contagens

de *E. coli* foram realizadas a partir da confirmação das colônias isoladas no EAM, na série bioquímica do IMVIC, também expressos pela combinação de isolados positivos, através da tabela do NMP.

### Enumeração de Coliformes a 35°C, Coliformes a 45°C e *Escherichia coli* em águas salinas<sup>11</sup>

Para as amostras de água salina provenientes dos cultivos foi utilizada a técnica de cinco tubos múltiplos, descrita no Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater - APHA (2005). Onde se utiliza uma série de 5 tubos com Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST- Oxoid®) duplamente concentrado, seguida de duas séries de 5 tubos com LST em concentração normal, adicionando-se em cada série de 5 tubos 10, 1 e 0,1 mL da água salina, respectivamente. Os tubos de LST foram incubados a 35,0°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) por 48 horas, e aqueles com turvação e produção de gás foram repicados para tubos de Caldo Verde Brilhante 2% lactose (BVB-Oxoid®) e para tubos com Caldo *Escherichia coli* (EC-Oxoid®). Os tubos de caldo BVB foram incubados a 35,0°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) por 48 horas e os tubos de EC em banho-maria a 45,0°C ( $\pm 0,5^\circ\text{C}$ ) por 24 horas. A partir dos tubos de EC com turvação e produção de gás, foram realizadas inoculações em placas de Ágar Eosina Azul de Metileno (EAM-Oxoid®), as quais foram incubadas a 35,0°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) por 24 horas. As colônias típicas de *Escherichia coli* foram submetidas à série bioquímica: Indol, Vermelho de Metila, Voges Proskauer e Citrato (IMVIC). As contagens foram realizadas através da utilização da tabela do número mais provável (NMP) para séries de 5 tubos por diluição (10,0 ml, 1,0 ml e 0,1 ml).

### Determinação do pH em ostras

O pH das ostras foi verificado no *pool* de 12 ostras remanescentes de cada amostra com um medidor digital de pH da Quimis®, modelo Q-400A, e as leituras foram realizadas em triplicata.

### Parâmetros físico-químicos das águas salinas provenientes de cultivos

Os parâmetros físico-químicos das áreas de amostragem foram verificados *in situ*: temperatura (termômetro portátil de mercúrio com graduação de 0,5°C); turbidez (turbidímetro Plus Microprocessado Alkafit®), salinidade (salinômetro portátil modelo 211 Alkafit®). Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

A determinação do pH das águas salinas foi realizada imediatamente após a chegada das amostras ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos do CAL/

UFSC, em medidor digital de pH da marca Quimis®, modelo Q-400A, sendo esta realizada em triplicata.

### Índice pluviométrico

O índice pluviométrico na Grande Florianópolis foi avaliado a partir dos dados enviados pelo Centro de Informações de Recursos Ambientais e de Hidrometeorologia (CIRAM) da Epagri, da estação São José, que fica localizada a 27°35' S de latitude e 48°34' W de longitude, a uma altitude de 2 metros, próximo à Baía Norte da Ilha de Santa Catarina. Foi verificado tanto o acumulado pluviométrico mensal, como o acumulado pluviométrico na semana anterior a cada coleta, durante todo o período de monitoramento.

### Análise estatística dos dados

As análises estatísticas dos dados foram realizadas através da utilização do programa *Statistica 6.0*®. Os resultados das análises de coliformes a 35°C, coliformes a 45°C e *Escherichia coli*, tanto das águas salinas, quanto das ostras, foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, para comparação do nível de contaminação nas diferentes regiões ao longo de um ano. Havendo diferença estatística a um nível de 5%, foram aplicados testes de comparações múltiplas<sup>12</sup>, com  $\alpha = 0,05$ .

O estudo da existência de correlação entre os microrganismos da água de cultivo e da carne das ostras, assim como a correlação entre estes microrganismos e parâmetros físico-químicos, tanto nas águas salinas, como nas ostras, foi realizado através do teste não paramétrico de correlação de Spearman. A influência do acumulado pluviométrico mensal e acumulado pluviométrico da semana anterior à coleta nas contagens dos diferentes microrganismos nas águas salinas e carne de ostras, foram avaliados através da análise de regressão linear.

Para fins de cálculos estatísticos, sempre que os resultados obtidos na tabela do NMP foram  $< 3$  NMP/g, estes foram substituídos pelo número inteiro imediatamente inferior, ou seja, 2 NMP/g. Quando os resultados obtidos foram  $< 1,8$  NMP/100ml e  $> 1,6 \times 10^3$  NMP/100ml, estes foram substituídos pelo número decimal imediatamente inferior e superior, respectivamente.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Ensaio bacteriológico águas salinas

As contagens de coliformes a 35°C nas águas salinas variaram de  $< 1,8$  a  $> 1,6 \times 10^3$  NMP/100 ml, nas diferentes regiões de cultivo, sendo que nas regiões E, D e F foram

observadas as maiores contagens, respectivamente, tanto em relação à média geométrica, quanto ao percentil 90. Foram encontradas diferenças estatísticas significativas nas contagens estimativas nas diferentes regiões, como mostra a tabela 1.

Embora o monitoramento de coliformes a 35°C não esteja contemplado na legislação brasileira em vigor, Resolução CONAMA 357/2005<sup>13</sup>, se avaliássemos as regiões de cultivo em estudo, com base no National Shellfish Sanitation Program (NSSP) do FDA/US<sup>14</sup>, onde a média geométrica de coliformes a 35°C de 15 amostras coletadas no mesmo ponto não deverá ultrapassar  $7,0 \times 10$  NMP/100ml, com não mais de 10% das amostras excedendo a  $2,3 \times 10^2$  NMP/100ml, teríamos todas as regiões deste estudo, aprovadas para o cultivo de moluscos bivalves.

Correlacionando as contagens de coliformes a 35°C com temperatura, salinidade, turbidez e pH, observaram-se que a temperatura e o pH não apresentaram correlação estatística com a contagem de coliformes a 35°C, enquanto a salinidade apresentou uma fraca correlação negativa (Spearman  $R = -0,22$ ;  $p = 0,036$ ), e a turbidez uma fraca correlação positiva (Spearman  $R = 0,34$ ;  $p = 0,001$ ).

Através da análise de regressão linear, foi possível observar que a contagem média de coliformes a 35°C nas águas, considerando a Baía Sul como um todo, foi influenciada, tanto pelo acumulado pluviométrico mensal ( $\beta = 0,678$ ;  $p < 0,05$ ), quanto pelo acumulado pluviométrico da semana anterior a coleta ( $\beta = 0,612$ ;  $p < 0,05$ ).

As contagens de coliformes a 45°C nas águas das diferentes regiões da Baía Sul oscilaram entre  $< 1,8$  e  $9,2 \times 10^2$  NMP/100 ml, sendo que as regiões E, D e F, assim como nas contagens de coliformes a 35°C, apresentaram as maiores médias geométricas de contaminação, e os maiores percentis 90, respectivamente (Tabela 1), embora todas as regiões tenham apresentado médias de contagens de coliformes a 45°C e percentis 90, abaixo dos limites máximos estabelecidos, atendendo a legislação em vigor no Brasil<sup>13</sup>, a qual estabelece que a média geométrica não deva exceder a  $4,3 \times 10$  NMP/100mL, e o percentil 90% não deverá ultrapassar  $8,8 \times 10$  NMP/100mL de coliformes termotolerantes, de um mínimo de 15 amostras. Estudo<sup>15</sup> realizado na Costeira do Ribeirão, durante os anos de 2001 a 2006, encontraram médias geométricas de coliformes a 45°C bastante baixas, variando de 2,2 a 4,5 NMP/100mL e percentil 90% não ultrapassando  $1,7 \times 10$  NMP/100mL. Em outro estudo<sup>16</sup>, monitorando a qualidade das águas em cultivos de moluscos no litoral de São Paulo, também foram encontradas contagens de coliformes a 45°C mais baixas que no presente estudo, as quais oscilaram entre  $< 3,0$  e  $4,6 \times 10^2$  NMP/100 ml.

**Tabela 1.** Contagens de Coliformes a 35°C, Coliformes a 45°C e *Escherichia coli* nas águas salinas durante as 15 coletas nas diferentes regiões de cultivo da Baía Sul

REGIÃO CULTIVO	COLIFORMES A 35°C		COLIFORMES A 45°C		<i>Escherichia coli</i>	
	Média Geométrica (NMP/100 ml)*	Percentil 90 (NMP/100 ml)*	Média Geométrica (NMP/100 ml)*	Percentil 90 (NMP/100 ml)*	Média Geométrica (NMP/100 ml)*	Percentil 90 (NMP/100 ml)*
A	2,4 <sup>a</sup>	4,5	2,2 <sup>a</sup>	4,5	1,8 <sup>a</sup>	2,0
B	3,3 <sup>ab</sup>	17,0	2,9 <sup>ab</sup>	13,0 <sup>a</sup>	2,6 <sup>a</sup>	7,8
C	2,9 <sup>a</sup>	11,0	2,4 <sup>a</sup>	6,8	2,4 <sup>a</sup>	4,5
D	12,5 <sup>bc</sup>	130,0	5,3 <sup>ab</sup>	49,0	3,4 <sup>a</sup>	49,0
E	31,5 <sup>c</sup>	220,0	9,4 <sup>b</sup>	79,0	5,4 <sup>a</sup>	33,0
F	11,2 <sup>abc</sup>	130,0	3,5 <sup>ab</sup>	17,0	3,0 <sup>a</sup>	6,8

Nota: \*NMP/100 ml = Número mais provável em 100 ml

Médias que não possuem letras em comum entre si na mesma coluna, apresentaram diferença estatística ao nível de 5% ( $p < 0,05$ )

Foi observada uma diferença estatística entre no nível de contaminação da região mais contaminada, região E, e regiões menos contaminadas, região A e C, a um nível de significância de 5%. É possível que a região E apresente contagens superiores tanto de coliformes a 35°C como a 45°C, por se encontrar em uma região geográfica que não permite uma circulação eficiente das águas onde os moluscos são cultivados, dificultando, caso estejam ocorrendo despejos de esgoto doméstico e outros dejetos, que estes se diluam rapidamente.

No mês de novembro de 2006 foram registradas as maiores contagens, tanto de coliformes a 35°C, quanto de coliformes a 45°C, sendo que neste mês foi registrado o maior acumulado pluviométrico mensal, totalizando 246 mm<sup>3</sup>, destes 101,3 mm<sup>3</sup> registrados na semana anterior a coleta. Na análise de regressão linear, a média das contagens de coliformes a 45°C nas águas, considerando a Baía Sul como um todo, foi influenciada tanto pelo acumulado pluviométrico mensal ( $\beta = 0,714$ ;  $p < 0,05$ ), quanto pelo acumulado pluviométrico na semana anterior a coleta ( $\beta = 0,657$ ;  $p < 0,05$ ), conforme pode ser observado na Figura 2.

Correlacionando as contagens de coliformes a 45°C com temperatura, salinidade, turbidez e pH, observou-se que a salinidade e o pH não apresentaram correlação estatística com as contagens de coliformes a 45°C, enquanto a temperatura (Spearman  $r = 0,20$ ;  $p < 0,05$ ) e a turbidez (Spearman  $r = 0,26$ ;  $p < 0,05$ ) apresentaram uma fraca correlação positiva.

As contagens de *Escherichia coli* nas amostras de água de cultivo variaram entre  $< 1,8$  e  $7,9 \times 10$  NMP/100 ml, sendo que não houve diferença estatística entre as contagens nas diferentes regiões de estudo ( $H=10,74573$ ;

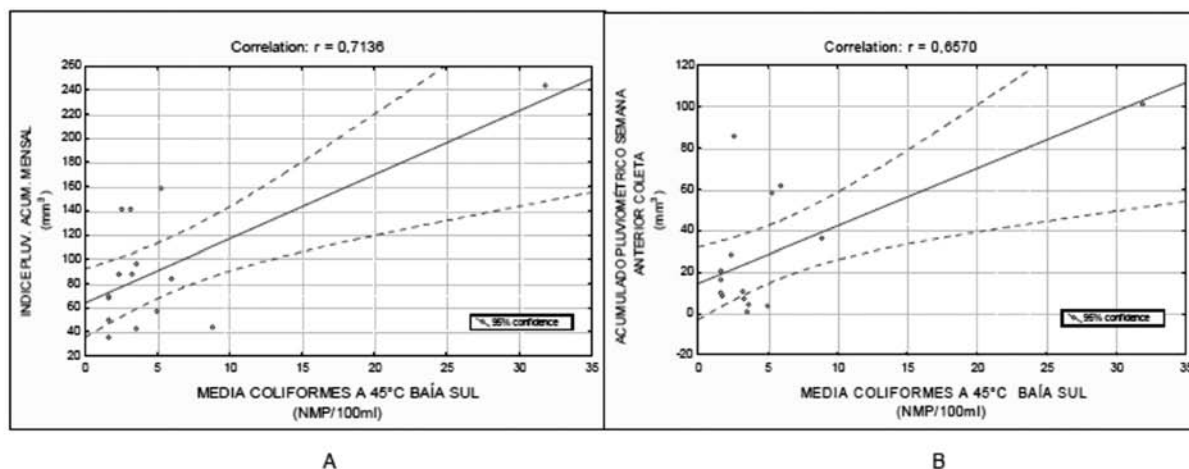
$p > 0,05$ ). As regiões E, D e F apresentaram as maiores médias geométricas de *E. coli*, assim como foi observado para coliformes a 35°C e coliformes a 45°C, e os maiores percentis 90 foram observados nas regiões D e E (tabela 1). Miotto, (2009)<sup>17</sup>, monitorando os mesmos pontos de coleta deste estudo, entre os anos de 2008 e 2009, obteve contagens de *E. coli* nas águas marinhas que variaram entre  $< 1,8$  a  $2,2 \times 10^2$  NMP/100mL, encontrando uma diferença estatística significativa entre as regiões com as maiores (E) e menores contagens (A), provavelmente devido a este ter sido um período atípico, com chuvas bem acima da média, aumentando, assim, a contaminação nas águas da Baía Sul.

Foram encontradas correlações positivas, tanto entre contagens de coliformes a 35°C e *E. coli* (Spearman  $R = 0,66$ ;  $p < 0,001$ ), como entre contagens de coliformes a 45°C e *E. coli* (Spearman  $R = 0,86$ ;  $p < 0,001$ ), o que já era esperado, visto que *E. coli* é principal bactéria do grupo dos coliformes a 45°C. Não foram observadas correlações estatísticas entre as contagens de *Escherichia coli* e temperatura, salinidade e pH das águas onde os moluscos são cultivados, apenas a turbidez apresentou uma fraca correlação positiva (Spearman  $R = 0,28$ ;  $p < 0,05$ ).

#### Ensaio bacteriológico ostras

As contagens de coliformes a 35°C nas amostras de ostras variaram de  $< 3,0$  a  $2,5 \times 10^2$  NMP/g, sendo que as ostras provenientes das regiões E, D e F apresentaram as maiores médias geométricas de contaminação (Tabela 2), respectivamente, assim como foi observado nas águas onde os moluscos são cultivados.





**Figura 2.** Correlação bivariada entre contagens de coliformes a 45°C nas águas da Baía Sul e: acumulado pluviométrico mensal na região da grande Florianópolis (A); acumulado pluviométrico na semana anterior a coleta na região da grande Florianópolis (B)

Outro estudo<sup>18</sup>, avaliando ostras *Crassostrea gigas* provenientes de três regiões de cultivo de Florianópolis, Santa Catarina, foram obtidas contagens entre  $< 3,0$  e  $> 1,1 \times 10^3$  NMP/g, no entanto, considerando apenas a região do Ribeirão da Ilha, mesma região deste estudo, as contagens foram mais baixas, oscilando entre  $< 3,0$  e  $1,5 \times 10^2$  NMP/g, valores estes, semelhantes aos encontrados neste estudo. Enquanto em estudo avaliando ostras *Crassostrea gigas* cultivadas no Alasca<sup>19</sup>, foi observada uma menor amplitude de contaminação, com contagens de coliformes a 35°C entre  $< 3,0$  e  $3,0 \times 10$  NMP/g.

Segundo Galvão<sup>20</sup>, embora a atual legislação vigente no Brasil, RDC 12/2001 – ANVISA<sup>21</sup> não apresente padrão de coliformes a 35°C para este tipo de alimento, a pesquisa deste grupo permite que se tenham dados sobre a qualidade higiênico-sanitária destes, visto que a contagem de coliformes totais corresponde ao total dos microrganismos Gram-negativos, fermentadores de lactose, da família *Enterobacteriaceae* encontrados em uma amostra.

Não foram observadas diferenças estatísticas entre as médias de contaminação das ostras provenientes das diferentes regiões de estudo, embora as maiores médias de contaminação tenham sido observadas nas regiões E, D e F (tabela 2). Isto também pode ser observado em relação ao percentil 90.

Foi observada uma correlação positiva entre as contagens de coliformes a 35°C nas águas onde os moluscos são cultivados e nas ostras (Spearman  $r = 0,51$ ;  $p < 0,05$ ), o que ressalta a importância do monitoramento da qualidade das águas onde são cultivados os moluscos bivalves.

Não foi observada correlação estatística entre contagens de coliformes a 35°C nas ostras e parâmetros

físico-químicos de temperatura (Spearman  $r = -0,01$ ;  $p > 0,05$ ), salinidade (Spearman  $r = -0,06$ ;  $p > 0,05$ ) e turbidez (Spearman  $r = 0,06$ ;  $p > 0,05$ ).

As contagens de coliformes a 45°C nas ostras variaram de  $< 3,0$  a  $8,0 \times 10$  NMP/g, sendo que 77% das amostras apresentaram contagens de  $< 3,0$  NMP/g. A maior contagem foi observada no mês de dezembro, na região B, no entanto, a região E apresentou a maior média geométrica de coliformes a 45°C em relação às outras regiões (Tabela 2).

Estudo monitorando a qualidade de mexilhões *Perna perna* cultivados no litoral de São Paulo<sup>20</sup>, encontrou contagens de coliformes a 45°C que variaram de  $3,2$  a  $3,3 \times 10^2$  NMP/g, valores estes superiores aos encontrados neste estudo. Em outro estudo<sup>18</sup>, considerando apenas a área de cultivo do Ribeirão da Ilha, mesma região deste estudo, foram observados níveis de contaminação em ostras *Crassostrea gigas* muito semelhantes aos obtidos neste estudo, com contagens que oscilaram entre  $< 3,0$  e  $9,3 \times 10$  NMP/g, sendo que 73% das amostras apresentaram contagens  $< 3,0$  NMP/g.

Não foram observadas diferenças estatísticas nas médias de contaminação das diferentes regiões de cultivo da Baía Sul, como pode ser observado na Tabela 2. Assim como a maior média geométrica, a região E apresentou o maior percentil 90.

Foi observada uma correlação estatística positiva entre as contagens de coliformes a 45°C na água de cultivo e nas ostras (Spearman  $r = 0,53$ ;  $p < 0,001$ ). No entanto, nas coletas em que foram obtidas as maiores contagens de coliformes a 45°C nas ostras, as águas salinas apresentaram contagens inferiores às observadas na carne dos moluscos. A alimentação por filtração

**Tabela 2.** Contagens de Coliformes a 35°C, Coliformes a 45°C e *Escherichia coli* em ostras durante as 15 coletas nas diferentes regiões de cultivo da Baía Sul

REGIÃO CULTIVO	COLIFORMES A 35°C		COLIFORMES A 45°C		<i>Escherichia coli</i>	
	Média Geométrica (NMP/g)*	Percentil 90 (NMP/g)*	Média Geométrica (NMP/g)*	Percentil 90 (NMP/g)*	Média Geométrica (NMP/g)*	Percentil 90 (NMP/g)*
A	2,1 <sup>a</sup>	2,5	2,1 <sup>a</sup>	2,5	2,0 <sup>**</sup>	< 3,0
B	3,1 <sup>a</sup>	5,5	2,7 <sup>a</sup>	4,0	2,2 <sup>a</sup>	4,0
C	2,4 <sup>a</sup>	6,5	2,1 <sup>a</sup>	3,0	2,1 <sup>a</sup>	< 3,0
D	4,2 <sup>a</sup>	9,5	2,6 <sup>a</sup>	6,0	2,4 <sup>a</sup>	5,5
E	6,3 <sup>a</sup>	48,5	4,3 <sup>a</sup>	23,5	2,6 <sup>a</sup>	6,5
F	3,8 <sup>a</sup>	16,0	2,7 <sup>a</sup>	6,5	2,4 <sup>a</sup>	< 3,0

Nota: \*NMP/g = Número mais provável por grama; \*\*Não foi isolada nenhuma cepa de *E. coli*  
Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não apresentam diferença estatística a um nível de 5% ( $p > 0,05$ )

efetuada pelas ostras concentra os coliformes presentes no ambiente marinho. Um fator que pode explicar este fato é que os patógenos e indicadores bacterianos podem sobreviver mais tempo em bivalves do que em água do mar, além disso, nos bivalves eles podem se reproduzir<sup>22</sup>.

Não foram observadas correlações estatísticas entre parâmetros físico-químicos e contagens de coliformes a 45°C nas ostras, como temperatura (Spearman  $r = 0,12$ ;  $p > 0,05$ ), salinidade (Spearman  $r = - 0,02$ ;  $p > 0,05$ ) e turbidez (Spearman  $r = - 0,01$ ;  $p > 0,05$ ). Em estudo<sup>23</sup>, avaliando ostras e águas oriundas do estuário do Rio Cocó, no estado do Ceará, Brasil, também não foram encontradas correlações estatísticas significativas entre parâmetros físico-químicos (temperatura, salinidade e pH) e concentrações de coliformes totais (35°C) e coliformes fecais (45°C) em amostras de ostras. Segundo a análise de regressão linear múltipla, o acumulado pluviométrico mensal apresentou uma influência significativa ( $\beta = 0,537$ ;  $p < 0,05$ ) nas contagens de coliformes a 45°C nas ostras.

Visto que a bactéria *E. coli* é melhor indicador de contaminação fecal que os outros gêneros e espécies do grupo dos coliformes, é desejável a determinação de sua incidência em uma população de coliformes<sup>24</sup>. As contagens de *E. coli* obtidas nas ostras provenientes das seis diferentes regiões foram baixas, variando entre < 3,0 e 2,6 x 10 NMP/g, sendo que 86% (77/90) das contagens tiveram como resultado < 3,0 NMP/g. Em estudo realizado no Alasca<sup>19</sup> monitorando a qualidade de ostras *Crassostrea gigas* cultivadas naquela região dos EUA, a

contagem de *E. coli* nas ostras oscilou entre < 3,0 e 2,3 x 10 NMP/g, resultados muito semelhantes aos obtidos no presente estudo.

A maior contagem de *E. coli* nas ostras foi observada no mês de novembro, na região F, mesmo mês em que foram observados os maiores níveis de contaminação nas águas dos cultivos, e registrado o maior acumulado pluviométrico, tanto mensal como na semana anterior à coleta. A região que apresentou a maior média geométrica de *E. coli* nos moluscos, assim como para coliformes a 35°C e coliformes a 45°C, foi a região E, seguida da região D e F, enquanto na região A, todas contagens obtiveram como resultado < 3,0 NMP/g. Não foi observada diferença estatística entre as médias de contaminação por *E. coli* nas ostras provenientes das diferentes regiões de estudo (tabela 2). Assim como as médias geométricas, os maiores percentis 90 foram observados nas regiões E e D.

Foi observada uma correlação estatística positiva entre as contagens de *E. coli* nas águas e nas ostras provenientes das diferentes regiões de cultivo (Spearman  $r = 0,41$ ;  $p < 0,05$ ).

Em relação aos parâmetros físico-químicos não foi observada correlação estatística entre contagens de *E. coli* nas ostras e temperatura da água de cultivo (Spearman  $r = - 0,05$ ;  $p > 0,05$ ), turbidez (Spearman  $r = 0,10$ ;  $p > 0,05$ ), no entanto foi observada uma fraca correlação negativa com o parâmetro salinidade (Spearman  $r = - 0,25$ ;  $p < 0,05$ ), diferente do que foi observado nas águas onde os moluscos são cultivados, onde a salinidade não apresentou correlação com *E. coli*. Através da análise de regressão linear múltipla,

analisando a influência da chuva na contaminação por *E. coli* em ostras da Baía Sul, foi observada uma influência significativa, tanto do acumulado pluviométrico mensal ( $\beta = 0,63$ ;  $p < 0,05$ ), como do acumulado pluviométrico na semana anterior a coleta ( $\beta = 0,62$ ;  $p < 0,05$ ).

### pH das ostras

A diminuição do pH da carne de ostras está diretamente relacionado ao processo de deterioração destes moluscos. Segundo Cook<sup>25</sup>, um pH acima de 6,0 para carne das ostras é considerado adequado, e para ostras do Pacífico (*Crassostrea gigas*) vivas têm sido observado um pH de 6,5. Os valores de pH observados nas ostras deste estudo variaram entre 5,7 e 6,6, sendo o pH médio observado de 6,1. O Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA<sup>26</sup> não estabelece limites de pH para moluscos, apenas para peixes. Galvão<sup>27</sup> ressalta a necessidade de estudos específicos quanto aos limites de pH para moluscos bivalves, visto que estes apresentam composição centesimal diversificada quando comparada a outras espécies de pescado, apresentando um outro padrão de decomposição e alteração do pH.

Monitorando a qualidade de ostras (*Crassostrea gigas*) cultivadas no Alasca<sup>19</sup>, nos Estados Unidos, durante o período de um ano, foram observados valores de pH entre 6,6 e 6,9, apresentando uma alteração menor que 0,4, durante todo o ano, enquanto no presente estudo encontramos diferenças de até 0,9 ao longo do ano. Não foram observadas diferenças estatísticas, a um nível de significância de 5%, entre as médias de pH das ostras nas diferentes regiões de cultivo.

### pH das águas salinas

A amplitude de pH observada nas águas da Baía Sul foi de 7,9 a 8,3, estando estes valores em acordo com os valores estabelecidos na legislação vigente, Resolução CONAMA 357/2005, para águas salinas de classe I, as quais devem ter um pH entre 6,5 - 8,5 não devendo ultrapassar 0,2 unidades<sup>13</sup>.

O pH médio nas águas da Baía Sul durante o período de monitoramento foi de 8,1, estando de acordo com os resultados encontrados em outro estudo<sup>3</sup>, que encontraram um pH em torno de 8,0 nas três regiões de estudo, sendo uma delas localizada nesta mesma baía. Não foi observada diferença estatística significativa entre as médias de pH nas seis diferentes regiões ( $p > 0,05$ ).

Em outro estudo<sup>28</sup> que avaliou parâmetros físico-químicos em cinco diferentes regiões de cultivo

de moluscos da Grande Florianópolis (Sambaqui, Santo Antônio, Ribeirão da Ilha, Enseada e Pinheira), também foi encontrado um pH médio de 8,1 nas águas. Enquanto estudo avaliando águas de cultivos de ostras em Laguna Madre, no México<sup>29</sup>, encontraram um pH constante e ligeiramente básico, em torno de 8,1 em todo estudo, mesma média obtida neste estudo.

## CONCLUSÃO

As águas salinas destinadas ao cultivo de ostras (*Crassostrea gigas*), nas diferentes regiões da Baía Sul da Ilha de Santa Catarina, apresentaram contagens bacteriológicas de coliformes a 35°C, coliformes a 45°C e *Escherichia coli* pertinentes a águas destinadas ao cultivo de moluscos bivalves, ou seja, atendendo a legislação brasileira, estando, portanto, todas as regiões aptas, durante o período de estudo, para o desenvolvimento desta atividade.

A qualidade bacteriológica das ostras (*Crassostrea gigas*) refletiu a qualidade das águas, enfatizando a importância de um programa de monitoramento contínuo da qualidade bacteriológica das águas e moluscos cultivados. Cabe salientar que os indicadores higiênico-sanitários monitorados neste estudo, apresentam uma relação direta com bactérias patogênicas de origem fecal, no entanto, tratando-se de moluscos bivalves, deve-se considerar também o controle de algumas espécies de vibrios patogênicos, que podem estar naturalmente presentes em ambientes marinhos, sem que apresentem nenhuma relação com contaminação de origem fecal.

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq SECIS/MCT, CT-Agro e CT-Hidro, pelo financiamento do Projeto: “Monitoramento higiênico-sanitário das águas de cultivo e de moluscos marinhos produzidos na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina” e pela concessão da bolsa de mestrado.

## REFERÊNCIAS

1. Valle RP, Proença CEM. Evolução e perspectivas da aquíicultura no Brasil. In: Valenti WC, Poli CR, Pereira JA, Borghetti JR editores. Aquíicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável. c. 13. p. 383-98. Brasília: CNPq / Ministério da Ciência e Tecnologia, 2000.

2. Coelho C, Heinert AP, Simões CMO, Barardi CRM. Hepatitis A virus detection in oysters (*Crassostrea gigas*) in Santa Catarina State, Brazil, by reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Food Prot*. 2003; 66(3): 507-11.
3. Souza Filho J. Custo de produção da ostra cultivada. Florianópolis: Instituto Cepa/SC. Cadernos de indicadores agrícolas, 2003: 23 p.
4. Oliveira Neto FM. Síntese informativa da produção de moluscos (mexilhões, ostras e vieiras) no estado de Santa Catarina em 2006 – Epagri/Cedap. Florianópolis, 2007. [online] disponível na internet via <http://www.epagri.rct-sc.br/> Acesso em 05/05/2007.
5. Curtius AJ, Seibert EL, Fiedler HD, Ferreira FF, Vieira PHF. Avaliando a contaminação por elementos traço em atividades de maricultura: Resultados parciais de um estudo de caso realizado na Ilha de Santa Catarina, Brasil. *Quím Nova*. 2003; 26: 44-52.
6. Rupp GS. Introdução à biologia das ostras. In: Ferreira, J.F. Cultivo de ostras. Laboratório de cultivo de moluscos marinhos. 1999. 64p.
7. Corrêa AA, Albarnaz JD, Moresco V, Poli CR, Teixeira AL, Simões CMO, Barardi CRM. Depuration dynamics of oysters (*Crassostrea gigas*) artificially contaminated by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mar Environ Res*. 2007; 63: 479-89.
8. Pitta MS. Tendência actual del estreptococo como indicador de contaminação fecal. *Rev Cuba Hig Epidemiol*. 2002; 40(1): 38-43.
9. Huss HH, Reilly A, Embarek PKB. Prevention and control of hazards in seafood. *Food Control*. 2000; 11:149-56.
10. American Public Health Association (APHA). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4th ed. Washington. 2001;1219p.
11. American Public Health Association (APHA). Microbiological Examination. In: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21st ed. Washington: APHA, AWWA, WEF; 2005. 1336p.
12. Campos H. Estatística Experimental Não paramétrica. 4a ed. Piracicaba: ESALQ-USP; 1983. 349 p.
13. Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Diário Oficial [da] União. Brasília, DF, 18 mar. 2005.
14. United States. Food and Drug Administration. Center of Food Safety & Applied Nutrition (US FDA/CFSAN). National shellfish sanitation program model ordinance. 2005; 4. Available from: [www.cfsan.fda.gov/~ear/nss3-toc.html](http://www.cfsan.fda.gov/~ear/nss3-toc.html).
15. Silveira Jr N, Almeida MCC, Brognoli FF, Couto FR, Fischer CE. Classificação de águas de cultivo de moluscos marinhos quanto a coliformes termotolerantes a 45°C na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina. XII Congresso Latino-Americano de Ciências do Mar, Florianópolis, 2007.
16. Furlan EF. Vida útil dos mexilhões *Perna perna* cultivados no litoral norte de São Paulo: aferição dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos. [dissertação de mestrado]. São Paulo: Escola Superior de Agricultura “Luís de Queiroz” - Universidade de São Paulo. 2004. 106 pp.
17. Miotto LA. Coliformes termotolerantes e *Enterococcus* sp em ostras e águas salinas utilizadas para cultivo de moluscos bivalves na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina – Brasil. [dissertação de mestrado]. Florianópolis: Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos - Universidade Federal de Santa Catarina 2009. 106 pp.
18. Pereira MA, Nunes MM, Nueremberg L, Schulz D, Batista CRV. Microbiological quality of oysters (*Crassostrea gigas*) produced and commercialized in the coastal region of Florianopolis-Brazil, Braz *J Microbiol*. 2006; 37(2):159-63.
19. Oliveira ACM et al. Quality of Alaskan mariculture oysters (*Crassostrea gigas*): a one-year survey. *J Food Sci*. 2006; 71(9): 532-43.
20. Galvão JA. Qualidade microbiológica da água de cultivo e de mexilhões *Perna perna* (Linnaeus, 1758) comercializados em Ubatuba. [dissertação de mestrado]. São Paulo: Escola Superior de Agricultura “Luís de Queiroz” - Universidade de São Paulo. 2004. 109 pp.
21. Brasil. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico princípios gerais para estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos e seus anexos I, II e III. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 10 jan. 2001.
22. Solic M, Krstulovic N, Jozic S, Curac D. The rate of concentration of termotolerant coliforms in shellfish under different environmental conditions. *Environ Int*. 1999; 25(8): 991-1000.
23. Silva AIM, Vieira RHSE, Menezes FGR, Fonteles-Filho AA, Torres RCO, Sant’Anna ES. Bactérias de origem fecal contaminantes de ostra *Crassostrea rhizophorae*, oriundas do estuário do Rio Cocó, Estado do Ceará, Brasil. *Braz J Microbiol*. 2003; 35(1-2): 126-30.
24. Jay JM. Microbiologia de Alimentos. 6º Ed.. Porto Alegre: Ed. Artmed. 2005. 711p.
25. Cook, DW. Microbiology of bivalves molluscan shellfish. In: Ward, D.R.; Hackney, C.(ed). Microbiology of marine food products. New York: Van Nostrand Reinhold, USA, 1991, p19-34.
26. Brasil. Ministério da Agricultura. Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal RIISPOA. Brasília, DF, 1980. 165 p.
27. Galvão JA, Furlan EF, Salán EO, Porto E, Oetterer M. Características físico-químicas e microbiológicas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*) da água e dos mexilhões cultivados na região de Ubatuba, SP. *Ciênc Agrotec*. 2006; 30(6): 1124-9.
28. Ferreira JF, Besen K, Wormsbecher AG, Santos RF. Physical-chemical parameters of seawater mollusc culture sites in Santa Catarina-Brazil. *J Coast Res*. 2004; 39(1): 1122-6.
29. Téllez SJ, Oliva M, Ramírez de Leon JA, Vázquez M. Evaluación de la calidad microbiológica del ostión de “La laguna madre” de Tamaulipas (México). *Cienc Tecnol Aliment*. 1999; 2(3): 152-7.

## Evolução da microbiota contaminante em linha de processamento de queijos Minas frescal e ricota

### Evolution of microbial contaminants in the processing line of Minas frescal and ricotta cheeses

RIALA6/1254

Vidiany Aparecida Queiroz SANTOS<sup>1\*</sup>, Fernando Leite HOFFMANN<sup>1</sup>

\*<sup>1</sup>Endereço para correspondência: Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, IBILCE, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Rua Cristóvão Colombo nº 2265, Bairro Jardim Nazareth, CEP: 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brasil. email: vidianyqueiroz@yahoo.com.br

Recebido: 05.10.2009 – Aceito para publicação: 06.03.2010

#### RESUMO

Queijos frescos como o Minas frescal e a ricota são excelentes meios para a proliferação de microbiota indesejável, prejudicando a qualidade e a integridade destes produtos. Nesse contexto, este estudo objetivou avaliar a evolução da microbiota contaminante em linha de processamento de queijos Minas frescal e ricota, de uma indústria de laticínios localizada no município de São José do Rio Preto-SP. As análises foram realizadas nas seguintes etapas: água, leite pasteurizado, coalho, massa, soro, superfície palmar dos manipuladores e tanque de coagulação, e queijos nos tempos zero e cinco dias de vida de prateleira. Tais etapas foram monitoradas por meio da determinação do NMP de coliformes totais e termotolerantes; contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva e bactérias aeróbias mesófilas; pesquisa de *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*. Foram avaliadas doze amostras em cada uma das etapas. Das amostras de água, observou-se que três das amostras apresentaram valores acima do estabelecido para bactérias aeróbias mesófilas. Três amostras de leite apresentaram-se em desacordo para coliformes termotolerantes. As amostras de massa, coalho e soro apresentaram reduções nas contagens para todos os microrganismos. A superfície palmar e tanque de coagulação apresentaram baixas contagens para todos os bioindicadores. Os queijos apresentaram inconformidade para *Staphylococcus* coagulase positiva. Todas as amostras de leite apresentaram conformidade quanto à fosfatase/peroxidase.

**Palavras-chave.** bioindicadores, queijo Minas frescal, ricota, fosfatase/peroxidase.

#### ABSTRACT

Fresh cheeses such as Minas frescal and ricotta are excellent means for undesirable microorganisms to thrive, damaging quality and wholesomeness of these products. In this context, this study aimed at evaluating the contaminating microorganisms in the processing line of fresh cheese, namely Minas frescal and ricotta, of a dairy plant nestled in the city of São José do Rio Preto-SP. The analyses were carried out with the following steps: water, pasteurized milk, curd, mass, whey, palmar surface and coagulation tank, and cheeses with zero and five days of shelf life. Such steps were monitored by determining the MLN of total coliforms and thermotolerants; counting of coagulase-positive *Staphylococcus* and mesophilic aerobic bacteria; search of *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes*. Twelve samples were evaluated in each step. Among the water samples, three are provided with higher values than the ones recommended in terms of mesophilic aerobic bacteria. Three milk samples did not comply with thermotolerant coliforms. The mass samples, curd and whey showed a decrease in the counting for all microorganisms. Both palm surface and coagulation tank showed low counting for all bioindicators. All milk samples showed compliance regarding phosphatase/peroxidase.

**Key words.** bioindicators, Minas frescal, ricotta cheese, phosphatase/peroxidase.

## INTRODUÇÃO

No Brasil, o setor laticinista tem grande importância socioeconômica, em especial na fabricação de queijos, ocupando o sexto lugar em produção mundial. De toda a produção anual, a maior parte é considerada de consumo popular, destacando-se os queijos Minas, mussarela, ricota, prato e parmesão<sup>1</sup>.

Os queijos Minas frescal e ricota são produtos altamente consumidos no Brasil, devido ao reduzido teor de gordura e baixo custo que apresentam, sendo muito indicados em dietas com restrições a lipídios<sup>2</sup>.

Segundo a Associação Brasileira das indústrias de queijos - ABIQ, em 2008 a produção de queijo Minas frescal foi de toneladas e para ricota a produção atingiu 10.500 toneladas<sup>3</sup>.

O queijo Minas frescal é tipicamente brasileiro e sua produção ocorre pela coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácticas específicas<sup>4,5</sup>.

A ricota é de origem italiana, constituída basicamente de lactalbumina e lactoglobulina, proteínas essenciais para a melhoria do sistema imunológico. Apresenta ainda, teores reduzidos de gordura e sal<sup>6</sup>. A manufatura da ricota ocorre utilizando-se como matérias-primas as proteínas do soro do leite e leite fresco pasteurizado, os quais são submetidos a tratamento térmico e acidificação<sup>7</sup>.

Estes queijos, por apresentarem elevada umidade e alto teor de nutrientes, têm elevado potencial em sofrer deteriorações/contaminações de origem microbiana, podendo causar toxinfecções de origem alimentar graves. Os principais bioindicadores de contaminação presentes nesses tipos de queijos, incluem microrganismos do grupo dos coliformes, bactérias como *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, e ainda, leveduras e alguns bolores<sup>8,9</sup>.

A presença desses microrganismos no alimento, está relacionada à má qualidade da matéria-prima e adoção de técnicas higiênicas inadequadas, que comprometem a segurança do produto final<sup>10,11</sup>.

Conforme o exposto e levando-se em conta o importante papel das microindústrias produtoras de queijos como fonte de geração de empregos em todo o país e ainda a popularidade destes queijos entre os consumidores, associada às excelentes características

destes queijos para o desenvolvimento microbiano, torna-se importante a avaliação de adequações e adoção de ações corretivas durante as etapas de fabricação, o que consequentemente refletirá na qualidade microbiológica e físico-química dos mesmos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Obtenção das amostras

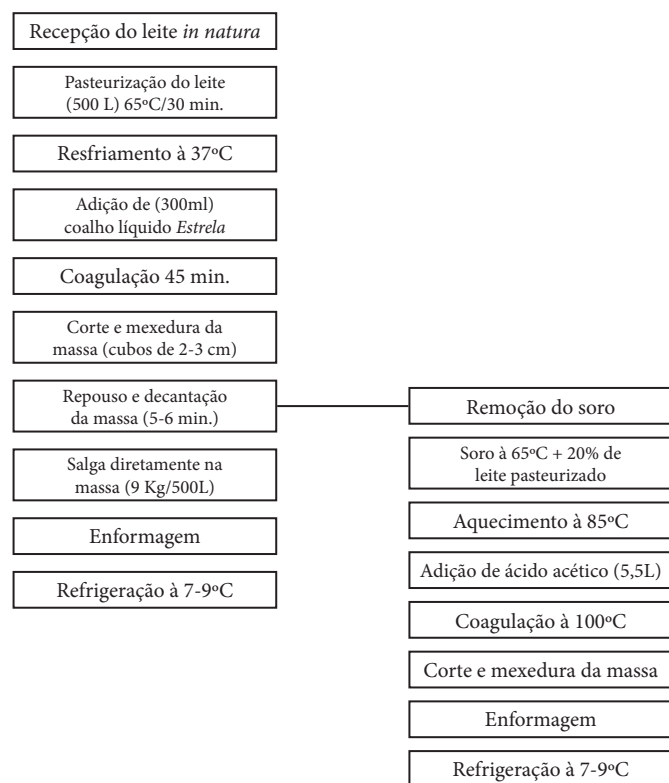
Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Estadual Paulista - UNESP, e as amostras foram cedidas por um laticínio de pequeno porte, produtor de queijos Minas frescal e ricota, localizado no município de São José do Rio Preto - SP. As coletas foram realizadas, conforme o fluxograma de fabricação descrito na Figura 1, totalizando doze repetições, incluindo as seguintes etapas: água, leite pasteurizado, coalho, massa, soro, superfície palmar dos manipuladores e tanque de coagulação, e ainda, queijos Minas frescal e ricota logo após o processamento ( $t_0$ ) e com cinco dias de vida de prateleira ( $t_5$ ).

### Preparo das amostras

As amostragens foram realizadas conforme estabelecido pela legislação (Brasil, 2003)<sup>12</sup>, sendo utilizada para os queijos a amostragem representativa do lote e para as demais etapas do processamento adotou-se amostragem indicativa, totalizando doze repetições em duplicata.

Para a coleta das amostras da superfície palmar e tanque de coagulação foi adotada metodologia sugerida por Silva (2007)<sup>13</sup>, onde se utilizou *swabs* estéreis, os quais foram posteriormente adicionados em tubos contendo água destilada estéril e transportados juntamente com as demais amostras, ao Laboratório para análise imediata. Vale destacar que a área a ser amostrada na superfície do tanque de coagulação foi delimitada utilizando-se placa de amostragem com abertura de 20 cm.

No Laboratório as amostras foram identificadas e a seguir foram pesados ou pipetados assepticamente 10 g/10 mL de cada amostra, sendo adicionados em um frasco de Erlenmeyer contendo 90 mL de água destilada estéril, seguida de homogeneização, constituindo assim a diluição  $10^{-1}$ . A partir desta, foram efetuadas as demais diluições decimais seriadas, utilizando o mesmo diluente<sup>12</sup>.



**Figura 1.** Fluxograma de fabricação dos queijos Minas frescal e ricota adotado pelo laticínio

### Análises microbiológicas e teste de fosfatase/oxidase

Nesse estudo, avaliou-se a população de bactérias aeróbias mesófilas, *Staphylococcus* coagulase positiva, coliformes totais e termotolerantes, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., e *Listeria monocytogenes*. A contagem de bactérias aeróbias mesófilas foi efetuada apenas nas amostras de água. As determinações do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais, termotolerantes e pesquisa de *Escherichia coli* foram realizadas para água, leite pasteurizado, coalho, massa, soro, mãos, tanque e queijos Minas frescal e ricota. A contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva e a pesquisa de *Salmonella* spp., foram efetuadas para todas as amostras citadas anteriormente, exceto para a água. A análise de *Listeria monocytogenes* foi utilizada somente para os queijos Minas frescal e ricota. Para todas as análises foram adotadas metodologias recomendadas pela legislação Brasileira<sup>14</sup>.

Foi realizado ainda, para as amostras de leite pasteurizado o teste de fosfatase e oxidase, para verificar o correto funcionamento do processo de pasteurização utilizado pelo laticínio, utilizando para a fosfatase o kit “fosfatase alcalina tira (leite) - Laborclin” e para oxidase, metodologia recomendada pelo Instituto Adolfo Lutz<sup>14</sup>.

**Tabela 1.** Resultados das análises microbiológicas efetuadas nas diferentes etapas da linha de processamento de queijos Minas frescal e Ricota

Amostras	Bactérias aeróbias mesófilas	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	Coliformes Totais	Coliformes Termotolerantes	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> spp.
	N <sup>a</sup> (UFC/mL,g)	N <sup>a</sup> (UFC/mL,g)	N <sup>a</sup> (NMP/mL,g)	N <sup>a</sup> (NMP/mL,g)	% <sup>***</sup>	% <sup>***</sup>
Água	2,1 x 10 <sup>4**</sup> (7,2x10 <sup>4</sup> -3,4x10 <sup>2</sup> )*	Nr	0,0608** (1,1x10 <sup>1</sup> -1,8x10 <sup>2</sup> )*	< 0,02** (0-0)*	aus.	Nr
Leite pasteurizado	Nr	2,6 x 10 <sup>6</sup> (9,2x10 <sup>6</sup> -3,4x10 <sup>2</sup> )*	2,5 x 10 <sup>2</sup> (4,1x10 <sup>2</sup> -1,6x10 <sup>2</sup> )*	9,6 x 10 <sup>1**</sup> (3,1x10 <sup>2</sup> -3,2x10 <sup>2</sup> )*	33,3	aus.
Coalho	Nr	1,0 x 10 <sup>1</sup> (4,6-4,4x10 <sup>1</sup> )*	2,3 (0,77-3,3x10 <sup>1</sup> )*	2,0** (0-0)*	aus.	aus.
Massa	Nr	5,9 x 10 <sup>6</sup> (1,6x10 <sup>7</sup> -2,7x10 <sup>2</sup> )*	6,3 x 10 <sup>2</sup> (5x10 <sup>2</sup> -8x10 <sup>1</sup> )*	1,2 x 10 <sup>2</sup> (3,1x10 <sup>2</sup> -2,6x10 <sup>2</sup> )*	58,3	aus.
Soro	Nr	1,0 x 10 <sup>8</sup> (3,4x10 <sup>8</sup> -3,4x10 <sup>2</sup> )*	6,3 x 10 <sup>2</sup> (5,1x10 <sup>2</sup> -8,1x10 <sup>1</sup> )*	2,7 x 10 <sup>1</sup> (6,1x10 <sup>1</sup> -2,2x10 <sup>2</sup> )*	33,3	aus.
Mãos	Nr	9,9 x 10 <sup>1</sup> (0-0)*	2,0 x 10 <sup>0</sup> (0-0)*	2,0 x 10 <sup>0</sup> (0-0)*	aus.	Nr
Tanque	Nr	9,9 x 10 <sup>1</sup> (0-0)*	1,7 x 10 <sup>1</sup> (3,7x10 <sup>1</sup> -2,1x10 <sup>2</sup> )*	2,0 x 10 <sup>0</sup> (0-0)*	aus.	Nr

N<sup>a</sup>: Valores médios de 12 repetições

\*Desvio padrão e Coeficiente de variação

\*\*Valores acima do limite máximo estabelecido pela legislação vigente (Brasil, 2001 e Brasil, 1996)

Nr: Não realizado

\*\*\*: Percentual de amostras que apresentaram positividade para o teste de confirmação de *E. coli* e para *Salmonella* spp.

Aus. Ausência em 25 g/mL

**Tabela 2.** Resultados das análises microbiológicas nas amostras de queijo Minas frescal e ricota, após o processamento ( $t_0$ ) e com cinco dias após data de fabricação ( $t_5$ )

	Queijo Minas Frescal		Ricota		Padrão
	N <sup>a</sup> $t_0$	N <sup>a</sup> $t_5$	N <sup>a</sup> $t_0$	N <sup>a</sup> $t_5$	
<i>Staphylococcus coagulase positiva</i> (UFC/g)	8,0 x 10 <sup>7a</sup>	3,7 x 10 <sup>8a</sup>	7,0 x 10 <sup>2b</sup>	2,7 x 10 <sup>4b</sup>	5 x 10 <sup>2</sup>
Coliformes Totais (NMP/g)	1,1 x 10 <sup>3a</sup>	1,1 x 10 <sup>3a</sup>	2,9 x 10 <sup>2b</sup>	4,6 x 10 <sup>2b</sup>	-
Coliformes Termotolerantes (NMP/g)	4,8 x 10 <sup>2a</sup>	3,0 x 10 <sup>2a</sup>	9,3 x 10 <sup>1b</sup>	5,8 x 10 <sup>0b</sup>	5 x 10 <sup>2</sup>
<i>Escherichia coli</i> ***	66,6	58,33	8,33	16,66	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	aus.	aus.	aus.	aus.	aus./25g
<i>Salmonella</i> spp.	aus.	aus.	aus.	aus.	aus./25g

N<sup>a</sup>: Valores médios de 12 repetições no tempo zero ( $t_0$ ) e no tempo cinco ( $t_5$ ). Letras iguais na mesma linha para cada tipo de queijo avaliado, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

\*Brasil (1996)

\*\*\*: Percentual de amostras que apresentaram positividade para o teste de confirmação de *E. coli* e para *Salmonella* spp.

-: Ausência de padrão na legislação

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Análises microbiológicas

Nas Tabelas 1 e 2 estão apresentados os resultados das análises microbiológicas realizadas para água, leite pasteurizado, coalho, massa, soro, *swab* das mãos dos manipuladores e do tanque de coagulação, queijos Minas frescal e ricota, logo após o processamento ( $t_0$ ) e com cinco dias da data de fabricação ( $t_5$ ).

### Água

A legislação brasileira estabelece padrão para contagem de bactérias aeróbias mesófilas de no máximo 5,0 x 10<sup>2</sup> UFC/mL<sup>15</sup>. As amostras analisadas apresentaram valor médio de 2,1 x 10<sup>4</sup> UFC/mL, estando acima do recomendado legalmente.

Para coliformes totais, verificou-se valor médio de 0,0608 NMP/100mL, estando acima do estabelecido (ausência em 100 mL), conforme apresentado na Tabela 1. Estes resultados podem indicar falhas no tratamento da água, principalmente pela presença de bactérias do grupo

coliforme, indicando possivelmente a utilização inadequada, ou até mesmo ausência de clorador nos reservatórios.

Para coliformes termotolerantes e *E. coli*, a legislação federal também estabelece ausência em 100 mL da amostra<sup>15</sup>. Neste estudo verificou-se para coliformes termotolerantes, resultado inferior a 0,02 NMP/100mL, estando em desacordo com o preconizado pela legislação (Tabela 1). A presença de *Escherichia coli* não foi observada, sendo esse resultado satisfatório, uma vez que a presença desse microrganismo pode causar danos à saúde do consumidor.

Em estudo realizado por Amaral e colaboradores<sup>16</sup>, ao avaliarem a qualidade higiênico-sanitária de 56 amostras de água para consumo humano de fontes localizadas em propriedades rurais na região nordeste de São Paulo, observaram que destas 93,35% encontravam-se fora dos padrões estabelecidos e, portanto, impróprias para o consumo humano.

Por outro lado, Alves, Odorizzi e Goulart<sup>17</sup>, ao analisarem as condições higiênico-sanitárias de água para consumo na cidade de Marília-SP, verificaram que 5,5%



das amostras coletadas apresentaram contaminação por coliformes totais e 94,5% estavam aptas para o consumo.

Diante disso, observamos que as amostras de água avaliadas apresentaram-se em inadequado estado para o consumo pelo laticínio, devido à presença de coliformes termotolerantes na mesma. Este fato indica a necessidade de algumas adequações, como a utilização frequente de clorador nos reservatórios e monitoramento periódico da qualidade sanitária.

### Leite pasteurizado

Para *Staphylococcus* coagulase positiva, apesar de não haver padrão microbiológico vigente, foi obtido valor médio de  $2,6 \times 10^6$  UFC/mL, conforme demonstrado na Tabela 1.

A presença deste microrganismo no leite pasteurizado pode ter ocorrido por contaminação pós-processamento, uma vez que a eficácia do processo de pasteurização foi avaliada pelos testes de fosfatase/peroxidase, demonstrando sua efetividade. Esta contaminação pode ter sido causada por equipamentos e/ou tubulações utilizadas para transferir o leite do pasteurizador para tanque de coagulação.

Conforme Carmo et al, o processo de pasteurização, quando eficaz, tem a capacidade de destruir as células de *Staphylococcus* sp., porém não elimina as toxinas presentes, pois estas são resistentes ao calor e podem permanecer ativas por longo tempo. Com isso, a presença de células desse microrganismo em leite pasteurizado pode indicar falhas no processo de pasteurização<sup>18</sup>.

Lisita, ao analisar três amostras de leite pasteurizado de laticínios do estado de São Paulo, obteve valores de  $< 10$  a  $1,0 \times 10^1$  UFC/mL para *Staphylococcus* coagulase positiva, os quais são inferiores aos encontrados neste trabalho<sup>2</sup>.

Para coliformes totais e termotolerantes, verificou-se um percentual médio de respectivamente  $2,5 \times 10^2$  UFC/mL e  $9,6 \times 10^1$  NMP/mL (Tabela 1). Estes percentuais apresentaram-se acima do padrão vigente de no máximo 4 NMP/mL para coliformes totais e máximo 2 NMP/mL para coliformes termotolerantes. Verificou-se a presença de *E. coli* em 33,3 % das amostras avaliadas, estando acima do padrão preconizado pela legislação. Para *Salmonella* spp., verificou-se ausência em todas as amostras analisadas<sup>19</sup>.

Catão e Ceballos, ao avaliarem quinze amostras de leite pasteurizado provenientes de laticínios do estado da Paraíba, constataram a presença de coliformes totais em 60,0% e termotolerantes em 46,6 %<sup>20</sup>.

### Coalho

É importante destacar que no processamento do queijo Minas frescal foi empregado um complexo enzimático comercial (coalho) sob a forma líquida, sem a utilização de cultura lática.

Para o coalho existe padrão na legislação vigente somente para coliformes termotolerantes (máximo de 5 NMP/mL) e *Salmonella* spp. (ausência em 25 mL), portanto, as amostras avaliadas apresentaram-se em acordo com o estabelecido, conforme apresentado na tabela 1<sup>21</sup>. Não foi observada confirmação para *Escherichia coli* nas amostras avaliadas. Estes resultados são satisfatórios, uma vez que a presença destes microrganismos afeta as condições higiênico-sanitárias do produto final podendo ocasionar toxinfecções de origem alimentar.

Para *Staphylococcus* coagulase positiva verificou-se valor médio de  $1,0 \times 10^1$  UFC/mL entre as amostras estudadas. Este resultado indica baixa contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva entre as amostras analisadas. No entanto, é preocupante, pois quando o coalho é adicionado ao leite estes microrganismos encontram condições ótimas ao seu desenvolvimento e podem atingir contagens elevadas e com isso comprometer a sanidade do produto<sup>9</sup>.

### Massa do queijo (coalhada)

Apesar da ausência de padrões microbiológicos para massa do queijo ou coalhada, esta apresentou valores elevados para todos os microrganismos avaliados, exceto para *Salmonella* spp., a qual não foi detectada (Tabela 1).

Para *Staphylococcus* coagulase positiva, coliformes totais, termotolerantes e *Escherichia coli*, obteve-se, respectivamente, valores médios de  $5,9 \times 10^6$  UFC/g;  $6,3 \times 10^2$  NMP/g;  $1,2 \times 10^2$  NMP/g. A presença de *E. coli* foi constatada em 58,33 % das amostras, conforme apresentado na Tabela 1.

Resultados que diferem do verificado neste estudo para *S. coagulase* positiva, foram obtidos por Lisita ao avaliar a presença deste bioindicador em quatro amostras de coalhada de queijo Minas frescal, onde obteve ausência em todas as amostras<sup>2</sup>.

Para coliformes totais; termotolerantes e *Escherichia coli* também foram observadas contagens elevadas, o que é preocupante do ponto de vista de saúde pública, uma vez que nestas contagens estes microrganismos podem provocar infecções alimentares graves. Em estudo realizado por Lisita observaram-se

resultados superiores aos observados neste estudo para coliformes totais e termotolerantes com valores médios de  $1,1 \times 10^5$  e  $2,1 \times 10^3$  NMP/mL<sup>2</sup>.

Segundo Perry, tal fato pode ser explicado pela elevada umidade na linha de produção, pela matéria-prima ser rica em nutrientes e, ainda pela ausência de procedimentos operacionais adequados durante as etapas do processamento, o que também pode ter ocorrido neste estudo<sup>22</sup>.

### Soro de queijo

Conforme apresentado na Tabela 1, verificou-se para *Staphylococcus* coagulase positiva valor médio de  $1,0 \times 10^8$  UFC/mL.

Para a determinação de coliformes totais, observou-se valor médio de  $6,3 \times 10^2$  NMP/mL e termotolerantes de  $2,7 \times 10^1$  NMP/mL. Foi observada ainda, a presença de *Escherichia coli* em 33,3 % das amostras avaliadas. Para *Salmonella* spp., obteve-se ausência em todas as amostras.

Nicolau et al, avaliando oito amostras de soro de queijo Minas frescal, em Goiânia, verificaram a presença de coliformes totais em 62,5 % e termotolerantes em 37,5%<sup>8</sup>.

Em contrapartida, Chiappini, Franco e Oliveira ao avaliarem 30 amostras de soro de queijos oriundas de cooperativas do norte fluminense - RJ, quanto à presença de coliformes totais e termotolerantes, verificaram que estas se apresentaram em condições insatisfatórias somente para coliformes totais<sup>23</sup>.

As elevadas contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva podem ser oriundas de utensílios, superfícies e equipamentos higienizados de forma inadequada, levando a formação de biofilmes. Estes são importantes focos de contaminação dos alimentos, pois são de difícil remoção, além de causarem prejuízos econômicos para a empresa<sup>24</sup>. Com isso, é imprescindível adotar procedimentos operacionais adequados durante as etapas de higienização para garantir a qualidade e a inocuidade dos produtos elaborados.

### Bioindicadores na superfície palmar dos manipuladores e tanque de coagulação

O monitoramento microbiológico da superfície palmar do manipulador foi realizado antes do processo de enformagem e o do tanque de coagulação, após a higienização para coagulação da massa. A superfície palmar dos manipuladores e o tanque de coagulação,

as contagens apresentaram para *S. coagulase* positiva, coliformes totais e termotolerantes, valores médios de respectivamente  $9,9 \times 10^1$  UFC/cm<sup>2</sup>;  $2,0$  NMP/cm<sup>2</sup> e  $1,7 \times 10^1$  NMP/cm<sup>2</sup>;  $2,0$  NMP/cm<sup>2</sup>.

Em comparação com outros trabalhos realizados, estes resultados foram importantes, pois alguns estudos, como o realizado por André e colaboradores, observaram que de 46 manipuladores avaliados 17 (70,8%) apresentaram positividade para *S. aureus*<sup>25</sup>.

Resultados superiores aos observados neste estudo também foram obtidos por Millezi e colaboradores, ao avaliarem as condições higiênico-sanitárias da superfície palmar de 16 manipuladores em indústria produtora de embutidos, verificaram resultados médios para coliformes totais e *S. aureus* de, respectivamente,  $1,2 \times 10^2$  UFC/mão e  $1,5 \times 10^3$  UFC/mão<sup>26</sup>.

Com relação à superfície do tanque de coagulação, de forma geral, verificaram-se valores inferiores em relação aos observados na literatura. Oliveira e colaboradores ao avaliarem cinco estabelecimentos, obtiveram para *S. aureus* valores médios entre  $2,6 \times 10^3$  -  $1,4 \times 10^5$  UFC/cm<sup>2</sup>. Para Coliformes termotolerantes, estes mesmos autores verificaram níveis também altos com valores entre  $0,43 \times 10^1$  -  $4,6 \times 10^3$  UFC/cm<sup>2</sup><sup>27</sup>.

Os resultados obtidos no presente estudo são satisfatórios, uma vez que indicam a utilização correta e eficiente de métodos higiênico-sanitários para a limpeza do laticínio e também higiene dos manipuladores.

### Queijo Minas frescal

As amostras de queijo Minas frescal, nos tempos zero e cinco dias de fabricação, apresentaram para *Staphylococcus* coagulase positiva, valores médios acima do preconizado pela legislação ( $1,0 \times 10^3$  UFC/g) de respectivamente  $8,0 \times 10^{7a}$  e  $3,7 \times 10^{8a}$  UFC/g, não apresentando diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ), conforme observado na tabela 2<sup>4</sup>.

Tais resultados elevados são importantes do ponto de vista de saúde pública, pois nestas contagens, esse microrganismo torna-se potencialmente produtor de enterotoxinas as quais são capazes de desencadear sintomas de intoxicações estafilocócicas graves<sup>2,27,28</sup>.

Resultados também elevados para *Staphylococcus* coagulase positiva foram observados por Ávila e colaboradores, ao analisarem 33 amostras de queijo Minas frescal, observaram que 24,2% destas encontravam-se acima do estabelecido, atuando como potenciais riscos à saúde dos consumidores<sup>28</sup>.

Barros et al, analisando 30 amostras de queijo Minas frescal no município do Rio de Janeiro, verificaram que apenas 27,0% encontravam-se acima do limite estabelecido para esse microrganismo<sup>29</sup>.

Com relação aos coliformes totais, verificaram-se valores para os tempos zero e cinco dias de fabricação, de respectivamente  $1,1 \times 10^3$  NMP/g;  $1,1 \times 10^3$  NMP/g, não apresentando diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ). Para coliformes termotolerantes, os resultados médios para zero e cinco dias, foram de respectivamente  $4,8 \times 10^2$  NMP/g e  $3,0 \times 10^2$  NMP/g, e também não apresentaram diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ), conforme demonstrado na Tabela 2. Estes resultados encontram-se em acordo com o estabelecido pela legislação<sup>5</sup>.

Foi observada a presença de *E. coli*, respectivamente, em 66,66% e 58,33% das amostras analisadas, nos tempos zero e cinco dias. Para *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*, verificou-se ausência em todas amostras estudadas, estando em acordo com os padrões vigentes<sup>5</sup>.

Resultados similares foram observados por Little et al para *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp., ao avaliarem 412 amostras de queijos frescos de serviços de alimentação, obtendo ausência em todos os queijos testados<sup>30</sup>.

Já Salloti e colaboradores, ao avaliarem 60 amostras de queijo Minas frescal em Jaboticabal, verificaram que todas se encontravam acima do estabelecido pela legislação vigente<sup>5,31</sup>. Por outro lado, Loguercio e Aleixo, ao analisarem 30 amostras de queijo Minas frescal na cidade de Cuiabá, verificaram que uma (3,3%) apresentou contagem de coliformes termotolerantes superior a  $10^3$  UFC/g<sup>1</sup>.

As altas contagens encontradas em alguns estudos se devem, segundo Silva et al, à manipulação excessiva e ao desconhecimento das Boas Práticas de Fabricação, uma vez que são fatores incisivos para a incidência de coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* nos alimentos<sup>32</sup>.

## Ricota

A Tabela 2 demonstra as contagens médias de *Staphylococcus coagulase* positiva, das amostras analisadas, para os tempos zero e cinco dias,  $7,0 \times 10^2$  UFC/g e  $2,7 \times 10^4$  UFC/g respectivamente, sendo que destas, 41,66%, após cinco dias da data de fabricação, encontraram-se acima do estabelecido pela legislação ( $1,0 \times 10^3$  UFC/g)<sup>5</sup>. Tais resultados para os tempos zero e cinco dias, não apresentaram diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ).

Estes resultados são importantes, uma vez que, Carniel et al<sup>33</sup>, ao submeterem 26 amostras de ricota comercializadas na cidade de São José do Rio Preto - SP, a análise quanto a presença de *Staphylococcus coagulase* positiva, verificaram que destas, 88,5% encontraram-se acima do estabelecido pelo padrão legal<sup>5</sup>.

Para coliformes totais, obteve-se respectivamente, resultados médios para os tempos zero e cinco dias de  $2,9 \times 10^2$  NMP/g e  $4,6 \times 10^2$  NMP/g, não havendo diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ).

Com relação aos coliformes termotolerantes, observaram-se valores médios de respectivamente,  $9,3 \times 10^1$  NMP/g e  $5,8 \times 10^0$  NMP/g para os tempos zero e cinco dias, e estes também não apresentaram diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ). Todas as amostras apresentaram-se em conformidade com os padrões vigentes para coliformes totais e termotolerantes<sup>5</sup>.

Dessa mesma forma, para *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*, verificou-se ausência em todas as amostras analisadas, estando também em acordo com os parâmetros estabelecidos pelo ministério da agricultura<sup>5</sup>.

Raimundo et al<sup>34</sup> e Sakate et al<sup>35</sup> obtiveram para coliformes termotolerantes, respectivamente, 83,3% e 75,0% das amostras de ricota avaliadas acima do padrão legal nas cidades de Alfenas e Belo Horizonte - MG.

A presença de bioindicadores de contaminação nesse tipo de alimento, o qual passa por tratamento térmico a altas temperaturas ( $90,0-95,0^\circ\text{C}$ ) e acidificação, indica contaminação oriunda de fontes posteriores ao processamento<sup>35</sup>.

Comparando os resultados obtidos para todos os bioindicadores avaliados nas amostras de ricota e queijo Minas frescal, verificaram-se valores significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) para o queijo minas frescal, o que pode ser explicado pelo maior teor de umidade e pH levemente ácido que o mesmo apresenta.

## Teste de Fosfatase/Peroxidase

Todas as amostras de leite pasteurizado foram submetidas ao teste de fosfatase e peroxidase, estando todas (100%) positivas para peroxidase e negativas para fosfatase, indicando que o processo de pasteurização adotado pelo laticínio é realizado de forma eficiente e de acordo com a legislação vigente, a qual estabelece como pasteurização correta, aquela que mantém a enzima peroxidase presente no leite e elimina a fosfatase do mesmo<sup>5</sup>. A ausência de peroxidase indica superaquecimento do leite, descaracterizando-o como pasteurizado.

Tais resultados reafirmam que as contagens elevadas para os bioindicadores observadas nas amostras de leite pasteurizado podem ser oriundas de contaminações pós-processamento e não de pasteurização inadequada desta matéria prima.

## CONCLUSÃO

Os resultados do monitoramento microbiológico na linha de processamento de queijos Minas frescal e ricota, e a avaliação da presença de fosfatase/peroxidase realizadas em um laticínio alocado no município de São José do Rio Preto - SP permitem concluir que as amostras de água, leite pasteurizado, massa, soro e queijos Minas frescal e Ricota apresentaram-se impróprias para utilização pelo laticínio e também para o consumo, pois se observou a presença de coliformes termotolerantes; *Escherichia coli* e *S. coagulase* positiva nestas amostras. Tais patógenos comprometem a segurança e a qualidade dos produtos finais e, portanto, torna-se importante a elaboração de estratégias de controle e redução destas contaminações para minimizar riscos à saúde dos consumidores.

## AGRADECIMENTOS

Aos proprietários e funcionários do laticínio pelo auxílio e disponibilidade em ceder as amostras. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

1. Loguercio AP, Aleixo JAG. Microbiologia de queijo tipo minas frescal produzido artesanalmente. *Ciênc Rural Santa Maria*. 2001; 31(6): 1063-7.
2. Lisita, MO. Evolução da população microbiana na linha de produção do queijo Minas frescal em uma indústria de laticínios [dissertação de mestrado]. Piracicaba: Universidade de São Paulo, 2005.
3. Associação Brasileira das Indústrias de Queijos - ABIQ - Produção de queijo Minas frescal no ano de 2007. <http://www.abiq.com.br>. Acesso em dezembro de 2008.
4. Pereira MG, Lima MT, Santana MFS. Queijo minas frescal. Universidade Federal do Piauí. Comunic Téc Centro Ciênc Agrárias. 2006; 5(12): 1-4.
5. Brasil. Portaria nº. 146, de 07 de março de 1996. Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 11 de mar. 1996, Seção 1, p. 3977.
6. Piccoli RH, Del Rio DT, Alcântara EMC, Abreu LR. *Staphylococcus coagulase* positiva em ricota: redução da contaminação pela utilização de luvas e máscaras. *Rev Inst Latic Cândido Tostes*. 2005; 60 (342): 25-8.
7. Esper LMR, Rosa VP, Rossi P, Kuaye AY, Viotto WH, Sant'ana AS. Efeito da adição de culturas protetoras (Holdbac TM Listeria) sobre *Listeria monocytogenes* inoculadas na superfície de ricota. *Higiene Alimentar*. 2007; 21(156): 109-14.
8. Nicolau ES, Kuaye AY, Mesquita AJ, Oliveira GR. Qualidade microbiológica dos queijos tipo minas frescal, prato e mussarela comercializados em Goiás. *Rev Inst Latic Cândido Tostes*. 2001; 56 (321): 200-5.
9. Jay JM. Microbiologia de alimentos. 6ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2005. p.711.
10. Brasil. Portaria nº. 46, de 10 de fevereiro de 1998. Institui o Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle-APPCC a ser implantado, gradativamente, nas indústrias de produtos de origem animal sob regime do SIF. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 11 fev. 1998, Seção 1, p. 24.
11. Timm CD, Ross TB, Gonzalez HL, Oliveira DS. Pontos críticos de controle na pasteurização do leite em microusinas. *Rev Inst Latic Cândido Tostes*. 2004; 59 (336): 75-80.
12. Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA, Taniwaki MH, Santos RFS, Gomes RAR. Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos. 3ª ed. São Paulo: Varela; 2007. p.544.
13. Brasil. Instrução Normativa nº. 62, de 26 de agosto de 2003. 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 de set. de 2003, Seção 1, p. 14.
14. Instituto Adolfo Lutz [IAL]. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. São Paulo 1985. p.533
15. Brasil. Portaria nº. 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 25 de mar. de 2004, Seção 1.
16. Amaral LA, Nader Filho A, Rossi Junior OD, Ferreira FLA, Barros LSS. Água de consumo humano como fator de risco à saúde em propriedades rurais. *Rev Saúde Pública*. 2003; 37 (4): 510-4.
17. Alves NC, Odorizzi AC, Goulart FC. Análise microbiológica de águas minerais e de água potável de abastecimento, Marília, SP. *Rev Saúde Pública*. 2002; 36 (6): 749-51.
18. Carmo LS, Dias RS, Linardi VR, Sena MJ, Santos DA, Faria ME, et al. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiol*. 2002; 8 (19): 9-14.
19. Brasil. Instrução normativa nº. 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade de leite pasteurizado. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 18 de set. 2002, Seção 1, p. 13.

20. Catão RMR, Ceballos BSO. *Listeria* spp., coliformes totais e fecais e *E. coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no estado do Paraná (Brasil). *Ciênc Tecnol Alim*. 2001; 21(3): 281-7.
21. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária [ANVISA]. Resolução - RDC, nº. 12, de 2 de janeiro de 2001. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12\\_01rdc.html](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.html). Acesso em: Setembro de 2009.
22. Perry, KSP. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. *Quím Nova*. 2004; 27(2): 293-300.
23. Chiappini CCJ, Franco RM, Oliveira LAT. Avaliação do soro de queijo quanto à *Staphylococcus aureus*. Congresso Nacional de Laticínios, Juiz de Fora. 1995, 13 (278): 143-4.
24. Araújo VS, Pagliares VA, Queiroz MLP, Freitas-Almeida AC. Occurrence of *Staphylococcus* and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *J Ap Microbiol*. 2002; 92(6): 1172-7.
25. André MCDPB, Campos MRH, Borges LJ, Kipnis A, Pimenta FC, Serafini AB. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from food handlers, raw bovine milk and Minas Frescal cheese by antibiogram and pulsed-field gel electrophoresis following Small digestion. *Food Control*. 2008; 19: 200-7.
26. Millezi AF, Tonial TM, Zanella JP, Moschen EES, Ávila CAC, Kaiser VL, Hoffmeister S. Avaliação e qualidade microbiológica das mãos de manipuladores e do agente sanificante na indústria de alimentos. *Rev Analyt*. 2007; (28): 76-9.
27. Oliveira MMM, Brugnera DF, Mendonça AT, Piccoli RH. Condições higiênico-sanitárias de máquinas de moer carne, mãos de manipuladores e qualidade microbiológica de carne moída. *Rev Cienc Agrotec*. 2008; 32 (6): 1863-98.
28. Ávila JS, Mancini WR, Vilela MAP, Rezende PR. Queijo “Minas frescal” comercializado na cidade de Juiz de Fora e Região III - Incidência de estafilococos produtores de coagulase. Congresso Nacional de Laticínios, Juiz de Fora. 2002; 57 (326): 115-7.
29. Barros PCOG, Nogueira LC, Rodriguez EM, Chiappini CCJ. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo Minas frescal comercializado no município do Rio de Janeiro, RJ. *Hig Alimentar*. 2004; 18(122): 57-61.
30. Little CL, Rhoades JR, Sagoo SK, Harris J, Greenwood M, Mithani et al. Microbiological quality of retail cheeses made from raw, thermized or pasteurized milk in the UK. *Food Microbiol*. 2008; 25: 304-12.
31. Salotti BM, Carvalho ACFB, Amaral LA, Vidal AMCM, Cortez AL. Qualidade microbiológica do queijo minas frescal comercializado no município de Jaboticabal, SP, Brasil. *Arq Inst Biol*. 2006; 73(2): 171-5.
32. Silva DL, Ramos MS, Rodrigues ET, Martins ADO, Mendonça RCS. Avaliação da contaminação de queijos Minas frescal artesanal e industrial comercializados na região de Viçosa - MG. *Leite & Derivados*. 2006; 15(92): 70-4.
33. Carnicel FA, Peresi JTM, Gonçalves TMV, Hoffmann FL. Ricota: contaminação microbiológica em amostras comercializadas no município de São José do Rio Preto - SP no período de abril a setembro de 2002. *Rev Inst Latic Cândido Tostes*. 2003; 335(58): 7-11.
34. Raimundo IC, Fiorini JE, Piccoli RH. Avaliação microbiológica de amostras de ricotas comercializadas no município de Alfenas, MG. *Higiene Alimentar*. 2005; 19(137): 54-5.
35. Sakate RI, Santos FL, Brandão SCC. Características microbiológicas de ricota fresca comercializada no município de Belo Horizonte - MG. XVI Congresso Brasileiro de Ciências e Tecnologia de Alimentos; Rio de Janeiro.

## Avaliação da contaminação por matérias estranhas em carne de sol comercializada em “casas do norte”

### Study on contaminant materials within “sun dried meat (jerked beef)” at the “Northern Houses

RIALA6/1255

Tatiana Almeida MENNUCCI<sup>1\*</sup>, Maria Aparecida Moraes MARCIANO<sup>2</sup>, Márcia Bittar ATUI<sup>2</sup>, Adelino POLI NETO<sup>3</sup>, Pedro Manuel Leal GERMANO<sup>4</sup>

\*<sup>1</sup>Endereço para correspondência: Serviço de Vigilância Sanitária de Diadema, Coordenadoria de Vigilância à Saúde, Av. Antonio Piranga nº 614 – Centro – Diadema – SP - CEP: 09911-160 Tel: (11) 4043-8215/8530-3273. e-mail: tatifisvet@bol.com.br

<sup>2</sup>Centro de Microscopia Alimentar, Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, SP

<sup>3</sup>Departamento de Medicina Legal, Ética Médica e Medicina Social e do Trabalho, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo

<sup>4</sup>Departamento de Prática de Saúde Pública, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo

Recebido: 10.11.2009 – Aceito para publicação: 24.03.2010

#### RESUMO

A carne de sol é um produto artesanal, obtido de técnicas de salga e desidratação, empregado por populações do Norte e Nordeste do Brasil. A falta de emprego de tecnologia mais avançada no processamento e no estabelecimento de padrões oficiais de identidade e de qualidade contribuem na produção, comercialização e distribuição em condições sanitárias insatisfatórias, os quais põem em risco a saúde do consumidor. Com o objetivo de avaliar as condições sanitárias da carne de sol comercializada em “casas do norte”, foi pesquisada a ocorrência de matérias estranhas. Foram analisadas 44 amostras de carne de sol coletadas de 22 “casas do norte” localizadas em Diadema –SP/Brasil. As condições de exposição e de comercialização do produto nas “casas do norte” foram investigadas, as quais serviram de informação complementar na apreciação do grau de segurança alimentar do produto. Em todas as amostras analisadas foram encontradas matérias estranhas, tais como, insetos, fragmentos, larvas, exúvias, ácaros, pelos de roedor, bábula de ave, fungos filamentosos e, também, objetos pontiagudos e cortantes. Em 11 locais de venda foi verificada a presença de vetores mecânicos. Das amostras analisadas, 90,9% apresentaram condições sanitárias insatisfatórias em função da presença de perigos físicos. Esses achados, associados às condições observadas nas “casas do norte”, indicam que os produtos analisados podem colocar em risco a saúde do consumidor.

**Palavras-chave.** carne de sol, condições sanitárias, “casas do norte”, matérias prejudiciais à saúde, segurança alimentar.

#### ABSTRACT

The “sun dried meat” (*carne de sol*) is a handmade food produced by salting and dehydration procedures, and commonly consumed by people from the North and Northeast areas of Brazil. Taking into account the lack of advanced technology for preparing it and also lacking any official standards for product identity and quality, in addition to the unsuitable sanitary conditions for food processing, marketing and distribution, it might cause risk to consumers' health. This paper evaluates the sanitary conditions of “sun dried meat”, by analyzing the occurrence of the extraneous materials in 44 samples of “sun dried meat” collected from 22 “Northern Houses” in Diadema - SP- Brazil. The additional information on food safety, product exposure and sale conditions at the “Northern Houses” were assessed. Several kinds of contaminants were found in 44 analyzed samples as whole insects and their debris, larvae, arthropods exuviae, mites, rodent fur, pieces of bird feather, fungi, and pointed and sharp objects. Mechanical vectors were detected in 11 sale spots. Among 44 “sun dried meat” samples, 90.9% showed unsatisfactory sanitary conditions, considering the occurrence of health hazardous contaminants. These findings and including the inadequate hygienic conditions of the “Northern Houses”, indicate these products are unsuitable for consumption.

**Key words.** “sun dried meat”, sanitary conditions, “Northern Houses”, substances harmful to health, food safety.

## INTRODUÇÃO

A carne desol é o resultado da combinação da aplicação de técnicas de salga e desidratação parcial da carne, sendo um produto amplamente consumido por populações de algumas regiões do Brasil, principalmente do Norte e Nordeste<sup>1</sup>. Devido às diferentes denominações que recebe, é frequentemente confundida com um outro produto cárneo salgado, porém industrializado, o charque<sup>2</sup>.

Este alimento surgiu, primeiramente, no Nordeste, como uma alternativa para manter a produção excedente de carne bovina devido, principalmente, às dificuldades encontradas na sua conservação, em face ao baixo nível econômico da população que não dispunha de equipamentos para refrigeração<sup>3</sup>. No entanto, as condições climáticas favoráveis e a ampla disponibilidade de sal marinho nestas localidades, permitiram que o produto fosse conservado pela salga e desidratação. O uso desta técnica artesanal se popularizou, possibilitando a produção em condições higiênico-sanitárias insatisfatórias e, tendo como resultado, um produto de vida de prateleira curta<sup>4</sup>.

De início, tratava-se de um alimento destinado a atender às necessidades proteicas de populações locais, vizinhas ou regionais<sup>5</sup>. Na atualidade, passou de produto consumido regionalmente e utilizado em algumas receitas, para uma condição de maior alcance, sendo apreciado em todo o território nacional, em diversas preparações culinárias. Pode ser encontrado em grandes centros urbanos, como São Paulo e Rio de Janeiro, nas residências, restaurantes, e inclusive fora do restrito círculo de comidas típicas nordestinas<sup>6</sup>. Devido às características de preparo rápido, textura macia, sabor e aroma agradáveis, qualifica-se como componente do cardápio de restaurantes “*fast food*”. Por ser um produto de conveniência, tem potencial para conquistar o consumidor doméstico, que busca diversidade de opções de carne de preparo rápido<sup>3</sup>.

Embora esteja ligado à história da cultura brasileira e enraizado em hábitos alimentares da população, especialmente a nordestina, a carne de sol tem sido objeto de poucas pesquisas. Deve-se considerar que o produto é altamente popular, pois não existe tecnologia sofisticada para sua elaboração, e tampouco padrões oficiais de identidade e qualidade. Estes fatos permitem que seja elaborado de forma caseira, e sob condições sanitárias inadequadas.

Associada a ausência de regulamentação para sua produção, a comercialização é ainda facilitada pela pouca exigência do produto na conservação, dispensando a embalagem e o armazenamento sob refrigeração. Quase a

totalidade da carne de sol, tem sua elaboração, em pequenos estabelecimentos que se dedicam especificamente, a estas atividades ou em comércios varejistas que atendem a população que aprecia este produto.

Apesar destas condições, a literatura, ainda que escassa, demonstra que o produto pode conter matérias estranhas prejudiciais à saúde. Com referência à presença de contaminação por insetos em carnes salgadas, há pouca informação na literatura. Estudo realizado por Santos e Rodrigues<sup>7</sup> avaliou o grau deste tipo de contaminação em vários produtos salgados comercializados na cidade de São Paulo (pertences de feijoada), verificando que, mesmo na presença de cristais de cloreto de sódio, há desenvolvimento de ovos e larvas de insetos. A singularidade do presente estudo deve-se à pesquisa das condições de um tipo específico de produto cárneo salgado, as carnes de sol, comercializadas no varejo, apenas em casas de produtos típicos nordestinos.

A relevância em se avaliar a qualidade da carne de sol faz-se, sobretudo, pela preocupação sobre as condições destas carnes distribuídas para o consumo, pois muitas vezes podem não atender aos padrões mínimos de qualidade sanitária, tornando-se agente de disseminação de patógenos e colocando em risco a saúde do consumidor.

A importância do presente estudo apóia-se no crescente consumo de carnes de sol, no Brasil, inclusive em centros urbanos cada vez mais distantes da origem histórica de produção, em decorrência das migrações populacionais, das inovações culinárias e dos modismos, disponibilizando este produto a inúmeros consumidores. Possibilita, também, a ampliação do foco da Microscopia Alimentar tradicional, comumente aplicada à análise de produtos processados e/ou industrializados, voltando-se para produtos artesanais, uma vez que estes têm se destacado como tendência atual no consumo e comercialização.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi: avaliar o produto, macroscopicamente e microscopicamente, quanto à presença de matérias estranhas prejudiciais ou não à saúde; comparar os resultados obtidos nas avaliações macro e microscópica com os parâmetros preconizados na legislação brasileira, para produtos similares; observar as condições das “casas do norte” e das peças de carnes de sol expostas para venda ao consumidor, quanto aos aspectos favoráveis à contaminação física do produto e associar as condições observadas nos estabelecimentos aos resultados obtidos nestas análises; obtendo-se um panorama da qualidade sanitária destes produtos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Tipo de estudo, local de realização e procedimentos gerais

Realizou-se um estudo experimental, cuja interpretação dos dados obtidos foi submetida à análise.

O material de pesquisa foi a carne de sol, comercializada no varejo, em “casas do norte” localizadas na cidade de Diadema. A aplicação da metodologia de análise laboratorial do produto destinou-se a avaliar a presença de matérias estranhas, e a observação das condições de exposição e comercialização nos estabelecimentos, forneceu informação complementar para a avaliação do grau de segurança alimentar do produto.

O local de estudo foi o município de Diadema, em toda a sua extensão territorial. A população avaliada compreendeu as “casas do norte” localizadas nas vias públicas principais da cidade, excluindo-se os núcleos populacionais pela impossibilidade de acesso e insegurança para o pesquisador. As avaliações macro e microscópica deste produto foram realizadas no Laboratório de Microscopia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo.

### Amostragem

Foram analisadas 44 amostras de carne de sol, pesando entre 150,0 e 400,0g cada, adquiridas no comércio varejista, especificamente em “casas do norte” no município de Diadema/SP. As amostras foram adquiridas ao acaso de 22 estabelecimentos e em duplicata.

### Procedimento de coleta das amostras

A coleta das unidades de amostras de carnes de sol foi realizada no período compreendido entre julho e novembro de 2008.

As amostras foram adquiridas nos estabelecimentos e imediatamente acondicionadas em sacos plásticos, lacrados e identificados com informações sobre data da coleta, peso e horário.

Considerando que as carnes de sol são peças sólidas não embaladas e comercializadas a granel, a unidade de amostra foi retirada em porções de diferentes pontos do alimento.

O transporte das amostras até os laboratórios ocorreu, no máximo, após 4 horas da coleta, e foi realizado em temperatura ambiente, com os produtos protegidos contra umidade, luz e calor, por meio do acondicionamento em caixas plásticas de transporte.

### Metodologia de análise

A pesquisa de matérias estranhas macro e microscópicas seguiu as recomendações da *Food and Drug Administration*<sup>8</sup> e do *Codex Alimentarius*, e foi realizada com base na metodologia utilizada por Santos e Rodrigues<sup>7</sup>.

Cada uma das unidades amostrais foi analisada macroscopicamente, através da observação direta a olho nu, a fim de identificar a presença de matérias estranhas, prejudiciais ou não à saúde, presentes na superfície do produto. Para tanto, as amostras foram distribuídas sobre uma bandeja de plástico, para completa visualização. A seguir, foram recortadas com o auxílio de instrumentos, a fim de se verificar a presença de matérias estranhas aderidas nas partes internas do produto. Todas as matérias estranhas encontradas foram separadas e colocadas em uma placa de Petri para identificação ao microscópio estereoscópico. Após a realização da análise macroscópica, com ou sem o encontro de matérias estranhas visíveis a olho nu, as unidades analíticas foram submetidas à lavagem com água filtrada, passando este conteúdo por um papel de filtro para a retenção de outros materiais não identificados macroscopicamente. O papel de filtro foi encaminhado para exame ao microscópio estereoscópico, nos aumentos de 10 a 30 vezes. As matérias estranhas isoladas e identificadas como insetos inteiros e/ou fragmentos foram conservadas em álcool 70,0%, e encaminhadas para classificação entomológica posterior no Laboratório de Entomologia Forense do Instituto Oscar Freire, da Universidade de São Paulo. A mesma conduta foi adotada para matérias identificadas como pelos animais, que foram previamente fixadas em lâmina, para auxiliar na identificação. Durante a análise macroscópica, as unidades analíticas suspeitas de contaminação por fungos foram submetidas à raspagem da superfície, para posterior identificação morfológica ao microscópio óptico.

### Observação dos produtos e estabelecimentos

Durante a aquisição e coleta das amostras destinadas às análises laboratoriais, as condições de comercialização das carnes de sol e dos 22 estabelecimentos foram observadas. A observação das condições de exposição dos produtos nos pontos de venda teve por objetivo fornecer informações adicionais às obtidas nas análises laboratoriais, associando-as e complementando os dados sobre o grau de contaminação por matérias estranhas encontradas no produto ofertado ao consumidor.



### Padrões e recomendações analíticas

Os resultados obtidos nas análises macro e microscópica das amostras analisadas foram comparados com o estabelecido na Resolução RDC nº 175 de 08/07/2003<sup>9</sup>, para avaliação da presença de contaminantes macro e microscópicos prejudiciais à saúde humana. Embora este regulamento se aplique aos alimentos embalados, e não a granel, como se apresentam as carnes de sol e, devido à ausência de outras normas ou padrões para o produto, foi utilizado como base para a interpretação e discussão dos resultados.

Assim, foram consideradas impróprias para consumo, as amostras que apresentaram matérias prejudiciais à saúde humana, conforme definido pela legislação, tais como, insetos em qualquer fase de desenvolvimento, vivos ou mortos, inteiros ou em partes, reconhecidos como vetores mecânicos; outros animais vivos ou mortos, inteiros ou em partes, também reconhecidos como vetores mecânicos, tais como, ratos, morcegos, e pombos; excrementos de insetos e os de outros animais; e objetos rígidos, pontiagudos ou cortantes, que possam causar lesões no consumidor.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nas análises macro e microscópica das amostras de carne de sol, estão apresentados na Tabela 1. Para a expressão dos resultados, as matérias estranhas isoladas das amostras pelos métodos macroscópico e microscópico foram compiladas conjuntamente e estão apresentadas na Tabela 1. Nas Tabelas 2 e 3 encontram-se os resultados das observações realizadas nos estabelecimentos quanto às formas de exposição das carnes de sol e a presença de vetores, respectivamente.

Na análise geral da Tabela 1 verificou-se que em todos os estabelecimentos que fizeram parte da pesquisa, foram identificadas e isoladas matérias estranhas, muitas delas caracterizadas como prejudiciais à saúde pela Resolução RDC 175/2003<sup>9</sup>.

Nas amostras analisadas foram identificadas matérias estranhas prejudiciais, ou não, à saúde, dos tipos: insetos inteiros ou fragmentos, larvas, pelos de roedor, exúvias, ácaros, bábula de aves, pelos de animais não identificados, fungos filamentosos, e outras matérias, como fragmentos de plástico, barbante, madeira, matéria carbonizada e fragmentos de ossos. Este fato pode indicar que nas mesmas não foram adotadas as Boas Práticas de Fabricação, Armazenamento e Distribuição, necessárias para o controle da contaminação nos produtos alimentícios<sup>10,11</sup>.

As matérias estranhas não mencionadas na Resolução RDC 175/2003<sup>9</sup> como prejudiciais à saúde humana foram identificadas em 23 amostras, enquanto que as matérias estranhas consideradas prejudiciais à saúde pela norma citada, foram encontradas em 32 amostras. As amostras dos estabelecimentos de números 8 e 17 apresentaram a maior quantidade e diversidade de matérias estranhas.

As matérias inanimadas, como fragmentos de plástico, madeira e fragmento de ossos encontradas em 18,2% das amostras, são consideradas perigos físicos e matérias prejudiciais à saúde humana, pois, caso ingeridas, podem causar prejuízos, como lesões e danos ao consumidor.

Os insetos, inteiros ou fragmentos, assim como as larvas e os pelos de roedores são considerados contaminantes físicos e biológicos, na medida em que podem veicular agentes infecciosos para os alimentos, causando agravos à saúde humana<sup>9</sup>.

A presença de insetos inteiros foi detectada em 11,4% das amostras, e os fragmentos destes espécimes foram isolados em 56,8% do total de carnes de sol analisadas. As larvas de insetos foram encontradas em 9,1% das amostras. Santos e Rodrigues<sup>7</sup>, analisando amostras de carne seca e pertences para feijoada, colhidos do comércio varejista, encontraram 28,8% de amostras em condições higiênicas insatisfatórias por conterem insetos inteiros vivos, mortos e seus fragmentos, além de larvas e ácaros. A presença destas matérias pode estar relacionada à maneira com que as carnes de sol ficam expostas ao ambiente, tanto durante os processos de salga e secagem, como nos pontos de venda, aumentando o risco de contaminação destes produtos por insetos, em suas diversas fases de desenvolvimento, como ovos, larvas e pupas. Em geral, os espécimes encontrados, e seus estágios, pertenciam à Ordem Diptera, sendo representados pelas moscas domésticas. Considerando a Resolução RDC 175/03<sup>9</sup>, este tipo de contaminação determina que o produto esteja impróprio para consumo, por estar em desacordo com a legislação vigente.

Os ácaros foram identificados em 4,5% das amostras analisadas. Segundo Ghorham (1987) e Flechtmann, *apud* Santos e Rodrigues<sup>7</sup>, a presença de ácaros em alimentos é consequência do armazenamento inadequado, e os produtos atacados por estes agentes podem constituir-se em sério risco à saúde do homem por causarem distúrbios intestinais, acompanhados ou não de sintomas nervosos, febre e dor.

Os fungos filamentosos foram isolados em 13,6% das amostras. Segundo Baglioni et al<sup>12</sup>, algumas espécies de fungos são termo-resistentes e estão

envolvidas nos processos de deterioração dos alimentos, por provocarem degradação química e alteração de seus componentes, bem como pela produção de metabólitos, interferindo nos parâmetros nutricionais e características sensoriais dos produtos.

A presença de bárbulas, ramificações secundárias das penas das aves, foi detectada em 6,8% das amostras, e pressupõe um fator de contaminação física e, também, microbiológica, uma vez que patógenos, como bactérias, além de ectoparasitas, como ácaros, podem ser carreados por estas estruturas animais<sup>13,14</sup>.

A presença de um cisto sebáceo em uma das amostras pode indicar ausência de cuidados e de padronização nos procedimentos de corte e toailete das carnes utilizadas como matéria prima, para a elaboração das carnes de sol.

Os pelos de roedores foram identificados em 6,8% das amostras. Sua evidência é indicativa da presença e/ou infestação por roedores no estabelecimento, e de que o produto entrou em contato direto com o animal ou com suas fezes, pois, ao lambar-se, o roedor ingere os pelos e os elimina nas fezes. Os roedores são importantes animais portadores da *Salmonella* spp.<sup>15,16,17</sup>, eliminando este agente para o ambiente, juntamente com suas fezes. Observou-se a presença de pelos de animais não identificados em 27,3% das amostras, e de exúvias em 2,3%. Embora não sejam considerados, pela legislação vigente, matérias estranhas prejudiciais à saúde, sua presença é vista como repugnante em alimentos oferecidos ao consumidor.

Para o conjunto de todas as matérias estranhas isoladas, e à luz da definição constante da Resolução RDC 175/03<sup>9</sup>, as amostras onde foram isolados insetos, ou produtos de seu metabolismo, não reconhecidos como vetores mecânicos da Ordem Blattodea e da Ordem Diptera, e outros, como ácaros, fungos e outras matérias estranhas, são consideradas satisfatórias. Apenas dois estabelecimentos, de números 11 e 18, não apresentaram matérias estranhas consideradas prejudiciais à saúde. Os resultados obtidos nas amostras dos demais estabelecimentos configuram tratar-se de produtos impróprios para consumo, por estarem em desacordo com a Resolução RDC175/03<sup>9</sup>. Assim, dos 22 estabelecimentos analisados, 20 (90,9%) apresentaram pelo menos uma amostra de carne de sol imprópria para consumo, devido à presença de matérias estranhas prejudiciais à saúde.

Quanto às formas de exposição das carnes de sol nas “casas do norte” (Tabela 2), observou-se que 90,9% dos

estabelecimentos as mantinham sobre uma superfície do tipo balcão, e 54,5% próximas da porta, favorecendo a deposição de diversos tipos de sujidades oriundas do entorno, como fumaça emitida por escapamentos e partículas de poeira em suspensão, devido à passagem de veículos na via pública.

As amostras provenientes dos estabelecimentos nº16 e 22, encontravam-se próximas a porta, sujeitas a variações de temperatura, facilitando a adição de partículas carbonizadas e a contaminação e proliferação de fungos filamentosos.

As condições observadas nos estabelecimentos, quanto à presença de animais vetores e/ou pragas urbanas, estão apresentadas na Tabela 3.

Em 50,0% dos estabelecimentos identificou-se a presença de vetores mecânicos. Dos vetores, a maior parte identificada foi a mosca doméstica, pertencente à Ordem Diptera, evidenciada nos estabelecimentos de números 1, 4, 5, 6, 7, 11, 12, 16, 21 e 22 sobrevoando a área de venda e/ou os produtos expostos. Confrontando a Tabela 3 com a Tabela 1, observou-se que apenas nas amostras dos estabelecimentos de números 1 e 11 não foram isolados insetos inteiros ou fragmentos, durante as análises macro e microscópicas. Em todos os demais locais onde as moscas foram observadas, os insetos foram, também, evidenciados nas amostras analisadas.

O problema dos vetores mecânicos reside no fato destes animais apresentarem potencial para a disseminação de patógenos. Segundo Thyssen et al<sup>18</sup>, uma das razões dos insetos da ordem Diptera apresentar este potencial é o fato de terem contato muito próximo com o homem e seu ambiente. Estes hábitos, juntamente com o comportamento endofílico (intradomiciliar) e uma grande capacidade de dispersão, lhes confere esta característica. A incriminação das moscas como vetores é feita, principalmente, pelo isolamento de patógenos e pela relação dos picos sazonais da abundância de moscas e prevalência de determinadas enfermidades. Na lista de organismos patogênicos para o homem, isolados em moscas, se incluem bactérias, como *Shigella* sp. e *Vibrio cholerae*, além de vírus entéricos, protozoários e helmintos.

No estabelecimento número 17 havia, também, a comercialização de aves vivas (pássaros) em gaiolas penduradas sobre as carnes de sol, que ficavam expostas sobre uma superfície. Analisando a Tabela 1, verifica-se que em uma amostra deste estabelecimento foi isolada bárbulas de aves, denotando a contaminação física deste produto ofertado ao consumidor, provavelmente oriunda das aves mantidas no estabelecimento.

**Tabela 1.** Distribuição dos resultados das análises macro e microscópicas de carne de sol contendo número e porcentagem de amostras não conformes obtidas em “casas do norte” segundo o número do estabelecimento e os tipos de matérias estranhas encontradas. Diadema – SP, 2008

Nº/ANC	Tipos de Matérias Estranhas Encontradas										Não mencionadas na Resolução RDC 175/2003 <sup>(9)</sup>				
	Consideradas prejudiciais à saúde conforme Resolução RDC 175/2003 <sup>(9)</sup>														
	Insetos inteiros	Fragmentos de insetos	Larvas	Pelos de roedor	Outras matérias estranhas*	Extúvias	Ácaros vivos ou mortos	Pelos de animais não identificados	Bárbula de ave	Fungos filamentosos	Outras matérias estranhas**				
1	a,b	-	-	1 <sup>b</sup>	1 <sup>a</sup>	-	-	1 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-
2	a,b	1 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	1 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-
3	a,b	1 <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	1 <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-
4	a,b	1 <sup>a</sup> , 1 <sup>b</sup>	-	1 <sup>a</sup>	-	1 <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	a,b	1 <sup>b</sup>	1 <sup>a</sup> , 1 <sup>b</sup>	-	-	-	-	1 <sup>a</sup>	-	-	1 <sup>b</sup>	-	-	-	-
6	a,b	1 <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	a,b***	1 <sup>a</sup>	-	-	1 <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 <sup>a</sup>
8	a,b	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	-	-	-	-	1 <sup>b</sup>	-	-	1 <sup>a</sup>	-	-	-	-
9	a,b	1 <sup>b</sup>	1 <sup>a</sup> , 1 <sup>b</sup>	-	1 <sup>a</sup>	-	-	1 <sup>a</sup>	1 <sup>b</sup>	-	1 <sup>a</sup>	-	-	-	-
10	a,b	-	1 <sup>b</sup>	-	-	-	-	1 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-
11	a,b	-	-	-	-	-	-	1 <sup>a</sup> , 1 <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	-
12	a,b	1 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	a,b	-	-	-	1 <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	a,b	-	1 <sup>a</sup> , 1 <sup>b</sup>	1 <sup>a</sup> , 1 <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	a,b	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> , 1 <sup>b</sup>	-	-	-	-	1 <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	-
16	a,b	-	1 <sup>a</sup> , 1 <sup>b</sup>	-	-	-	-	1 <sup>a</sup>	-	1 <sup>b</sup>	-	-	-	-	1 <sup>b</sup>
17	a,b	-	1 <sup>a</sup> , 1 <sup>b</sup>	-	1 <sup>a</sup> , 1 <sup>b</sup>	-	-	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-
18	a,b	-	-	-	-	-	-	1 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-
19	a,b	-	1 <sup>b</sup>	1 <sup>a</sup>	-	-	-	1 <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	-
20	a,b	-	-	-	1 <sup>b</sup>	-	-	-	-	1 <sup>b</sup>	-	-	-	-	-
21	a,b	-	1 <sup>a</sup> , 1 <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 <sup>b</sup>
22	a,b	-	1 <sup>a</sup> , 1 <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	1 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-
T	44	5	25	4	3	8	1	2	12	3	6	Total parcial = 23 amostras (a + b)			
%	100,0%	11,4%	56,8%	9,1%	6,8%	18,2%	2,3%	4,5%	27,3%	6,8%	13,6%	6,8%	9,1%	13,6%	9,1%

Notas: N° = Número do estabelecimento; ANC = Amostras não conformes  
a,b = identificação das amostras em duplicata coletadas nos estabelecimentos  
T = Totais absolutos; % = Totais relativos

\*fragmentos de plástico ou de ossos ou de madeira; \*\*barbante ou matéria carbonizada; \*\*\* Amostra contendo cisto sebáceo; - Ausência de matérias estranhas

**Tabela 2.** Distribuição dos resultados da observação das “casas do norte” fornecedoras de carne de sol segundo as formas de exposição do produto. Diadema – SP, 2008

Nº	Formas de exposição da carne de sol*					
	Pendurada		Sobre superfície (balcão)		Próxima à porta	
1	X		X		X	
2	X		X		X	
3	-		X		X	
4	-		X		X	
5	-		X		-	
6	-		X		-	
7	-		X		-	
8	-		X		-	
9	-		X		-	
10	-		X		-	
11	-		X		-	
12	X		X		-	
13	-		X		-	
14	-		X		X	
15	-		X		X	
16	X		X		X	
17	-		X		X	
18	-		X		X	
19	-		X		X	
20	X		-		X	
21**	-		-		-	
22	-		X		X	
	X	-	X	-	X	-
T	6	16	20	2	12	10
%	27,3%	72,3%	90,9%	9,1%	54,5%	45,4%

Notas: Sim = X ; Não = -

Nº = Número do estabelecimento

T = Totais absolutos; % = Totais relativos

\*Respostas múltiplas.

\*\*Produto exposto em recipiente plástico coberto por papel filme

**Tabela 3.** Distribuição dos resultados da observação das “casas do norte” fornecedoras de carne de sol segundo a presença de vetores e pragas urbanas. Diadema – SP, 2008

Nº	Vetores e Pragas		
	Presença	Animal (is) observado (s)	Local em que foi observado
1	X	Pombos e moscas	Entrada do estabelecimento
2	-	-	-
3	-	-	-
4	X	Mosca doméstica	Interior do estabelecimento
5	X	Mosca doméstica	Interior do estabelecimento
6	X	Mosca doméstica	Interior do estabelecimento
7	X	Mosca doméstica	Interior do estabelecimento
8	-	-	-
9	-	-	-
10	-	-	-
11	X	Mosca doméstica	Interior do estabelecimento
12	X	Mosca doméstica	Interior do estabelecimento
13	-	-	-
14	-	-	-
15	-	-	-
16	X	Mosca doméstica	Sobre os produtos
17*	X	Pássaros em gaiola	Sobre os produtos
18	-	-	-
19	-	-	-
20	-	-	-
21	X	Mosca doméstica	Interior do estabelecimento
22	X	Mosca doméstica	Sobre os produtos
	X	-	
T	11	11	
%	50,0%	50,0%	

Notas: Sim = X ; Não = -

Nº = Número do estabelecimento

T = Totais absolutos; % = Totais relativos

\*Estabelecimento comercializando aves vivas (pássaros) e carnes de sol na mesma área física, com proximidade

## CONCLUSÃO

Concluiu-se que 32 amostras analisadas estavam impróprias para consumo, por conter matérias estranhas prejudiciais à saúde. Pode-se inferir que esta situação foi facilitada pela ausência de embalagem no produto comercializado, e pela não adoção das Boas Práticas de Fabricação, relacionadas ao controle integrado de pragas nos estabelecimentos. A exposição do produto sem embalagem e sobre balcões facilita o ataque de insetos, principalmente moscas, assim como de roedores.

Os resultados obtidos nesta pesquisa permitiram concluir que as carnes de sol comercializadas em 20 (90,9%) “casas do norte”, estavam impróprias para consumo, devido à presença de matérias estranhas prejudiciais a saúde.

A exposição das carnes de sol na porta de entrada dos estabelecimentos e sem nenhuma proteção, propicia condições para a deposição de sujidades oriundas da via pública e dos veículos que circulam no entorno do estabelecimento.

As matérias estranhas encontradas nas amostras, associadas às condições observadas na comercialização das carnes de sol nas “casas do norte”, indicam que estes produtos podem colocar em risco à saúde do consumidor.

---

## AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública – Faculdade de Saúde Pública – Universidade de São Paulo.

Ao orientador desta pesquisa, Prof. Dr. Pedro Manuel Leal Germano.

Ao Centro de Microscopia Alimentar - Instituto Adolfo Lutz de São Paulo.

Ao Laboratório de Entomologia Forense - Instituto Oscar Freire – Universidade de São Paulo.

---

## REFERÊNCIAS

- Costa EL, Silva JA. Qualidade sanitária da carne de sol comercializada em açougues e supermercados de João Pessoa – PB. *Bol. CEPPA*. Curitiba. 1999; 17 (2): 137-44.
- Lira GM, Shimokomaki M. Parâmetros de qualidade da carne de sol e dos charques. *Rev Hig Alim*. 1998; 12 (58): 33-5.
- Souza NL. Efeito da combinação de sal com lactato e diacetato de sódio nas características sensoriais, físico-químicas, cor e textura de um produto similar à carne-de-sol. [dissertação de mestrado]. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, 2005.
- Costa EL, Silva JA. Avaliação Microbiológica da carne de sol elaborada com baixos teores de cloreto de sódio. *Rev Hig Alim*. 2001; 21(2): 149-53.
- Nóbrega DM, Schneider IS. Contribuição ao estudo da carne de sol visando melhorar sua conservação. *Rev Hig Alim*. 1983; 2(3): 150-4.
- Serviço de Informação da Carne [SIC]. Charque, carne de sol, carne seca. Desenvolvido pelo Comitê Técnico do SIC. São Paulo. Disponível em: <http://www.sic.org.br/charque.asp> Acesso em 10 de novembro 2007.
- Santos MC, Rodrigues RMMS. Carnes salgadas: verificação da contaminação por insetos. *Rev Hig Alim*. 1991; 5 (18): 33-6.
- Food and Drug Administration [FDA]. Bacteriological Analytical Manual Online. 2001. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov>
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária [ANVISA]. Resolução RDC nº 175, de 8 de julho de 2003. Aprova o regulamento técnico de avaliação de matérias macroscópicas e microscópicas prejudiciais à saúde humana em alimentos embalados. *Diário Oficial [da] União*. Brasília, DF, 10 jul. de 2003.
- Brasil. Portaria SVS/MS no 326, de 30 de julho de 1997. Regulamenta as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. *Diário Oficial [da] União*. Brasília, DF, 1 ago 1997. Seção I.
- Atui MB, Rodrigues RMMS, Soares JS. Novos rumos em microscopia alimentar. *Bol. Inst Adolfo Lutz*. 2007; 17(1/2): 19-20.
- Baglioni F, Gumerato HF, Masaguer PR. Ocorrência de fungos filamentosos termo-resistentes em polpa de tomate envasada assepticamente. *Ciênc Tec Alim*. 1999; 19 (12): 258-63.
- Costa FN, Rossi Júnior OD. Bactérias do gênero *Aeromonas* em abatedouro de frangos. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2002; 54 (5): 534-5.
- Tucci EC, Guastali EAL, Rebouças MM, Mendes MC, Gama NMSQ. Infestação por *Megninia* spp. em criação industrial de aves produtoras de ovos para consumo. *Arq Inst Biol*. 2005; 72 (1): 121-4.
- Veiga T, Oliveira M da S, Hofer E. *Salmonella* em roedores na cidade do Rio de Janeiro. Congresso Brasileiro de Microbiologia; 1977, Belo Horizonte. Anais. Rio de Janeiro: FEEMA, 1978.
- Carter M.E, Chengappa MM. Enterobacteria. In: Carter ME, Chengappa MM, editors. *Diagnostic Procedures in Veterinary Bacteriology and Micology*. 4. ed. Philadelphia (London):1991.
- Acha PN, Szyfres B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Organización Panamericana de la Salud. Washington: 2003.
- Thyssen PJ, Moretti TC, Ueta MT, Ribeiro OB. O papel dos insetos (Blattodea, Diptera e Hymenoptera) como possíveis vetores mecânicos de helmintos em ambiente domiciliar e peridomiciliar. *Cad Saúde Pública*. 2004; 20 (4) 1096-102.

## Avaliação do perfil microbiológico e microscópico do caldo de cana *in natura* comercializado por ambulantes

### Study on microbiological and microscopic profiles of fresh sugar-cane juice marketed by street vendors

RIALA6/1256

Sonia de Paula Toledo PRADO<sup>1\*</sup>, Alzira Maria Morato BERGAMINI<sup>1</sup>, Eliana Guimarães Abeid RIBEIRO<sup>1</sup>, Mariamélia de Campos Selli CASTRO<sup>1</sup>, Maria Aparecida de OLIVEIRA<sup>1</sup>

\*<sup>1</sup>Endereço para correspondência: Laboratório I de Ribeirão Preto, Instituto Adolfo Lutz, Rua Minas, 877 - Campos Elíseos - CEP 14.085-410, Ribeirão Preto, SP, Brasil. Fax: (16) 3635-7994, Fone: (16) 3625-5046, Ramal 214. e-mail: sptprado@hotmail.com

Recebido: 01.12.2009 – Aceito para publicação: 15.03.2010

#### RESUMO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é a matéria prima constituída basicamente de fibras e caldo. O caldo, conhecido como garapa, é uma bebida de baixo custo, refrescante, energética e muito popular no Brasil. O presente trabalho avaliou a qualidade microbiológica, microscópica e as condições higiênicas durante os procedimentos de manipulação do caldo de cana *in natura*, comercializado por ambulantes em Ribeirão Preto/SP. Foram avaliadas 90 amostras de caldo de cana *in natura*, adquiridas no período de maio de 2007 a janeiro de 2008, quanto ao isolamento de *Salmonella* spp., contagem de coliformes a 35°C e a 45°C, detecção de bolores e leveduras e pesquisa de matérias estranhas. Do total de amostras avaliadas, 31,0% apresentaram coliformes a 45°C acima de 2 (logNMP/mL), porém *Salmonella* spp. não foi isolada em nenhuma das amostras. Quanto aos parâmetros microscópicos, 32,2% estavam em desacordo com a legislação em vigor principalmente em virtude da presença de fragmentos de insetos e de insetos inteiros pertencentes às ordens Hymenoptera (abelhas e formigas), Díptera (moscas domésticas, varejeiras e drosófilas) e Arachnida (aranha). Estes resultados evidenciam as deficiências higiênico-sanitárias durante o procedimento de obtenção do caldo de cana, o qual sugere a necessidade de implantação de programas para capacitação dos manipuladores desse produto.

**Palavras-chave.** caldo de cana, qualidade microbiológica, matérias estranhas, ambulantes, segurança alimentar, legislação.

#### ABSTRACT

Sugar cane (*Saccharum* spp.) is a raw plant, basically consisted of fibers and juice. The juice, also known as 'garapa' in Portuguese, is a cheap, refreshing and energetic beverage that is quite popular in Brazil. The present study aimed at evaluating the microbiological and microscopic quality, and the hygienic conditions of handling procedures for the fresh sugar-cane juice sold by street vendors in Ribeirão Preto/Brazil. Ninety fresh sugar-cane samples were collected during the period between May 2007 and January 2008. *Salmonella* spp. isolation, coliform counts at 35°C and 45°C, and yeast and mold counts were performed, and the occurrence of extraneous foreign matters was investigated. Among the 90 analyzed samples, 31.0% showed coliforms at 45°C above 2 (logMPN/mL), and no *Salmonella* spp. was isolated from any sample. On microscopy analyses, 32.2% of samples did not comply with the current legislation due to the presence of insect fragments and whole insects consisted of the following orders Hymenoptera (bees and ants), Diptera (house flies, blowflies and drosophilas) and Arachnida (spiders). The hygienic-sanitary inadequacy in producing sugar-cane juice could be evidenced, thus, it might be inferred the need for establishing specific food-handlers training programs.

**Key words.** sugar-cane juice, microbiological quality, extraneous materials, street vendors, food safety, legislation.

## INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), gramínea originária do Sudeste Asiático, é considerada uma das culturas agrícolas mais importantes das regiões tropicais e subtropicais, para a obtenção de açúcar, álcool e aguardente<sup>1,2</sup>.

No Brasil, a cana-de-açúcar foi trazida da Ilha da Madeira, pelos portugueses, em 1502, tornando-se rapidamente uma fonte de riquezas, hoje o país lidera a lista dos 80 países produtores de cana-de-açúcar, com 25% da produção mundial<sup>2-4</sup>. Alguns de seus produtos, como o caldo de cana, o melaço e a rapadura são muito consumidos no Brasil devido ao seu baixo custo e potencial calórico. Através da produção de álcool etílico (PROÁLCOOL), a cana-de-açúcar passou a ser de grande importância para a economia nacional e expandiu-se por todos os estados brasileiros, principalmente em São Paulo tornando-se parte integrante da vida do povo brasileiro, tanto na indústria, como nas residências<sup>2,5,6</sup>.

Em 2008, na região Centro-Sul a produção foi da ordem de 425 milhões de toneladas de cana, recorde histórico no Brasil, colocando o país como maior produtor desta gramínea no mundo, seguido da Índia e da Austrália<sup>5</sup>. Isto representa um crescimento acima de 12% em relação à safra de 2006/2007, que já acumulava crescimento da ordem de 10% em relação à safra 2005/2006<sup>7</sup>.

A expansão da área de plantio em 13,8%, reflexo dos novos projetos que estão sendo implantados no país para atender a demanda de álcool, é a principal responsável pelo aumento da produção. O Estado de São Paulo é responsável por 57,0% da produção brasileira (337,1 milhões de toneladas), e apresentou um crescimento de 14,1% na produção em relação a 2007. No entanto, a Região Centro-Oeste é a que mais cresce, com os Estados de Mato Grosso do Sul, Goiás e Mato Grosso, apresentando aumentos na produção de 39,5%, 29,9%, e 9,2%, respectivamente<sup>6</sup>.

Para a safra 2008/2009, a estimativa é de 11,27 milhões de toneladas para a demanda doméstica e de 18,8 milhões de toneladas para exportação. O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de açúcar e de álcool, respondendo por 42% das exportações mundiais de açúcar e 63% das exportações mundiais de álcool<sup>8</sup>.

A cana-de-açúcar é composta por bagaço e caldo, sendo o bagaço constituído principalmente de fibras. O caldo é uma solução de água, açúcares, cinzas e materiais nitrogenados, obtido pela prensagem da cana-de-açúcar. A cana contém em média 18% de matéria seca. Os carboidratos do caldo de cana são altamente digestíveis. Os valores de

energia estão em torno de 661 kcal de energia digestível e 637 kcal de energia metabolizável por Kg. O conteúdo dos minerais Fe, K, Na e Mg é elevado, porém bastante variável. Por ser rico em carboidratos e pobre em proteínas, o caldo de cana é considerado um alimento energético<sup>9</sup>.

Aliado à grande aceitação popular, baixo custo e fácil comercialização, o caldo de cana também tem sido objeto de investigações científicas com o intuito de se comprovar a sua eficácia para a recuperação significativa da massa muscular de atletas. No estudo realizado por Stancanelli et al<sup>10</sup> foi comprovado o efeito ergogênico do caldo de cana na reposição dos estoques de glicogênio muscular de jogadores de futebol após os treinos.

Contudo, a cana-de-açúcar reúne condições nutricionais adequadas à multiplicação de microrganismos, destacando-se as bactérias lácticas, devido as suas características de tolerância a baixo pH e altos teores de açúcares.

A produção do caldo de cana consiste de um pequeno número de operações, porém, o processo é crítico e pode levar a introdução de microrganismos, ou a multiplicação daqueles já presentes na cana. Além disso, os resíduos do processo são geralmente deixados perto da moenda atraindo insetos e animais, fatores estes que podem favorecer a ocorrência de Enfermidades Transmitidas por Alimentos (ETA)<sup>3,4,11-13</sup>.

Em 1990 já havia relatos sobre a viabilidade do *Trypanosoma cruzi* no caldo-de-cana, podendo transmitir a doença de Chagas por via oral<sup>14,15</sup>. Contudo, a preocupação das autoridades de saúde pública com o consumo do caldo de cana só destacou-se a partir de 2005, devido à ocorrência de vários casos de doença de Chagas no Estado de Santa Catarina, relacionados ao consumo desta bebida contendo formas viáveis do *Trypanosoma cruzi*<sup>16</sup>. A partir deste acontecimento, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou a Resolução – RDC nº 218, de 29 de julho de 2005<sup>17</sup>, que dispõe sobre o Regulamento Técnico de Procedimentos Higiênico-Sanitários para Manipulação de Alimentos e Bebidas preparados com vegetais, independentemente de se constituírem estabelecimentos com instalações fixas ou provisórias.

A região de Ribeirão Preto-SP possui solo fértil e clima quente, condições necessárias para o desenvolvimento da cultura da cana, o que também favoreceu a expansão do comércio da garapa pelos ambulantes da cidade, além de se tratar de uma bebida de grande aceitação pela população, principalmente nas épocas mais quentes do ano. Entretanto, tal comércio é realizado comumente por vendedores ambulantes que

não possuem instalações compatíveis e conhecimentos adequados sobre cuidados de higiene na preparação da bebida, e a sua comercialização nas ruas representa um risco potencial para a saúde do consumidor<sup>1,18,19</sup>.

As variedades de cana mais usadas são CO 413 (conhecida como cana-manteiga), SP 454 e SP 3250, sendo esta última a mais utilizada e de preferência dos ambulantes por manter o caldo sempre claro, mesmo após o período de moagem. Na maioria dos pontos de comercialização é utilizado feixes de 12 a 14 quilos de cana, já limpos e raspados, oriundos da região de Cajuru/SP. A variedade com menor quantidade de agrotóxico aplicada em seu cultivo e mais macia para moagem é a SP 3250. A cana não pode ser estocada e o corte deve ser recente. Em Ribeirão Preto/SP cerca de 4.200 fardos são fornecidos aos garapeiros, sendo consumidos pela população aproximadamente mais de 30 mil litros mensais<sup>20</sup>.

Diante do exposto e das lacunas existentes na literatura, principalmente com relação à pesquisa de matérias estranhas, este trabalho teve por objetivos avaliar o perfil microbiológico e microscópico, bem como os procedimentos higiênico-sanitários durante a manipulação para obtenção do caldo de cana *in natura* comercializado por ambulantes em Ribeirão Preto/SP.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material

Foram avaliadas 90 amostras de caldo de cana *in natura*, sem gelo, adquiridas de vendedores ambulantes distribuídos em diferentes pontos de comercialização no município de Ribeirão Preto, no período de maio de 2007 a janeiro de 2008.

As amostras foram coletadas em sacos ou embalagens plásticas de primeiro uso fornecidas pelo próprio ambulante, sendo transportadas em caixas isotérmicas e mantidas sob refrigeração até o início das análises, as quais foram realizadas nos Setores de Microbiologia e Microscopia de Alimentos do Instituto Adolfo Lutz – Laboratório Regional de Ribeirão Preto/SP.

### Métodos

#### Análises microbiológicas

As análises microbiológicas realizadas foram: pesquisa de *Salmonella* spp. de acordo com o método de Andrews et al<sup>21</sup>, quantificação de coliformes a 35°C e a 45°C e enumeração de bolores e leveduras.

A determinação do NMP de coliformes a 35°C e a 45°C foi realizada de acordo com a metodologia recomendada por Kornacki e Johnson<sup>22</sup>, utilizando-se o caldo Lauryl Tryptose e o Caldo EC. O NMP de coliformes a 35°C e a 45°C por mL do caldo de cana foi calculado utilizando-se tabela de conversão para 3 tubos (NMP/mL e intervalo de confiança de 95%)<sup>23</sup>.

As populações de bolores e leveduras foram enumeradas por método convencional, segundo Beauchat & Cousin<sup>24</sup>, utilizando-se Potato Dextrose Ágar acidificado com ácido tartárico 10%. Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônias por mililitro de caldo de cana (UFC/mL).

#### Análise microscópica

##### - Determinação de matérias estranhas

Foram pesquisadas sujidades leves através do método descrito pela *Association of Official Analytical Chemists* (A.O.A.C)<sup>25</sup> modificado. Foram utilizados 250 mL da amostra que foi extraída por duas vezes com 40 mL de óleo mineral em frasco armadilha de Wildman. Após filtração da camada oleosa, o material foi examinado ao microscópio estereoscópico e, quando necessário, as dúvidas foram confirmadas ao microscópio óptico composto.

Foram pesquisados larvas e ovos de insetos. O resíduo do frasco armadilha foi transferido para uma peneira ASTM / ABNT n° 140, lavado com água filtrada até a água de lavagem tornar-se límpida e, em seguida, o material retido na peneira foi filtrado a vácuo em tecido escuro e examinado ao microscópio estereoscópico. As análises foram realizadas em duplicata e os resultados expressos como a média aritmética das duas determinações.

##### Check list para verificação dos procedimentos durante a manipulação do caldo de cana

Com base no Regulamento Técnico de Procedimentos Higiênico-Sanitários para Manipulação de Alimentos e Bebidas Preparadas com Vegetais (Resolução RDC n° 218/2005, da ANVISA/MS)<sup>17</sup> realizou-se uma pesquisa com os ambulantes através da aplicação de um *check list* direcionado e observações do pesquisador no momento da aquisição da garapa. Esta pesquisa teve por finalidade avaliar as condições higiênico-sanitárias da cana-de-açúcar, do local de processamento e comercialização da garapa e dos manipuladores do produto.

Os principais quesitos observados abrangiam: aspectos da higiene pessoal e do ambiente, presença de insetos e/ou animais, condições do equipamento de



moagem, origem e tempo de aquisição da cana e limpeza e desinfecção da moenda.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 90 amostras de caldos de cana analisadas, 31% estavam em desacordo com as legislações em vigor nas análises microbiológicas e 32,2% quanto aos parâmetros microscópicos.

### Avaliação microbiológica

Os resultados obtidos nos ensaios de avaliação do perfil microbiológico do caldo de cana *in natura* foram comparados com os padrões estabelecidos pela legislação brasileira<sup>26</sup> para pesquisa de *Salmonella* spp. e coliformes a 45°C e também com dados de pesquisas realizadas no Brasil<sup>1,3,4,12,13</sup> para todos os microrganismos avaliados.

Observa-se na Tabela 1 que 28 (31%) amostras apresentaram coliformes a 45°C acima de 2 log NMP/mL, estando em desacordo com a Resolução RDC nº 12/2001, ANVISA/MS<sup>26</sup> quanto aos padrões microbiológicos.

**Tabela 1.** Populações de coliformes a 35°C e a 45°C, bolores e leveduras em amostras de caldo de cana comercializadas no município de Ribeirão Preto, SP/Brasil

População	Número de amostras			
	Coliformes a 35°C (log NMP/mL)	Coliformes a 45°C (log NMP/mL)	Bolores* (log UFC/mL)	Leveduras* (log UFC/mL)
< 1	8	38	3	0
1 -  2	10	24	0	0
2 -  3	16	14	6	0
3 -  4	56	14	35	0
4 -  5	0	0	40	12
5 -  6	0	0	3	66
≥ 6	0	0	0	9

\*Três amostras prejudicadas

Populações de bolores e leveduras maiores que 4 log UFC/mL foram encontradas em 43 (47,8%) e 87 (96,7%) amostras, respectivamente, e populações de coliformes a 35°C entre 3 e 4 log NMP/mL foram verificada em 56 (62,2%) amostras analisadas. Padrões microbiológicos para a presença destes microrganismos em caldo de cana *in*

*natura* não estão previstos na legislação brasileira em vigor<sup>26</sup>. Por outro lado, altas populações de bolores e leveduras contribuem para a redução da vida útil do alimento. Tem sido preconizado que alimentos com elevadas populações de microrganismos indicadores podem apresentar alterações organolépticas, riscos de deteriorações e toxinfecções, além da perda do valor nutricional, tornando-se, portanto, impróprios para o consumo humano<sup>27</sup>.

As populações de coliformes a 45°C variaram de menor que 1 a 4 log NMP/mL, com presença em 81,1% das amostras de caldo de cana analisadas. Lopes et al<sup>13</sup> analisaram 30 amostras de caldo de cana comercializado nas ruas da cidade de Curitiba/PR e isolaram coliformes a 45°C acima do valor máximo (2 log NMP/mL) tolerado pela legislação em vigor<sup>26</sup> em apenas 1 (3,3%) amostra. Em outro estudo, Hoffmann et al<sup>4</sup>, avaliaram 11 amostras de caldo de cana comercializado no município de São José do Rio Preto/SP e encontraram também, apenas uma amostra com população de coliformes a 45°C maior que 2 log NMP/mL.

Neste estudo, foi isolado coliformes a 45°C com populações acima de 2 log NMP/mL em 28 (31%) amostras analisadas. Estes valores estão próximos aos encontrados por Oliveira et al<sup>12</sup> que de 24 amostras de garapa avaliadas na cidade de São Carlos/SP, 25% foram consideradas insatisfatórias quanto à presença de coliformes a 45°C. Alguns autores relatam alto número de amostras insatisfatórias quanto à presença destes microrganismos. No estudo desenvolvido por Cardoso et al<sup>1</sup>, coliformes termotolerantes estavam presentes acima de 2 log NMP/mL em 62 (64,6%) amostras avaliadas.

Nossos resultados foram negativos para a presença de *Salmonella* spp. e estão de acordo com a maioria dos resultados encontrados na literatura brasileira<sup>1,3,4,12,13</sup>.

A presença de microrganismos em produtos obtidos e comercializados de maneira informal como, por exemplo, a garapa, sugere que a contaminação tenha origem na manipulação ou mesmo na contaminação cruzada através de equipamentos e utensílios utilizados para a obtenção do caldo.

### Análise microscópica

Dentre as 90 amostras de caldos de cana analisadas, 29 (32,2%) estavam em desacordo quanto aos parâmetros microscópicos. De acordo com a Resolução RDC nº 218/2005, da ANVISA/MS<sup>17</sup>, quaisquer substâncias ou agentes de origem biológica, química ou física, estranhos aos alimentos e às bebidas que sejam considerados nocivos à saúde humana ou que comprometam a sua integridade são considerados contaminantes.

Alguns estudos já foram realizados com relação à avaliação microbiológica do caldo de cana, porém, são escassas as pesquisas relacionadas à avaliação microscópica, sendo, portanto, um estudo inédito. A pesquisa de matérias estranhas, realizada através da análise microscópica, fornece informações relevantes a respeito das condições sanitárias da matéria-prima, da manipulação, do ambiente, dos equipamentos e utensílios e da higiene no processamento da bebida. Na Tabela 2, observam-se os vários tipos e frequência de matérias estranhas que foram identificadas. A maior porcentagem de contaminação ocorreu devido à presença de fragmentos diversos como asas, patas e antenas de insetos, seguido da contaminação por pelos de roedores e fibras sintéticas. A presença de pelos de roedores em 4,4% das amostras evidencia falhas na proteção das matérias-primas, utensílios, equipamentos ou mesmo na higiene e limpeza dos veículos de transporte ou barracas fixas que são utilizadas para a comercialização da garapa, acontecendo dessa forma a contaminação acidental. A Organização Mundial da Saúde (OMS) já catalogou cerca de 200 doenças transmissíveis por roedores, destacando-se a leptospirose, tifo, peste bubônica, febre hemorrágica, salmonelose, sarnas, micoses, entre outras, além de contaminarem os alimentos com suas fezes, urina e pelos.

**Tabela 2.** Distribuição de frequências das amostras de caldo de cana *in natura* em desacordo com a legislação em vigor\*, segundo o tipo de matéria estranha. Ribeirão Preto, SP/Brasil

Tipos de matérias estranhas	Amostras (n = 90)	
	N	%
Pelo de roedor	03	(3,3)
Pelo de roedor + abelha	01	(1,1)
Fragmentos de inseto	09	(10,0)
Ácaros	03	(3,3)
Insetos mortos	03	(3,3)
Fibras sintéticas	04	(4,4)
Filamentos metálicos	02	(2,2)
Areia, terra + partículas carbonizadas	02	(2,2)
Pelos não identificados	02	(2,2)
Total	29	(32,2)

\*Resolução RDC nº 218/2005, da ANVISA/MS

N = número de amostras em desacordo com a legislação em vigor

n = número total de amostras analisadas

Os insetos inteiros observados pertenciam às Ordens Hymenoptera (abelhas e formigas), Diptera (moscas domésticas, varejeiras e drosófilas) e Arachnida (aranha), constatados próximos às moendas de extração, utensílios e aos resíduos do lixo e dos bagaços de cana.

Estudos dessa natureza que avaliam a contaminação por pragas e vetores contribuem de maneira significativa para a melhoria de alimentos/bebidas à base de vegetais, principalmente quando esses produtos considerados de risco podem servir como veículos da transmissão oral da Doença de Chagas Aguda (DCA). Apesar de ser considerada esporádica e circunstancial, a contaminação pode ocorrer durante as etapas de colheita, armazenamento, transporte e preparação e tem se tornado frequente em diversos estados brasileiros, principalmente na Região Norte, devido ao consumo do açaí fresco. Em 2005, um surto relacionado ao consumo de caldo de cana foi detectado no Estado de Santa Catarina, onde das 24 pessoas infectadas, três foram a óbito<sup>28</sup>.

#### Avaliação do *check list*

Tendo por base as observações realizadas nos pontos de venda, observou-se que a qualidade higiênico-sanitária deste tipo de comércio é muito precária. A maioria dos ambulantes apresentava poucos conhecimentos sobre os cuidados básicos de higiene. Foi alto o percentual de locais com condições higiênicas mínimas, sendo que os próprios vendedores não utilizavam aventais e gorros, desprezavam o bagaço da cana no chão ou em lixo sem tampa, manipulavam o caldo e dinheiro ao mesmo tempo e raramente preocupavam-se em lavar as mãos.

No item limpeza e desinfecção da moenda, verificou-se que a maioria (61%) dos ambulantes utilizava somente água, demonstrando desse modo desconhecimento das práticas corretas de higienização, assim como a ausência de uma devida proteção nas instalações de venda, pois a presença de insetos e ou/animais domésticos foi observada em 56,3% dos locais avaliados.

No Brasil, outros estudos, tais como o de Oliveira et al<sup>29</sup> também constataram várias deficiências nas condições de comércio do caldo de cana. Naquele estudo, os autores desenvolveram um *check list* com 70 vendedores ambulantes de caldo de cana e confirmaram a existência de uma capacitação profissional deficiente entre a maioria dos manipuladores, infraestrutura geralmente inadequada e pouco conhecimento sobre os cuidados higiênico-sanitários a serem utilizados para garantir a boa qualidade do produto disponibilizado ao consumidor.

**Tabela 3.** Origem da cana de açúcar e itens utilizados para avaliar as condições de higiene dos locais, ambulantes e equipamentos de produção do caldo de cana na cidade de Ribeirão Preto, SP/Brasil

Itens avaliados	Parâmetros considerados	N (%)
Higiene pessoal	Boa	44 (50,6%)
	Regular	38 (43,7%)
	Ruim	5 (5,7%)
Higiene do ambiente	Boa	52 (59,8%)
	Regular	22 (25,3%)
	Ruim	13 (14,9%)
Origem da cana	Não sabe	15 (17,2%)
	Cajuru/SP	67 (77,0%)
	Brodowski/SP	5 (5,7%)
Presença de insetos e/ou animais domésticos	Sim	49 (56,3%)
	Não	38 (43,7%)
Limpeza e desinfecção da moenda	Água	53 (61,0%)
	Água e sabão	13 (14,9%)
	Água e cloro	8 (9,2%)
	Limão, pano seco ou não faz	13 (14,9%)

Obs.: Não foram obtidas informações de três pontos de venda

## CONCLUSÃO

Estes resultados evidenciam deficiências higiênico-sanitárias no processo de obtenção do caldo de cana comercializado de maneira informal na maioria dos locais avaliados. Este fato expõe os consumidores a elevado risco de contrair *Enfermidades Transmitidas por Alimentos*. A presença de altas populações de coliformes a 45°C, que são indicadores de condições higiênico-sanitárias deficientes, aliados a números elevados de bolores e leveduras constatados neste estudo, apontam para possíveis falhas nas condições de processamento e/ou armazenamento, uma vez que se observou que a cana-de-açúcar pronta para o uso já estava previamente descascada e era mantida no ambiente, sem qualquer proteção para evitar o acesso de vetores. É importante mencionar a necessidade de programas de capacitação e treinamento para os comerciantes ambulantes, como forma de orientar as práticas de higiene e técnicas adequadas de manipulação e armazenamento da matéria prima, para manter a qualidade de produção do caldo de

cana, levando assim a garantir a segurança alimentar deste produto e resguardando a saúde dos consumidores.

## REFERÊNCIAS

- Cardoso RCV, Leite CC, Guimarães AG, Mascarenhas J, Boulhosa RSS, Costa GOB et al. Análise microbiológica de caldos de cana vendido em distritos sanitários da cidade de Salvador-BA. Encontro Nacional de Analistas de Alimentos (ENAAL); 2007; Fortaleza, CE [resumo expandido em CD-ROM].
- Faculdade de Saúde Pública/USP. 2002. O uso de caldo de cana em preparações culinárias. [acesso em 7 de janeiro de 2009.]. Disponível em: [http://www.fsp.usp.br/hnt/cana\_de\_acucar.htm]
- Kitoko PM, Oliveira AC, Silva ML, Lourenção M, Aguiar EF. Avaliação microbiológica do caldo de cana comercializado em Vitória, Espírito Santo, Brasil. *Rev Hig Alim*. 2004; 18 (119): 73-7.
- Hooffmann P, Reis JA, Castro LP, Hooffmann FL. Qualidade microbiológica de amostras de caldo de cana comercializadas no município de São José do Rio Preto, SP. *Rev Hig Alim*. 2006; 20(143): 79-83.
- Zanotti NE. Estudo Setorial: cana-de-açúcar. Plano estratégico de desenvolvimento da agricultura capixaba (NOVO PEDEAG 2007-2025). Vitória, ES. [acesso em 7 de janeiro de 2009.]. Disponível em: [http://www.seag.es.gov.br/pedeg/setores/cana.pdf].
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Levantamento sistemático da produção agrícola: comentários – Lavouras. [acesso em 27 de outubro de 2009.]. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default.shtml].
- Perina Júnior I. Cana-de-açúcar: O que esperar para 2008? *Rev Canavieiros*. 2008; 19ª ed.: 9.
- Observatório Econômico do Setor Sucroalcooleiro – Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade - FEA-RP/USP. [acesso em 27 de outubro de 2009.]. Disponível em: [http://www.observatoriodacana.org/node/258].
- Bertol TM. Utilização do caldo de cana na Alimentação de Suínos. Instrução Técnica para o suinocultor. EMBRAPA-CNPISA, 1997. [acesso em 26 de outubro de 2008.]. Disponível em: [http://www.cnpisa.embrapa.br/sgc/sgc\_publicacoes/publicacao\_p5155b7.pdf].
- Stancanelli M. Efeito ergogênico do caldo de cana. [dissertação de mestrado]. Campinas, São Paulo: Universidade de Campinas; 2006.
- Nascimento AR, Mouchrek VEF, Mouchrek JEF, Martins AGLA, Marinho SC, Barbosa RS. Perfil microbiológico do caldo de cana comercializado em São Luís, MA. *Rev Hig Alim*. 2006; 20(141): 83-6.
- Oliveira ACG, Seixas ASS, Souza CP, Souza CWO. Avaliação microbiológica do caldo de cana comercializado em ruas e condições de manuseio de manipuladores em São Carlos, São Paulo, Brasil. *Cad Saúde Públ*. 2006; 22(5): 1111-4.
- Lopes G, Cresto R, Carraro CNM. Análise Microbiológica de caldos de cana comercializados nas ruas de Curitiba, PR. *Rev Hig Alim*. 2006; 20(147): 40-4.

14. Pinto PLS, Neto VA, Nascimento SAB, Souza HBWT, Miyamoto A, Moreira AAB et al. Observações sobre a viabilidade do *Trypanosoma cruzi* no caldo de cana. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1990; 32(5): 325-7.
15. Cardoso AVN, Lescano SAZ, Neto VA, Gakiya E, Santos SV. Survival of *Trypanosoma cruzi* in sugar cane used to prepare juice. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2006; 48(5): 287-9.
16. Agência Nacional de Vigilância Sanitária [ANVISA]. Plantando Saúde: resolução estabelece normas de higiene para alimentos e bebidas à base de vegetais. *Rev Saúde Públ*. 2005; 39(5): 861-4.
17. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária [ANVISA] do Ministério da Saúde. Resolução - RDC nº 218, de 29 de julho de 2005. Dispõe sobre o regulamento técnico de procedimentos higiênico-sanitários para manipulação de alimentos e bebidas preparados com vegetais. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 1 ago. 2005. Seção 1*.
18. Soccol CR, Schwab A, Kataoka CE. Avaliação microbiológica do caldo de cana (garapa) na cidade de Curitiba. *Bol Centro Pesq Process Aliment (CEPPA)*. 1990; 8(2): 116-25.
19. Carvalho LR, Magalhães JT. Avaliação da qualidade microbiológica dos caldos de cana comercializados no centro de Itabuna – BA e práticas de produção e higiene de seus manipuladores. *Rev Baiana Saúde Públ*. 2007; 31(2): 238-45.
20. Savenhago I. A tradição da garapa. *Gazeta de Ribeirão Preto*. 06 de maio de 2007. p. 25-26.
21. Andrews WH, Flowers RS, Silliker J, Bailey JS. *Salmonella*. In: Downes FP, Ito K (eds). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4 ed. Washington, DC: American Public Health Association (APHA); 2001. p. 357-80.
22. Kornacki JL, Johnson JL. Enterobacteriaceae, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: Downes FP, Ito K (eds). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4<sup>a</sup> ed. Washington, DC: American Public Health Association (APHA); 2001. p. 69-82.
23. Swanson KMJ, Petran RL, Hanlin JH. Culture methods for enumeration of microorganisms. In: Downes FP, Ito K (eds). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4<sup>a</sup> ed. Washington, DC: American Public Health Association (APHA); 2001. p. 53-62.
24. Beuchat LR, Cousin MA. Yeasts and Molds In: Downes FP, Ito K (eds). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4<sup>a</sup> ed. Washington, DC: American Public Health Association (APHA), 2001, p. 209-16.
25. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 18th ed., Gaithersburg, 2005. cap. 16. (1 CD-Rom).
26. 26. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária [ANVISA] do 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, Poder Executivo, Brasília, DF, p. 45-53, 10 jan. 2001. Seção 1*.
27. Sousa CP. Segurança alimentar e doenças veiculadas por alimentos: utilização do grupo coliforme como um dos indicadores de qualidade de alimentos. *Rev At Prim Saúde*. 2006; 9(1): 83-8.
28. Agência Nacional de Vigilância Sanitária [ANVISA]. Informe Técnico nº 35 de 19 de jun. 2008: Gerenciamento do Risco Sanitário na Transmissão de Doenças de Chagas Aguda por Alimentos. [acesso em 27 de outubro de 2009.]. Disponível em: [[http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/35\\_190608.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/35_190608.htm)].
29. Oliveira ACG, Nogueira FAG, Zanão CFP, Souza CWO, Spoto MHF. Análise das condições do comércio de caldo de cana em vias públicas de municípios paulistas. *Rev Segur Alim Nutric*. 2006; 13(2): 6-18.

## Avaliação dos itens obrigatórios na rotulagem nutricional de produtos lácteos fermentados

### Evaluation of mandatory nutritional information on labels of fermented dairy products available at the market

RIALA6/1257

Aline Zago de GRANDI<sup>1</sup>, Daise Aparecida ROSSI<sup>2\*</sup>

\*<sup>2</sup>Endereço para correspondência: Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Av. Ceará s/n - Bloco 2D, sala 43 - FAMEV/LABIO, Umuarama, CEP 38402-018, Uberlândia, MG, Brasil

<sup>1</sup>Laboratório de Biopolímeros, Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto, SP, Brasil. e-mail: liny\_bio@yahoo.com.br

Recebido: 12.03.2009 – Aceito para publicação: 18.03.2010

#### RESUMO

O objetivo deste estudo foi de comparar as informações e os valores descritos nos rótulos de produtos lácteos fermentados com aqueles exigidos pela legislação em vigor, assim como de efetuar considerações sobre o comprometimento da informação nutricional da forma como recomendada pela Resolução RDC n°360/03 ANVISA/MS. Foram analisados 114 rótulos de iogurte e 28 rótulos de bebida láctea fermentada de diferentes sabores e composições nutricionais, de 10 marcas e/ou fabricantes de iogurte e de sete marcas de bebida láctea fermentada. As amostras foram adquiridas na qualidade de consumidor, durante o período de julho a dezembro de 2007, em supermercados da cidade de Uberlândia-MG. Os produtos foram analisados quanto aos princípios gerais de rotulagem, apresentação da informação nutricional e dos dados básicos obrigatórios no rótulo de produto alimentício. A maioria dos rótulos dos produtos analisados estava em desacordo com a legislação vigente; 97,4% dos rótulos de iogurte e 100% de rótulos de bebida láctea fermentada estavam incompletos, com omissão de alguns constituintes ou erroneamente especificados. Em virtude das informações obrigatórias exigidas pela legislação vigente, é questionável o compromisso das indústrias de alimentos na apresentação dos dados quanto aos constituintes nutricionais, uma vez que os rótulos das amostras analisadas não foram apresentados conforme os dispostos pela Resolução RDC n° 360/03.

**Palavras-chave.** bebida láctea, informação nutricional, iogurte, legislação.

#### ABSTRACT

The present study aims at comparing the nutritional contents and their values indicated on the labels of fermented dairy products with those required by the legislation in force. Considerations on the food industries commitment related to the nutritional information as ruled by Resolution RDC #360/03 ANVISA/MS were deliberated. One hundred-fourteen yoghurt labels and 28 labels of fermented dairy beverages with different flavors and compositions from 10 yoghurt brands and/or manufacturers and seven brands of fermented dairy beverages could be analyzed. The samples were purchased as customers, from July to December 2007, in supermarkets at the city of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. The analyses of labels on the products samples consisted of assessing the general features of labeling, the nutritional information display, and the compulsory basic contents on the food labels. Most of the analyzed food labels did not comply with the specific legislation in force, thereby, 97.4% of yoghurt labels and 100% of labels on fermented dairy beverage showed lack of basic information, by either omitting some constituents from the list or erroneously specifying the required components or characteristics. In view of the mandatory information required by the legislation in force, The food industries commitment as per the nutritional information is questionable since the present investigation showed that the analyzed food labels did not comply with those ruled by Resolution RDC #360/03.

**Key words.** dairy beverage, nutritional information, yoghurt, legislation.

## INTRODUÇÃO

O interesse por produtos alimentícios saudáveis, com amplo valor nutricional e de grande aproveitamento, tem crescido mundialmente, abrangendo também o setor de produtos lácteos fermentados. O processo fermentativo é importante, pois aumenta a vida de prateleira do leite “*in natura*” e torna o produto mais nutritivo, além de protegê-lo contra a deterioração e proliferação de microrganismos patogênicos.

Os leites fermentados são definidos como produtos resultantes da fermentação do leite pasteurizado ou esterilizado, por fermentos lácteos próprios, de acordo com a Resolução 05/2000 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento<sup>1</sup>. A mesma legislação descreve como iogurte o produto incluído na definição de leites fermentados cuja fermentação se realiza com cultivos protossimbóticos de *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, aos quais podem-se acompanhar, de forma complementar, outras bactérias ácido-lácticas que por sua atividade contribuem para a determinação das características do produto final.

Bebida láctea fermentada é o produto lácteo resultante da mistura do leite e soro de leite, adicionado ou não de produtos ou substâncias alimentícias, gordura vegetal, leites fermentados, fermentos lácteos selecionados e outros produtos lácteos. Fermentada mediante a ação de cultivo de microrganismos específicos e/ou adicionado de leite(s) fermentado(s) e que não poderá ser submetida a tratamento térmico após fermentação. A base láctea deve representar pelo menos 51% (m/m) do total de ingredientes do produto<sup>2</sup>.

Em termos de composição geral, todos os produtos lácteos fermentados têm um valor nutricional correspondente à composição do leite a partir do qual eles são fabricados, apesar de pequenas diferenças na concentração de alguns constituintes químicos devido à tecnologia de fabricação envolvida e ao processo de fermentação. As principais alterações são uma considerável formação de ácido láctico e uma conseqüente diminuição da lactose, um aumento de conteúdo de moléculas livres como pequenos peptídeos, aminoácidos e ácidos graxos. Ainda, a composição destes produtos pode ser modificada e integrada também com alguns ingredientes de outras origens, como frutas (polpa ou pedaços) e/ou açúcar<sup>3</sup>. Outro fator é a adição de leite em pó, normalmente feita para aumentar os sólidos do leite, o que permite maior conteúdo proteico<sup>4</sup>.

Há uma tendência geral por parte dos consumidores, em conhecer o valor nutricional dos

alimentos industrializados, principalmente, no tocante a quantidade de calorias, gorduras, minerais e outros nutrientes que possam trazer algum tipo de benefício ou prejuízo àquele que o consome<sup>5,6</sup>. Desta forma, o esclarecimento do consumidor é sempre vantajoso, o qual poderá valer-se de informações completas, estando ciente do quanto deve ingerir diariamente de certo produto para manter uma dieta saudável.

De acordo a Lei 8078/90 do Código de Proteção e Defesa do Consumidor, é por meio do rótulo dos alimentos que o consumidor tem acesso a informações como quantidade, características nutricionais, composição e qualidade, bem como sobre os riscos que os produtos podem apresentar<sup>7</sup>.

Segundo a Resolução RDC nº259/02, que estabelece o Regulamento Técnico para Rotulagem de Alimentos Embalados, rotulagem é toda inscrição, legenda, imagem, matéria descritiva ou gráfica, escrita, impressa, estampada, gravada em relevo, litografada ou colada sobre a embalagem do alimento<sup>8</sup>. Esta não deve utilizar vocábulos, sinais, denominações, símbolos ou outras representações gráficas que induzam o consumidor a equívocos ou erro em relação à verdadeira natureza do alimento. A evolução da rotulagem de alimentos, visando sua melhor compreensão, reforça a necessidade de controle pelos órgãos competentes e o compromisso por parte da indústria alimentícia em oferecer qualidade às informações declaradas.

Considera-se na Resolução RDC nº360/03 que a rotulagem nutricional é toda descrição destinada ao consumidor sobre as propriedades nutricionais de um alimento, compreendendo a declaração do valor energético e dos nutrientes, e também a declaração das propriedades nutricionais (Informação nutricional complementar). Com isso, a informação nutricional deve mencionar: valor energético, carboidratos, proteínas, gorduras totais, gorduras saturadas, gorduras trans, fibra alimentar e sódio, obedecendo à ordem aqui descrita. As unidades de medida que devem ser utilizadas são: quilocaloria (kcal) e quilojoules (kJ), para o valor energético; gramas (g), para proteínas, carboidratos, gorduras e fibra alimentar; e miligrama (mg), para sódio. Os demais componentes, de declaração voluntária, como vitaminas e minerais, podem ser expressos em miligramas (mg) ou microgramas (µg) conforme descrito na Tabela de Ingestão Diária Recomendada (IDR), em anexo na referida Resolução<sup>9</sup>.

A informação nutricional deve corresponder ao valor encontrado em uma porção do alimento, que deve

ser informada em grama (g) ou mililitro (mL), incluindo a medida caseira correspondente, segundo o estabelecido no regulamento técnico<sup>10</sup>. Cada um dos itens deve também ser apresentado na forma de porcentagem em relação à sua Ingestão Diária Recomendada, definida como %VD. O padrão para o %VD consiste numa dieta de 2000 kcal ou 8400 kJ, porém, deve conter a frase “a ingestão pode ser maior ou menor dependendo de suas necessidades energéticas”<sup>9</sup>.

Com isso, o objetivo deste estudo é verificar as informações e valores rotulados em iogurtes e bebidas lácteas fermentadas e compará-los com os exigidos pela legislação em vigor, discutindo o comprometimento da informação nutricional da forma como está proposta pela Resolução RDC nº360/03 ANVISA/MS.

## MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de iogurtes e bebidas lácteas fermentadas, que possuíam carimbo de algum sistema de fiscalização, foram adquiridas na qualidade de consumidor em supermercados da cidade de Uberlândia-MG, sendo analisados mais de um exemplar de cada marca disponível no local de venda, durante o período de julho a dezembro de 2007.

Procedeu-se a análise de 38 tipos de iogurte, em três repetições, num total de 114 parcelas e de 14 tipos de bebida láctea fermentada, em duas repetições, totalizando 28 parcelas, de acordo com a disponibilidade no mercado. Foram analisados produtos de 10 marcas e/ou fabricantes de iogurte e sete marcas de bebida láctea fermentada, de diferentes sabores e composições nutricionais.

Os produtos foram analisados quanto aos princípios gerais de rotulagem, apresentação da informação nutricional e informações básicas que devem estar contidas no rótulo. A avaliação foi realizada por meio de uma ficha de avaliação de rotulagem padronizada contendo todos os itens exigidos na legislação brasileira: Resolução RDC nº259/02<sup>8</sup>, que inclui denominação do produto, lista de ingredientes, conteúdo líquido, identificação de origem e do lote, prazo de validade, modo de conservação, instruções sobre o preparo e uso do alimento, e informação nutricional; Resolução RDC nº359/03<sup>10</sup>, que aborda porção e medida caseira; Resolução RDC nº360/03<sup>9</sup>, referente à informação nutricional incluindo valor energético, carboidratos, proteínas, gorduras totais, saturadas e trans, fibra alimentar, sódio, cálcio e outros minerais, além de vitaminas; e com base em cada Regulamento Técnico Específico.

O valor energético foi determinado a partir da soma do produto da multiplicação dos valores de

proteína, gordura e carboidrato conforme recomendado na Resolução RDC nº360/03<sup>9</sup>. O %VD de cada nutriente foi verificado, calculando-se todos os %VD novamente de acordo com os valores apresentados. Para o cálculo do %VD de cálcio, utilizou-se a Resolução RDC nº269/05, que institui o Regulamento Técnico sobre Ingestão Diária Recomendada (IDR) para proteína, vitaminas e minerais<sup>11</sup>.

Os dados obtidos foram confrontados com a legislação vigente, para verificar a adequação à mesma. Os valores de proteínas e matéria gorda láctea foram analisados para verificar conformidade/inconformidade ao regulamento técnico específico. Os valores rotulados para carboidratos, proteínas e gorduras foram transformados da porção rotulada a uma porção de 100g para posterior comparação entre os produtos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os requisitos gerais de rotulagem estipulados pela Resolução RDC nº259/02 foram verificados e estavam em acordo com o exigido, com exceção da identificação do lote. Dados referentes ao lote não foram encontrados em 18/114 (15,8%) rótulos de iogurte e em 7/28 (25,0%) rótulos de bebida láctea fermentada (Figura 1). Segundo o Manual de Orientação aos Consumidores<sup>12</sup>, o “lote” é um número que faz parte do controle na produção e, caso haja algum problema, o produto pode ser recolhido ou analisado pelo lote ao qual pertence. Todos os itens analisados são importantes porque permitem ao consumidor conhecer as informações do produto que está adquirindo, assim como sua procedência.

Os rótulos analisados apresentavam o carimbo do Sistema de Inspeção Federal (SIF), 93,0% dos produtos, ou do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), 7,0% dos produtos analisados, sendo este relacionado somente a um fabricante. As irregularidades estiveram presentes em produtos fiscalizados por ambos.

Todos os rótulos avaliados apresentaram informações nutricionais agrupadas em um mesmo local em forma de tabela, variando em dois modelos (modelo vertical A e vertical B), ambos aprovados pela Resolução RDC nº360/03<sup>9</sup>. Em um estudo<sup>13</sup> foi observada a adequação de rótulos de iogurtes (iogurtes light ou desnatados) e barras de cereais quanto à forma de expressão da informação nutricional, agrupada em um mesmo local em forma de tabela ou linear, em idioma legível e visível, aos quais corroboram os resultados obtidos no presente estudo.

A porção é definida na Resolução RDC nº359/03 como a quantidade média do alimento que deve ser

usualmente consumida por pessoas saudáveis, e no caso de iogurtes e bebidas lácteas esta deve ser de 200g. Esta legislação prevê para alimentos comercializados em embalagens individuais uma tolerância de  $\pm 30,0\%$  em relação ao valor em gramas ou mililitros estabelecido para a porção do alimento.

Dentre os rótulos de iogurte analisados, houve variação nas porções apresentadas de 100g até 200g. Os rótulos de bebidas lácteas que tinham conteúdo líquido de 900g ou 1000g apresentaram a tabela nutricional baseada em porções de 200g, já as bebidas lácteas de 600g que continham potes com quantidades fracionadas de 100g, a tabela nutricional baseou-se nas porções individuais (100g). A informação correspondente ao conteúdo da embalagem em porções padronizadas facilita o entendimento por parte do consumidor, minimizando as dificuldades de análise e comparação dos produtos em oferta.

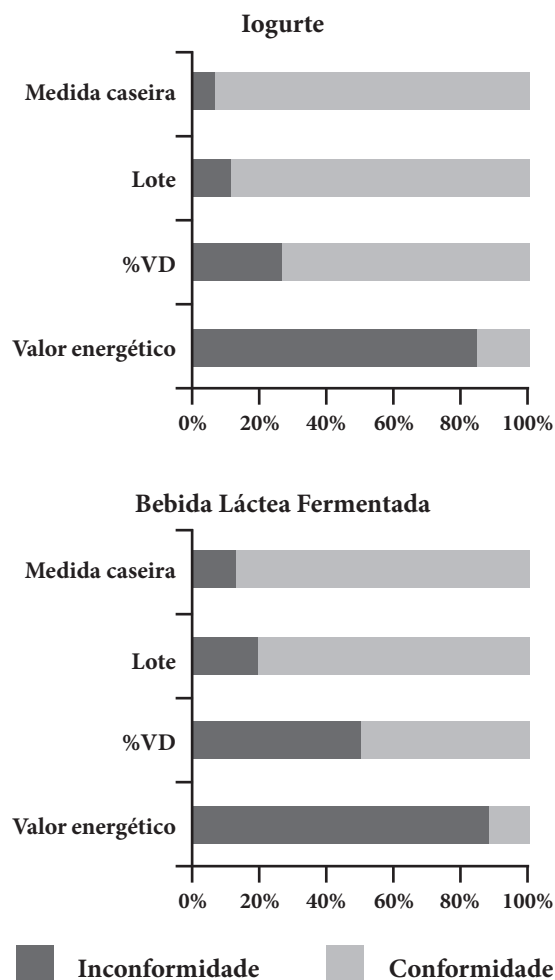
A medida caseira não foi apresentada em 6/114 (5,3%) dos rótulos de iogurte e em 4/28 (14,3%) dos rótulos de bebida láctea, estando em desacordo com a legislação (Figura 1). Esta medida serve para orientar o consumidor sobre a porção normalmente consumida, como fatias, unidades, potes, xícaras, copos e colheres de sopa. Inconformidades nesta informação podem levar o consumidor a super ou subestimar a quantidade ingerida em uma dieta previamente estabelecida.

Em estudo realizado por Freitas, Damasceno e Calado<sup>14</sup>, no qual foi feita uma avaliação da percepção do consumidor em relação à rotulagem de produtos lácteos, foi constatado que as declarações do lote e da medida caseira foram as informações que menos apareceram nos rótulos dos produtos avaliados como iogurtes, requeijões e queijos. No mesmo estudo verificou-se que a declaração da informação nutricional apareceu na maioria dos rótulos, porém, em alguns casos, tal informação não se apresentava de acordo com o exigido nas Resoluções RDC nº39 e nº40 de 21 de março de 2001, já revogadas pela RDC nº360/03.

Dentre os rótulos de iogurte 93/114 (81,6%) apresentaram discordâncias referentes ao valor energético. Os valores rotulados apresentaram variação de menos 6,2% a mais 6,0% do valor estimado, referentes à dieta baseada em kcal e kJ. Para as bebidas lácteas, essa variação foi de menos 4,1% a mais 6,9%, em 24/28 (85,7%) rótulos analisados (Figura 1). Esse erro representa falha no serviço de aprovação de rotulagem dos produtos e pode levar o consumidor a erros em cálculos de calorias ingeridas em determinadas dietas.

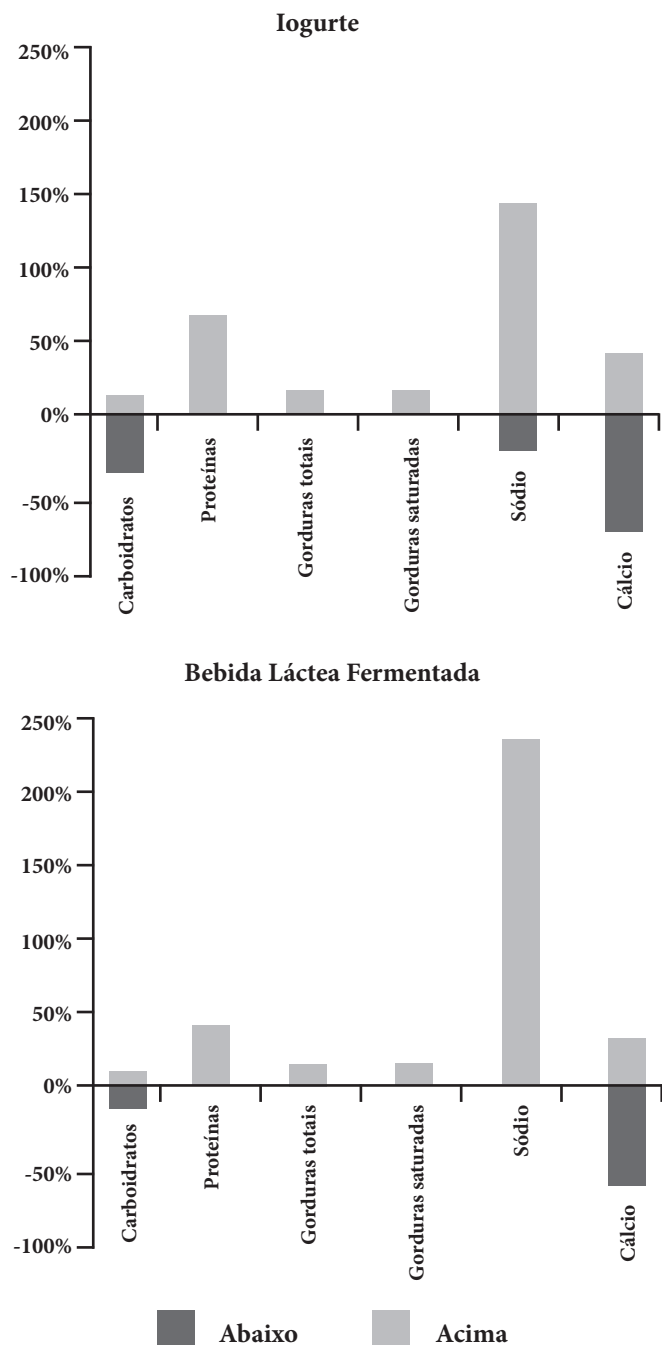
O percentual de valores diários (%VD) é um número em percentual que indica o quanto o produto em questão apresenta de energia e nutrientes em relação a

uma dieta de 2000 kcal ou 8400 kJ. Esses percentuais foram declarados erroneamente em 33/114 (28,9%) dos rótulos de iogurte e em 16/28 (57,1%) dos rótulos de bebida láctea, levando em conta também as regras de arredondamento (Figura 1). Vale ressaltar que a legislação em vigor admite tolerância de  $\pm 20,0\%$  em relação aos valores de nutrientes declarados no rótulo, mas dentro da tabela não pode haver variação, ou seja, os valores dos %VD devem corresponder ao valor declarado de cada nutriente. Portanto, as variações apresentadas nos %VD referentes ao valor energético, carboidratos, proteínas, gorduras totais, sódio e cálcio, se encontram em desacordo com a legislação. Com destaque para os %VD declarados para o sódio que atingiu mais 146,1% nos rótulos de iogurte e mais 237,5% do valor real nos rótulos de bebida láctea (Figura 2).



**Figura 1.** Porcentagem dos produtos, iogurte e bebida láctea fermentada, coletados nos supermercados da cidade de Uberlândia-MG, no período de julho a dezembro de 2007, que tiveram itens em conformidade/inconformidade com a legislação em vigor, Resolução RDC nº259/02, RDC nº359/03 e RDC nº360/03





**Figura 2.** Variação do percentual de valores diários (%VD) calculados em relação aos nutrientes declarados nos rótulos de iogurte e bebida láctea fermentada coletados nos supermercados da cidade de Uberlândia-MG, no período de julho a dezembro de 2007

Foram analisadas as variedades de iogurte e bebida láctea nas apresentações: integral, parcialmente desnatado e desnatado, independente da composição e sabor. Nos iogurtes classificados como integral, 33/114 (28,9%), os

valores rotulados de carboidratos variaram de 4,5g a 16g. Para a variedade parcialmente desnatado, 51/114 (44,7%), houve variação de 9,4g a 23g. Os produtos da variedade light ou desnatado, 30/114 (26,3%), variaram de 4,6g a 15g. A variação foi considerada elevada, mas deve-se levar em conta que produtos lácteos fermentados, apesar de terem os teores de lactose reduzidos entre 16,0% e 25,0% do teor inicial do leite<sup>15</sup>, podem também ser adicionados de leite em pó, o que justificaria as oscilações.

Dentre os rótulos de bebida láctea fermentada avaliados, a quantidade por porção de carboidratos variou de 9,0g a 18,0g, quando convertidos para porções de 100g. Como o soro é rico em lactose, quanto maior o teor de soro de leite e açúcar, maior o teor de carboidratos. Todos os rótulos apresentaram a expressão “CONTÉM SORO DE LEITE”, exigida pelo regulamento técnico específico de bebidas lácteas.

O regulamento técnico específico de identidade e qualidade de leites fermentados, Resolução nº05/2000, estipula uma variação de 3,0g a 5,9g/100g de matéria gorda láctea para o iogurte integral, 0,6g a 2,9g/100g para o iogurte parcialmente desnatado, e o máximo de 0,5g/100g para o iogurte desnatado. Para proteínas lácteas, o regulamento estipula o mínimo de 2,9g/100g para todas as variedades. Os leites fermentados com agregados, açucarados e/ou saborizados podem ter conteúdo de matéria gorda e proteínas inferiores, não devendo reduzir-se a uma proporção maior do que a porcentagem de substâncias alimentícias não lácteas, açúcares acompanhados ou não de glicídios (exceto polissacarídeos e polialcoóis) e/ou amidos ou amidos modificados e/ou maltodextrina e/ou aromatizantes/saborizantes adicionados<sup>1</sup>.

As quantidades rotuladas de matéria gorda láctea em um rótulo de iogurte natural integral e em um rótulo de iogurte parcialmente desnatado com polpa de fruta, 0,4g/100g e em quantidade não significativa, respectivamente, estavam em quantidade inferior à padronizada pelo regulamento técnico específico, caracterizando inconformidade dos mesmos.

Na indústria de laticínios, é uma prática comum padronizar o teor de gordura do leite. De acordo com Rattray e Jelen<sup>16</sup>, esta prática foi desenvolvida porque até recentemente a gordura do leite era considerada como o mais valioso constituinte do leite. Ainda, a sua concentração pode ser facilmente alterada por meios mecânicos, utilizando o separador por centrifugação. É sabido que o teor de gordura, assim como os outros componentes físico-químicos do leite, varia de acordo com a raça, fase de lactação, qualidade da alimentação e

estado nutricional das vacas, das condições climáticas, das práticas agrícolas, entre outros fatores<sup>17</sup>.

Na legislação para as bebidas lácteas fermentadas<sup>2</sup> não é estipulado um padrão em relação à quantidade de matéria gorda láctea, estando esta compreendida entre 1,4g a 2,0g por 100g do produto nos rótulos avaliados. Somente o teor de proteínas de origem láctea tem padrão estabelecido, o qual deve ter no mínimo 1,0g de proteínas/100g do produto, no caso das bebidas lácteas fermentadas com adições ou bebida láctea fermentada com produtos ou substâncias alimentícias. Todos os rótulos traziam valores de proteínas entre 1,6g a 2,5g por 100g do produto, demonstrando conformidade com a legislação.

A variação do teor de proteínas pode ser explicada pelas diferentes quantidades de soro e de leite utilizados na elaboração das bebidas lácteas de cada fabricante. Como verificado em estudo, à medida que se aumenta a concentração de soro nas bebidas lácteas, menores são os valores de proteínas encontrados, já que o soro apresenta um teor menor de proteína que o leite<sup>18</sup>. O mesmo raciocínio pode ser utilizado para avaliar as oscilações nos teores de gordura, porém, este nutriente é mais facilmente adicionado/retirado pela adição de creme ou desnate, respectivamente.

Segundo a Resolução RDC nº360/03, a quantidade de qualquer outro nutriente que se considere importante para manter um bom estado nutricional, segundo exijam os regulamentos técnicos específicos, pode ser declarada na tabela nutricional do produto. O cálcio não é exigido na legislação, mas trata-se de um dos minerais constituintes do leite, e apresenta um papel importante para a saúde humana. O mesmo auxilia na termoestabilidade do leite e também nos processos de coagulação<sup>17</sup>. O cálcio foi declarado em 12/114 (10,5%) dos rótulos de iogurte e em 7/28 (25,0%) rótulos de bebida láctea.

Outros nutrientes de declaração obrigatória, segundo a Resolução RDC nº360/03, são gorduras trans e fibra alimentar. Esses foram declarados em todos os rótulos avaliados, sendo utilizadas para gorduras trans as expressões “Não contém quantidades significativas”, “não contém” e “0g”, ambas acompanhadas da indicação de não haver %VD estabelecido. Na ausência de fibra alimentar utilizou-se também a expressão “Não contém quantidades significativas” e “0g”.

Vitaminas e outros minerais como ferro, fósforo e zinco foram declarados em 15/114 (13,2%) dos rótulos de iogurte e em 2/28 (7,1%) de bebida láctea. Os %VD de cada nutriente foram calculados de acordo com IDR para adultos, lactentes e crianças, conforme informado no produto. Em dois produtos de duas marcas distintas de

iogurte os %VD estavam rotulados erroneamente, havendo variação de menos 3,6% e mais 4,2% do valor estimado a partir da quantidade rotulada do nutriente, vitamina A e C.

Em alguns rótulos de iogurte houve a utilização dos mesmos valores de nutrientes entre os produtos de uma mesma marca, mas de composições distintas. Três marcas, totalizando nove produtos, apresentaram correlação entre seus dados. Nas bebidas lácteas essa correlação foi verificada em produtos de duas marcas. As formulações utilizavam preparados de frutas, nos quais era adicionada a polpa da fruta ao produto. Apesar das diferentes frutas utilizadas apresentarem composição centesimal diferentes, segundo a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos-TACO<sup>19</sup>, como as polpas utilizadas são industrializadas, adicionadas em baixas porcentagens e ainda os dados sofrerem arredondamento e adequação à porção, é possível que haja mesmo coincidência nos valores apresentados.

É exigida para as bebidas lácteas de cor branca a utilização da expressão “BEBIDA LÁCTEA NÃO É LEITE” ou “ESTE PRODUTO NÃO É LEITE” e para as bebidas lácteas coloridas a expressão “BEBIDA LÁCTEA NÃO É IOGURTE” ou “ESTE PRODUTO NÃO É IOGURTE”. Dentre os rótulos analisados, 4/28 (14,3%) não apresentavam esta informação.

Duas marcas de iogurte, totalizando três produtos diferentes, e uma marca de bebida láctea alteraram os rótulos de seus produtos durante o período de coleta. Em um dos rótulos de iogurte a mudança foi referente ao conteúdo líquido da embalagem, mas a mesma foi informada em quantidade e porcentagem no rótulo do produto. A principal alteração do segundo rótulo de iogurte foi referente à adequação da dieta com base em 2000 kcal, em vez de 2500 kcal. O outro produto apresentou mudança com relação aos valores dos nutrientes, variando principalmente a quantidade por porção de gorduras totais e gorduras saturadas, apresentando ainda %VD de proteínas calculado com base em 50g. Segundo a Resolução RDC nº360/03, o valor diário de referência de proteínas é de 75g, valor que deve ser utilizado para os cálculos de %VD<sup>9</sup>. Em contrapartida, mas de acordo com o rotulado no produto em questão, a Resolução RDC nº269/05, que institui valores de IDR para proteína, vitaminas e minerais, preconiza uma IDR de proteínas para adultos igual a 50g, assim como outros valores para lactentes e crianças<sup>11</sup>.

A marca de bebida láctea que alterou o rótulo corrigiu erros nas %VD para carboidratos e gorduras saturadas, porém, apresentou desta vez porções em mL e o recomendado é que seja expresso em gramas. Outro

produto da mesma marca apresentou a porção em mL, não havendo alteração durante o período de coleta. O conteúdo líquido de ambas estava rotulado corretamente em gramas.

Dentre os rótulos de iogurte analisados, somente os de um produto, nas três parcelas coletadas, apresentou total concordância com os itens exigidos na legislação, levando em consideração as regras gerais de rotulagem e a declaração dos nutrientes obrigatórios, seus %VD e as regras de arredondamento nos cálculos realizados dentro da tabela. Para os rótulos de bebida láctea fermentada, todos apresentavam alguma inconformidade. Sendo assim, um total de 97,4% dos rótulos de iogurte e 100% dos rótulos de bebida láctea fermentada estavam incompletos com relação a informações de caráter obrigatório na legislação.

## CONCLUSÃO

Irregularidades estiveram presentes em rótulos de produtos que apresentavam carimbo de órgãos de fiscalização federal e estadual. Houve discordância entre os valores rotulados e os valores estimados, principalmente em relação aos percentuais de valores diários recomendados referentes ao valor energético, carboidratos, proteínas, gorduras totais, sódio e cálcio. Contudo, os resultados obtidos demonstraram que 97,4% dos rótulos de iogurte e 100% dos rótulos de bebida láctea fermentada estavam incompletos, suprimindo ou apresentando erroneamente uma ou mais informações de caráter obrigatório.

Considerando-se a obrigatoriedade das informações descritas nas legislações vigentes, questiona-se o compromisso por parte da indústria de alimentos na apresentação dos dados, já que os resultados desse estudo demonstraram que os produtos analisados não atendem ao propósito disposto pela Resolução RDC nº360/03.

Sem um controle efetivo por parte dos órgãos competentes, o consumidor não poderá confiar nos dados declarados, ficando sem sentido os esforços para que a população compreenda a Informação Nutricional rotulada.

## REFERÊNCIAS

1. Brasil. Resolução nº05, de 13 de novembro de 2000 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Padrões de identidade e qualidade de leites fermentados. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 13 nov. 2000.
2. Brasil. Instrução Normativa nº16, de 23 de agosto de 2005 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento técnico de identidade e qualidade de bebida láctea. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 23 ago. 2005.
3. Gambelli L, Manzi P, Panfili G, Vivanti V, Pizzoferrato L. Constituents of nutritional relevance in fermented milk products commercialised in Italy. *Food Chem.* 1999; 66: 353-8.
4. Deeth HC, Tamime AY. Yogurt: nutritive and therapeutic aspects. *J Food Prot.* 1981; 44 (1): 78-96.
5. Álvares F, Araújo WMC, Borgo LA, Barros LM. Informações nutricionais em rótulos de queijos industrializados. *Hig Alim.* 2005; 19 (131): 25-33.
6. Nascimento SP. Rotulagem nutricional. *Hig Alim.* 2001; 15(83): 71-5.
7. Brasil. Lei 3078 de 11 de setembro de 1990 do Ministério da Justiça - Secretaria do Direito Econômico. Código de Defesa do Consumidor.
8. Brasil. Resolução RDC nº259, de 20 de setembro de 2002 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Regulamento técnico para rotulagem de alimentos embalados. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 20 set. 2002.
9. Brasil. Resolução RDC nº360, de 23 de dezembro de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 23 dez. 2003.
10. Brasil. Resolução RDC nº359, de 23 de dezembro de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Regulamento técnico de porções de alimentos embalados para fins de rotulagem nutricional. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 23 dez. 2003.
11. Brasil. Resolução RDC nº269, de 22 de setembro de 2005 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Regulamento Técnico sobre Ingestão Diária Recomendada (IDR) para proteína, vitaminas e minerais. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 22 set. 2005.
12. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Universidade de Brasília. Rotulagem nutricional obrigatória: manual de orientação aos Consumidores. Brasília: Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária / Universidade de Brasília, 2005. 17p.
13. Matta IEA, Henriques P, Silva Y. Adequação à legislação vigente, da rotulagem de alimentos diet e light comercializados no Rio de Janeiro, RJ. *Hig Alim.* 2006; 20 (147): 97-103.
14. Freitas JE, Damasceno KSFSC, Calado CLA. Rotulagem de alimentos lácteos: a percepção do consumidor. *Hig Alim.* 2004; 14 (125): 17-23.
15. Pereira DBC, Perrone IT, Carvalho AF. Bioatividade da lactose, de oligossacarídeos e das proteínas lácteas. *Rev Inst Lat Cândido Tostes*, 2007; 62 (354): 3-7.
16. Rattray W, Jelen P. Protein standardization of milk and dairy products. *Trends in Food Sci & Technol.* 1996; 7: 227-34.
17. Tronco V. Manual para inspeção da qualidade do leite. 2ª ed. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2003. 192p.: il.
18. Thamer KG, Penna ALB. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebióticos. *Ciênc Tecnol Alim.* 2006; 23 (3): 589-95.
19. NEPA. Tabela brasileira de composição de alimentos-TACO. NEPA - Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação/ UNICAMP. Versão II. 2. ed. Campinas, SP: NEPA-UNICAMP, 2006, 113p.

# Uso da *Spirulina platensis* na recuperação de ratos submetidos à dieta de restrição proteica

## Use of *Spirulina platensis* for recovering rats under protein restriction diet feeding

RIALA6/1258

Nilcimelly Rodrigues DONATO<sup>1\*</sup>, João Andrade da SILVA<sup>2</sup>, Maria José de Carvalho COSTA<sup>3</sup>, Mayara Queiroga BARBOSA<sup>2</sup>, Francisca Martins BION<sup>3</sup>, Edvaldo Vasconcelos de CARVALHO FILHO<sup>4</sup>, Robson Cavalcante VERAS<sup>5</sup>, Isac Almeida de MEDEIROS<sup>5</sup>

\*<sup>1</sup>Endereço para correspondência: Curso de Nutrição, Centro de Educação e Saúde - CES, Universidade Federal de Campina Grande, Campus Cuité Olho D'Água da Bica S/N -58175-000, Cuité, PB, Brasil. Fone: (83) 33721900/33721809. e-mail: mellydonato@ufcg.edu.br

<sup>2</sup>Laboratório de Nutrição Experimental, Departamento de Nutrição, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil

<sup>3</sup>Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

<sup>4</sup>Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Trairi, Santa Cruz, RN, Brasil

<sup>5</sup>Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Departamento de Farmácia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil

Recebido: 30.09.2009 – Aceito para publicação: 22.03.2010

### RESUMO

O presente estudo avaliou a ação da espirulina como fonte proteica na recuperação do estado nutricional de ratos machos adultos. Foram estudados 48 animais, divididos em quatro grupos de acordo com a dieta: grupo controle de caseína (CC) e grupo controle de espirulina (CE), que receberam dieta equilibrada durante todo o experimento; grupo recuperado de caseína (RC) e grupo recuperado de espirulina (RE), que consumiram dieta com restrição proteica durante 60 dias e, a seguir, receberam a dieta equilibrada à base de caseína e espirulina, respectivamente, durante 90 dias. Foram analisadas a composição centesimal e a microbiológica da *Spirulina platensis*, bem como o ganho em peso dos animais. Após o sacrifício dos animais, foram realizadas as análises para determinação do peso do fígado e do aspecto histopatológico, da gordura corporal e dos constituintes sanguíneos. A espirulina utilizada continha 59,65% de proteína, 3,72% de lipídios, 17,53% de resíduo mineral fixo e 7,81% de umidade, e não apresentou contaminação por microrganismos. Não houve diferenças significativas quanto à gordura corporal e constituintes proteicos séricos entre os quatro grupos de animais. Em relação ao ganho de peso, não foi constatada diferença entre os grupos CC e CE, nas diferentes semanas de números 1, 5, 6, 7 e de 10 a 18, contudo esta ocorrência não foi observada nos grupos RC e RE. O peso relativo do fígado diminuiu nos animais com restrição proteica, principalmente no grupo RC, porém sem alterações histopatológicas, e os constituintes lipídios tiveram valores diminuídos. Conclui-se que o uso da *Spirulina platensis* na recuperação de ratos com dieta de restrição proteica reduz a lipemia.

**Palavras-chave.** Cianobactérias, lipemia, histopatologia, hemoparâmetros, desnutrição proteico-calórica.

### ABSTRACT

This investigation aims at evaluating the effects of spirulin as a protein source for recovering the nutritional status of adult male rats. Forty-eight animals were studied and divided by four groups according to the feed diet: casein control (CC) group and spirulin control (SC) group, which received balanced diet during the whole experiment; recovered casein (RC) group and recovered spirulin (RS) group, which received a protein-restriction diet for 60 days and, afterwards, they were fed with balanced diet based on casein and spirulin, respectively, for 90 days. The centesimal and microbiological composition of *Spirulina platensis* and animals weight gains could be evaluated. After being euthanized the animal's liver weight and its histopathologic aspects were analyzed, besides the body fat and blood components. The spirulin used contained 59.65% of protein, 3.72% of lipids, 17.53 of fixed mineral residue and 7.81% of humidity, and showed no microorganism contamination. Significant differences on body fat and serum protein contents could not be observed among the four animal groups. Regarding the weight gains, there was no difference among the animals of groups CC and SC in different weeks of experiments numbers 1, 5, 6, 7 and from 10 to 18, but these findings were not observed among the RC and RS groups. The relative liver weight decreased in animals under protein restriction, mainly in the group RC, but no histopathological alterations could be observed, and lipid contents decreased. In conclusion, the use of *Spirulina platensis* for recovering rat on protein restriction diet induces a reduction of lipemia.

**Key words.** cyanobacterium, lipemia, histopathology, hemoparameter protein-calorie malnutrition.

## INTRODUÇÃO

Os resultados das pesquisas realizadas pela FAO<sup>1</sup>, em ciências da Nutrição, em todos os continentes, demonstram que, embora em termos percentuais tenha havido decréscimo na incidência de desnutrição entre 1990 e 1999, em números absolutos, 623,7 milhões de pessoas ainda são acometidas por essa carência nutricional.

De acordo com Correia e Campos<sup>2</sup>, Pablo et al<sup>3</sup>, Pirlich et al<sup>4</sup> e Wyszynski et al<sup>5</sup>, a prevalência da desnutrição proteico-calórica a nível hospitalar, como também em idosos<sup>6,7</sup>, é um problema atual que interfere na qualidade de vida dos indivíduos acometidos. Em relação ao idoso, sabe-se que são mais vulneráveis ao desenvolvimento desta carência que, assim, constitui um fator de risco nesta faixa etária<sup>8-10</sup>. Segundo Fabre et al<sup>11</sup> a desnutrição é frequente em pacientes idosos hospitalizados, com doenças agudas ou crônicas associadas ao estado de hipermetabolismo das concentrações de proteínas viscerais. Além disso, idosos desnutridos apresentam um maior risco de morbidade, portanto, necessita ser diagnosticada e tratada rapidamente para evitar essas consequências negativas.

O planejamento de estratégias para tratar esta doença está atrelado a díade custo-benefício, o que reforça a necessidade de descoberta de novas fontes proteicas para melhorar a recuperação de indivíduos desnutridos.

Além da agricultura e da pecuária convencional, outras fontes proteicas têm sido pesquisadas com este propósito. Neste sentido, microrganismos têm recebido atenção especial como fonte alternativa de proteína na dieta. A expressão biomassa ou single cell protein (scp) foi proposta por Tannenbaum<sup>12</sup>, como um termo genérico para indicar fontes de proteínas brutas ou refinadas, originárias de microrganismos. Cianobactérias, incluindo a *Spirulina platensis*, existem na terra há 3,5 bilhões de anos<sup>13</sup>. *Arthrospira platensis*, ou espirulina (SP), é uma cianobactéria microscópica e filamentosa (alga verde-azulada) que tem longa história no uso como alimento<sup>14</sup>. A *Spirulina platensis* é conhecida por sua qualidade nutricional, índice de proteína de alto valor biológico, bem como de outros componentes como vitaminas, minerais e ácidos graxos essenciais com destaque para o ácido  $\gamma$ -linolênico e o  $\beta$ -caroteno<sup>15</sup>. Recentemente, os pesquisadores têm dado mais atenção ao estudo dos efeitos terapêuticos da *Spirulina platensis*. Além de sua eficácia na redução da hiperlipidemia, o diabetes e a pressão arterial elevada, nos seres humanos e nos animais, também foram relatados os efeitos anti-viral e cancerígeno da *S. platensis* administrada via oral<sup>16</sup>. De

acordo com Babadzhanov et al<sup>17</sup>, a *S. platensis* contém em média 65% de proteína, enquanto que a carne e os peixes contêm 15-20%; a soja, 35%; o leite desidratado, 35%; os amendoins, 25%; os ovos, 12%; e os grãos, 8-14%.

Em um estudo comparativo de dietas com diferentes conteúdos de proteínas, foram verificadas modificações favoráveis na composição corporal, expressa pela diminuição do teor da gordura e aumento da massa magra ao utilizar dietas com proteínas de alto valor biológico; partes dessas alterações foram atribuídas ao aumento da disponibilidade de aminoácidos de cadeia curta<sup>5,18</sup>.

O fígado é considerado o órgão central do metabolismo do organismo, desempenhando funções importantes para a manutenção do corpo<sup>18</sup>. Em caso de desnutrição proteica, para a manutenção da homeostase, do fígado o organismo prioriza a perda da massa hepática, com hipoplasia e atrofia, em vez de alterar sua função<sup>14</sup>.

Considerando a alta prevalência de desnutrição na população idosa e hospitalar, o alto índice proteico da *Spirulina platensis* e sua facilidade de cultivo, a pesquisa teve como objetivo estudar o valor nutricional desta alga em rato, suplementando dieta desequilibrada em proteína, como também verificar o consumo da *Spirulina platensis* como fonte proteica em consumo de dieta equilibrada por meio de testes biológicos e parâmetros bioquímicos. A pesquisa traz uma sugestão de uma nova fonte proteica, alternativa, para a produção de produtos alimentícios enriquecidos com proteína, por exemplo, dietas enterais, uma vez que a desnutrição atualmente atinge pessoas idosas e pacientes hospitalizados que necessitam de uma alimentação concentrada, e é importante por contribuir com o esclarecimento dos efeitos da adição ou substituição de proteína na dieta por *Spirulina platensis*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material

A espirulina utilizada foi a *Spirulina platensis* fornecida pela Mocó Agropecuária Ltda desidratada em estufa de circulação forçada de ar a  $55 \pm 3^\circ\text{C}$  por 12h. Os animais foram provenientes da UFPE e as análises foram realizadas na UFPB.

### Métodos

#### Análises físico-químicas

As determinações de: umidade, resíduo mineral fixo, teor de nitrogênio e lipídeos foram realizadas pelos métodos da AOAC<sup>19</sup>.

### Análises microbiológicas

Foram realizadas as Contagens Padrão em Placas (CPP) de bactérias aeróbias mesófilas e bolores e leveduras, determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e fecais (termotolerantes) empregando as diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-3}$  <sup>20</sup>.

### Composição das dietas experimentais

A dieta CC (controle caseína) e RC (recuperação com caseína) foram à base de caseína comercial com 12 % de proteína, a dieta de restrição proteica foi à base de caseína com 7% de proteína e a de *Spirulina platensis* CE (controle espirulina) e RE (recuperação com espirulina) em concentrações de 12% de proteína, assim os grupos controles receberam durante todo o experimento dieta equilibrada com 12% de proteína e os grupos que sofreram restrição, receberam inicialmente uma dieta com 7% de proteína, derivada da caseína para posteriormente serem recuperados de acordo com as dietas dos grupos controle.

As dietas foram oferecidas diariamente em quantidade suficiente para garantir o consumo ad libitum, em forma de pallets, o coeficiente de eficácia alimentar foi analisado e não apresentou alterações entre os grupos. Os teores dos nutrientes foram equilibrados segundo as recomendações de Reeves Nielsen e Fahey do American Institute of Nutrition – AIN<sup>21</sup> (Tabela 1).

**Tabela 1.** Composição das dietas à base de caseína e *Spirulina platensis*

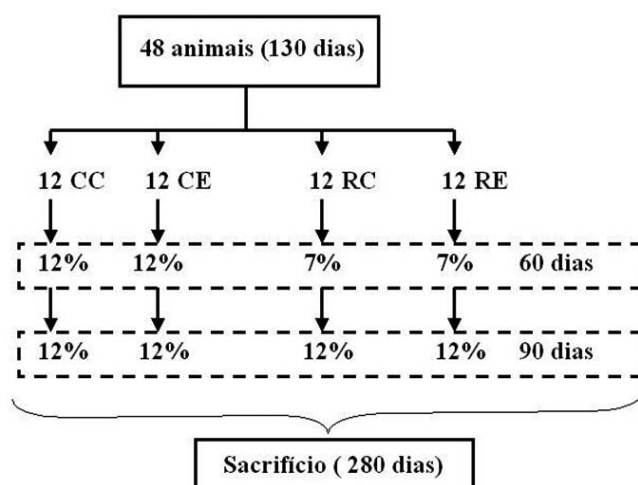
Componentes (g)	CC / RC	CE / RE	Dieta de desequilíbrio proteico
Caseína	16	-	9,34
Espirulina	-	17,91	-
Óleo vegetal	4	2,61	7
Celulose	5	3,66	5
Mistura de Minerais	3,5	3,5	3,5
Mistura Vitamínica	1	1	1
DL Metionina	0,18	0,18	0,18
B. Colina	0,25	0,25	0,25
Amido	70,07	70,89	73,73

### Ensaio biológico

Foram utilizados machos adultos com 130 dias de idade, albinos, da linhagem Wistar, mantidos em gaiolas individuais, sob condições-padrão de iluminação (ciclo

claro/escuro de 12/12 horas), com temperatura em torno de  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ <sup>22</sup>, divididos em 4 grupos de 12 animais.

Aos grupos CC (controle caseína) e CE (controle espirulina) foi administrada dieta à base de caseína e espirulina, respectivamente, com a concentração proteica de 12%, durante todo o experimento. Os grupos RC (recuperado caseína) e RE (recuperado espirulina) receberam dieta desequilibrada, com 7% de proteína (caseína) durante 60 dias e posteriormente foram recuperados com dietas contendo caseína (12%) e espirulina (12%) durante 90 dias, perfazendo um total de 150 dias do estudo, segundo o esquema (Figura 1).



**Figura 1.** Distribuição dos animais segundo o esquema experimental. Grupos: CC = Controle Caseína, CE = Controle Espirulina, RC = Recuperado Caseína e RE = Recuperado Espirulina

Aos 280 dias de idade os animais foram submetidos ao jejum de 12 horas, anestesiados com Cloridrato de Xilazina e, após a retirada do material necessário foram sacrificados com uma dose maior do anestésico. O sangue foi retirado por técnica de punção cardíaca, para a realização das dosagens bioquímicas, o fígado para calcular o peso relativo e a carcaça para determinação da gordura corporal.

O projeto foi analisado e aprovado para execução pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (Cepa) do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba, registro nº 0105/07.

### Avaliação do ganho de peso

Os animais foram pesados semanalmente do início ao final do experimento em balança (Ohaus – Galaxy-400), para construção de um gráfico de ganho de peso.

### Peso relativo do fígado

O peso do fígado foi determinado em balança analítica (AND-HR-120) e o peso relativo foi determinado pela sua quantificação, em relação ao peso do animal.

### Percentual de gordura Corporal

Após o sacrifício dos animais, foi retirado todo o trato gastrointestinal e a carcaça foi congelada (-25°C). Individualmente foram triturados em moinho - Bemmar: BM/23, homogeneizado, pela técnica de quarteamento, segundo recomendações de Cecchi<sup>23</sup>. O percentual de gordura corporal foi determinado por extração contínua utilizando o método de Soxhlet<sup>19</sup>.

### Histopatológico

Foram retirados fragmentos do lóbulo direito do fígado para realização da avaliação histopatológica. As peças retiradas foram lavadas em solução salina (0,9%) e fixadas em solução de formol tamponado (10%) por um período de 48 horas. Em seguida, as peças foram submetidas a um processo de desidratação em série crescente de álcoois e diafanização em xilol, em tempo previamente padronizado para todos os grupos, e então incluídas em parafina. Após inclusão, foram seccionados com 5µm de espessura e corados pelo método da Hematoxilina-Eosina para o exame histológico em microscópio de luz. Durante o exame foram observadas se haviam alterações histológicas.

### Exames bioquímicos

As concentrações séricas foram determinadas em espectrofotômetro, em sistema automatizado A-25 Biosystems (Barcelona, Espanha), usando kits Biosystems. Os valores de LDL-colesterol foram calculados segundo Friedewald et al<sup>24</sup>, e os valores de globulinas foram obtidos subtraindo o valor de proteínas totais pelo de albumina.

### Análise estatística

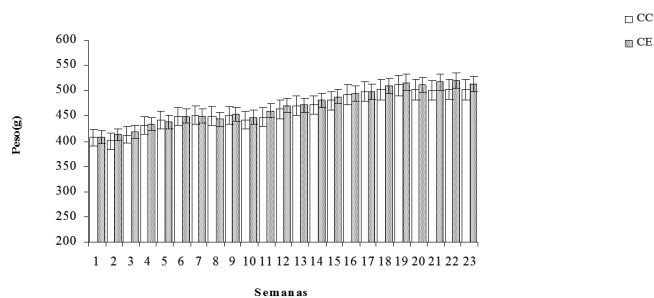
Foi empregado o Teste t de Student com nível de significância ( $p < 0,05$ ) para análise da composição da *Spirulina platensis* (expresso em média  $\pm$  erro padrão da média). Para a análise dos dados do ensaio biológico foi aplicada a Análise de Variância (ANOVA) para comparações entre os diferentes grupos. Quando a ANOVA constava a existência de diferença, foi utilizado o Teste de Tukey, com a finalidade de identificar quais grupos diferiram entre si. Quando não foi possível aplicar o teste paramétrico, foi utilizado o não paramétrico de Kruskal-

Wallis, seguido do Teste de Mann-Whitney. Todos os testes foram feitos com significância estatística em nível crítico de 5%. Para a realização dos testes estatísticos foi utilizado o pacote estatístico Sigma Stat versão 3.1.

## RESULTADOS

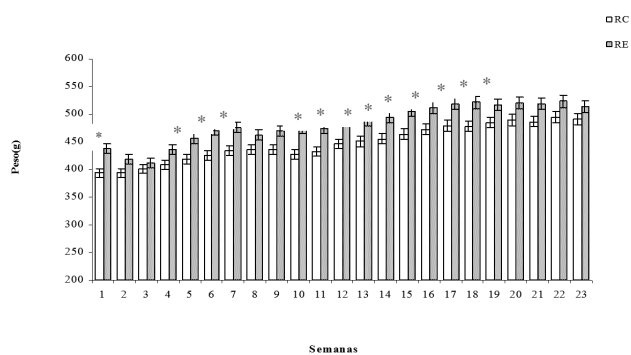
Os resultados das análises da composição centesimal da *Spirulina platensis* utilizada nas dietas experimentais: 59,65% de proteína e 3,29% de lipídios. Em relação à umidade, o valor percentual foi de 7,81% e a média para resíduo mineral fixo foi 7,53%. Nas análises microbiológicas não foi encontrado nenhum tipo de microrganismo que comprometesse a qualidade higiênica da biomassa.

O gráfico da Figura 2 expressa o ganho de peso semanal dos grupos CC e CE. Percebe-se que não há diferença estatística entre os grupos controle durante todo o experimento, mas na maioria das semanas o grupo CE teve maior ganho de peso.



**Figura 2.** Ganho de peso dos grupos Controle Caseína e Controle Espirulina. Os valores estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Teste t de Student,  $p < 0,05$

Durante a desnutrição proteica (dieta com 7% de proteína) houve diferenças estatísticas entre os grupos RC e RE e, posteriormente o grupo RC teve perda de peso significativamente superior ao RE. No período de recuperação, durante o qual os grupos receberam dieta com 12% de proteína, o ganho de peso foi significativamente maior no grupo recuperado com a fonte proteica proveniente da *Spirulina platensis* (grupo - RE), entre o intervalo da 10ª a 18ª semanas, posteriormente não apresentou diferença estatística em relação ao grupo RC, porém este apresentou um ganho de peso inferior em todo o período de recuperação (Figura 3).



**Figura 3.** Ganho de peso (g) dos grupos Recuperado Caseína e Recuperado Espirulina durante a depleção (semanas 1 – 9) e recuperação (semanas 10 – 23). Os valores estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão. O símbolo (\*) indica diferenças (Teste t de Student,  $p < 0,05$ )

Na Tabela 2 encontra-se o peso do fígado dos animais. Verifica-se que o maior peso foi do grupo CC.

**Tabela 2.** Peso relativo do fígado

Grupos	Peso de Fígado (g/100g)
Controle Caseína	3,11 $\pm$ 0,51 <sup>a</sup>
Controle Espirulina	2,51 $\pm$ 0,18 <sup>b</sup>
Desnutrido Recuperado com Caseína	2,63 $\pm$ 0,35 <sup>cb</sup>
Desnutrido Recuperado com Espirulina	2,73 $\pm$ 0,21 <sup>ab</sup>

Os valores estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indica diferenças (Kruskal Wallis, seguido de Mann-Whitney  $p < 0,05$ )

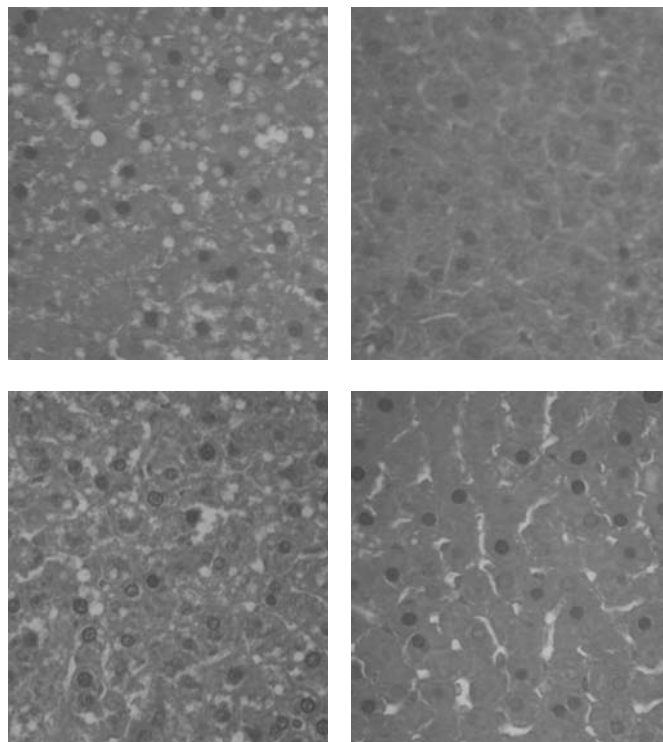
Na Figura 4 observa-se a lâmina histológica do lóbulo direito do fígado, onde pode ser observado que não apresenta nenhuma anormalidade histopatológica e em nenhum dos grupos foi verificada a presença de células desconhecidas, apenas uma compatibilidade nas lâminas A e C com uma esteatose microvesicular.

Na Tabela 3 observam-se os valores de gordura corporal de todos os grupos, não havendo diferença entre os grupos, embora os grupos recuperados apresentem menor quantidade de gordura visceral.

Na Tabela 4 estão dispostas as concentrações séricas de proteínas totais, albumina, globulina, colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL e triglicéridios de todos os grupos nas condições de repouso e jejum de 12h.

Foi observado que em relação às proteínas totais, albumina e globulina não houve diferença estatística entre os grupos.

Nos componentes lipídicos não foi observada diferença significativa entre os grupos, no que diz respeito às frações de colesterol HDL e LDL. Os grupos alimentados com *Spirulina platensis* apresentaram concentrações inferiores. Os níveis séricos de colesterol total e triglicéridios apresentaram uma redução nos grupos que consumiram as dietas proteicas à base da *Spirulina platensis*.



**Figura 4.** Histopatologia do fígado aumento da lente óptica de 40x. A = Grupo Controle Caseína; B = Grupo Controle Espirulina; C = Grupo Recuperado Caseína; D = Grupo Recuperado Espirulina

**Tabela 3.** Percentual de gordura corpórea dos animais

Grupos	Gordura corporal (g/100g)
Controle Caseína	32,95 $\pm$ 7,48 <sup>a</sup>
Controle Espirulina	31,91 $\pm$ 6,17 <sup>a</sup>
Desnutrido Recuperado com Caseína	30,68 $\pm$ 8,78 <sup>a</sup>
Desnutrido Recuperado com Espirulina	30,95 $\pm$ 9,62 <sup>a</sup>

Os valores estão expressos em média  $\pm$  Desvio padrão. Letras minúsculas distintas na mesma coluna caracterizam diferença estatística (ANOVA, seguida de Tukey,  $p < 0,05$ ) entre os grupos



**Tabela 4.** Teores médios dos parâmetros hematológicos de ratos submetidos a dietas à base de caseína e *Spirulina platensis*

Constituintes	Grupos			
	CC	CE	RC	RE
Proteínas Totais (mg/dL)	6,99 ± 0,51 <sup>a</sup>	6,90 ± 0,74 <sup>a</sup>	6,91 ± 0,30 <sup>a</sup>	7,15 ± 0,40 <sup>a</sup>
Albumina (mg/dL)	3,34 ± 0,41 <sup>a</sup>	3,14 ± 0,37 <sup>a</sup>	3,26 ± 0,35 <sup>a</sup>	3,30 ± 0,28 <sup>a</sup>
Globulina (mg/dL)	3,64 ± 0,26 <sup>a</sup>	3,75 ± 0,43 <sup>a</sup>	3,65 ± 0,23 <sup>a</sup>	3,85 ± 0,30 <sup>a</sup>
Colesterol Total (mg/dL)	82,22 ± 21,79 <sup>abc</sup>	68,52 ± 13,62 <sup>b</sup>	95,41 ± 31,10 <sup>a</sup>	68,85 ± 7,10 <sup>c</sup>
HDL - Colesterol (mg/dL)	33,68 ± 8,85 <sup>a</sup>	27,10 ± 6,30 <sup>a</sup>	32,20 ± 9,66 <sup>a</sup>	27,13 ± 4,98 <sup>a</sup>
LDL - Colesterol (mg/dL)	22,52 ± 14,61 <sup>a</sup>	22,48 ± 19,78 <sup>a</sup>	22,32 ± 13,82 <sup>a</sup>	21,06 ± 8,79 <sup>a</sup>
Triglicerídeos (mg/dL)	140,60 ± 58,77 <sup>ab</sup>	127,15 ± 43,20 <sup>ab</sup>	190,89 ± 89,26 <sup>a</sup>	104,00 ± 40,16 <sup>b</sup>

Os valores estão expressos em média ± desvio padrão. Letras minúsculas distintas na mesma linha caracterizam diferença estatística (ANOVA, seguida de Tukey,  $p < 0,05$ ) entre os grupos. Grupos: CC = Controle Caseína, CE = Controle Espirulina, RC = Recuperado Caseína e RE = Recuperado Espirulina

## DISCUSSÃO

Na busca de uma fonte proteica de rápida reprodução e boa qualidade, a alga *Spirulina platensis* surge como uma alternativa deste nutriente atendendo essas exigências, sendo, no entanto, necessário compará-la com uma proteína de alto valor biológico como a caseína.

A *Spirulina platensis* utilizada neste experimento apresentou a média do extrato etéreo de 3,29% diferindo de pesquisas anteriores em que a concentração de lipídios foi de 14,3%<sup>17</sup>, como também os valores entre 14,2 e 16,3%<sup>25</sup>, e aproximando-se do valor encontrado por Nagoaka et al<sup>26</sup> de 7,8%. O percentual de proteína da *Spirulina platensis* encontrado foi de 59,65%, valor aproximado dos percentuais encontrados por Babadzhanov et al<sup>17</sup> como também na pesquisa de Nagoaka et al<sup>26</sup> e de Pelizer et al<sup>27</sup>, em que afirma que este valor pode variar de 55 à 63,2% dependendo das condições de cultivo. Condições de cultivo como temperatura, pH, iluminação, meio de cultura, monitoramento do crescimento e a cultura iniciadora, influenciam em qualidade e em quantidade do perfil aminoacídico da *Spirulina platensis*<sup>17</sup>. Em condições adequadas produz quantidades significativas de aminoácidos essenciais como valina, isoleucina e leucina, comparada a caseína<sup>26</sup>.

Na pesquisa de Araújo et al<sup>28</sup>, onde foram comparadas biomassas de espirulina originadas do México, China e Cuba, em diferentes concentrações na

dieta, o ganho de peso dos grupos que consumiram dietas com biomassas de espirulina de origens diferentes, em nenhum momento diferiu do grupo controle. Em outra pesquisa, realizada por Nagoaka et al<sup>26</sup>, onde também foram comparados animais que receberam dietas à base de espirulina comparadas com animais que receberam dieta à base de caseína, não houve diferença entre os grupos experimentais e controle em relação ao ganho de peso, comprovando a eficiência da espirulina como fonte alimentar. Em uma pesquisa realizada por Kern et al<sup>29</sup>, comparando a proteína da soja com a caseína, também não houve diferença em relação ao ganho de peso. Na pesquisa realizada por Prazeres et al<sup>25</sup>, foi observado que a desnutrição a partir da dieta básica regional (DBR) e a recuperação com dieta equilibrada segundo a AIN-93, obtiveram-se diferença do ganho de peso entre grupo desnutrido e grupo recuperado.

As alterações anatômicas na deficiência proteico-energética podem ser generalizadas, como hipoplasia e atrofia dos tecidos e, conseqüentemente, diminuição do tamanho corporal e dos órgãos<sup>30</sup>. Portanto, a análise do peso de diversos órgãos permite verificar o comprometimento de sua massa e de sua estrutura, em detrimento do desequilíbrio proteico<sup>14</sup>. De acordo com Boza et al<sup>31</sup>, em casos de restrição alimentar, pode ocorrer redução de 30% no peso do fígado e que essa perda é proporcionalmente maior quando comparada à perda de massa corporal.

Em vários estudos foram relatados o efeito anticancerígeno e hipolipidêmico que a espirulina exerce sobre o fígado<sup>32-34</sup>. Na pesquisa de Nagaoka et al<sup>26</sup>, o peso do fígado de grupos não submetidos à restrição proteica, consumindo caseína e espirulina, não apresentou diferenças estatísticas. Nessa pesquisa observaram-se diferenças entre os grupos CC e CE, como também entre os grupos recuperados, onde o peso do fígado do grupo RE foi superior ao grupo RC, no entanto, não atingiu estatisticamente o peso do grupo CC. Este aumento do peso do fígado no grupo RE pode ser elucidado pelas características fisiológicas de regeneração deste órgão, uma vez que a resposta a metabolização a substâncias incomuns estimula as reações de proteção do fígado<sup>32-34</sup>. Podendo a espirulina ser incluída como opção na recuperação de ratos que foram submetidos à restrição proteica.

Foi verificada por Nagaoka et al<sup>35</sup> a diferença do peso do fígado entre o grupo controle e o grupo experimental com dieta à base de soja; neste último, o peso relativo do fígado foi inferior ao do grupo controle. Na presente pesquisa não foi observada morte celular ou anormalidades histológicas nas células hepáticas, apenas redução do peso relativo do fígado em grupos submetidos à restrição proteica coerentes com os dados da pesquisa de Kouda et al<sup>36</sup>, onde foi verificado o efeito da restrição dietética, em curto prazo, no metabolismo das proteínas e na morte e proliferação de células do fígado, chegando a conclusão que o grupo experimental que passou por jejum teve o peso do fígado reduzido, justificado pela morte de células hepáticas e redução do glicogênio armazenado no fígado, porém os resultados da pesquisa não foram suficientes para detectar que em curto prazo o jejum proporciona anormalidades no metabolismo das proteínas no fígado.

Ugochukwu et al<sup>37</sup>, em pesquisa sobre a modificação da resposta inflamatória durante a restrição calórica em fígados de ratos diabéticos, observou que a restrição de calorias reduziu o peso do fígado do grupo não diabético também. Na pesquisa de Machado et al<sup>38</sup> observou-se o efeito de probiótico na hipercolesterolemia em ratos e verificou que o peso do fígado dos animais com dieta hipercolesterolemia suplementada ou não com probiótico foram superiores a dos animais que receberam dieta sem colesterol, concluindo que o colesterol é que proporciona o aumento do volume do fígado.

O percentual de gordura corporal e sua distribuição são relevantes e, especificamente, a gordura visceral parece ser um dos fatores responsáveis pelo aparecimento de doenças crônicas degenerativas<sup>39</sup>. Apesar de não ter havido

diferença entre os grupos em se tratando da gordura corporal, pode-se perceber que os maiores valores são aqueles dos grupos CC e CE, que receberam dieta equilibrada durante todo o experimento. Em relação aos parâmetros bioquímicos proteicos (proteínas totais, albumina e globulina), nessa pesquisa não foi encontrada diferença estatística entre os quatro grupos. Provavelmente, após a recuperação houve uma normalização da concentração de proteínas totais sanguíneas. Resultados semelhantes foram encontrados por Nagaoka et al<sup>35</sup> e Torres-Dúran et al<sup>33</sup> entre os grupos de animais controle e alimentados com outras fontes proteicas. Na pesquisa de Kouda et al<sup>36</sup> houve diferença em relação às proteínas totais entre o grupo controle e em animais submetidos à dieta de restrição que consistia em jejum de 48 horas, o segundo grupo apresentou concentrações inferiores, o que não aconteceu como teor de albumina e colesterol total.

Na pesquisa de Nagaoka et al<sup>26</sup> as concentrações de colesterol total foram inferiores no grupo que consumiu espirulina em relação ao grupo controle; este resultado é semelhante ao da presente pesquisa, no qual o valor do colesterol total nos grupos CE e RE apresentaram-se inferior estatisticamente.

Na comparação da dieta à base de soja com a dieta à base de caseína, Nagaoka et al<sup>35</sup>, observou-se que o colesterol total e os triglicerídios não apresentaram diferença, porém, os valores das frações HDL e LDL foram diferentes, este resultado divergiu dos resultados encontrados por Kern et al<sup>29</sup> dos efeitos da soja nas frações lipídicas sanguíneas, que encontrou diferença apenas no colesterol total.

Brandsch et al<sup>40</sup>, pesquisaram os efeitos das proteínas das carnes bovina, suína e de peru na concentração sanguínea de lipídios em ratos, com dietas à base de soja e caseína, e perceberam que os valores de colesterol total e frações HDL e LDL não diferiu entre os grupos, porém, os valores de triglicerídios ficaram menores no grupo alimentado com a proteína da soja.

Considerando as variáveis pesquisadas, o uso da *Spirulina platensis* pode ser recomendado como substituto da caseína em modelos de pesquisas com animais consumindo dieta equilibrada segundo a AIN-93, com relação às variáveis: peso, constituintes bioquímicos e gordura de carcaça. No entanto, quanto ao uso desta para recuperar ratos que consumiram dieta com restrição proteica, pode-se concluir que, embora os valores de colesterol total e triglicerídios se apresentassem menores e todas as outras variáveis bioquímicas se apresentassem semelhantes, o peso do fígado foi maior. Sugere-se, então,

que sejam realizadas outras pesquisas mais prolongadas para se observar as diferenças entre grupos recuperados com as diversas dietas no que diz ao peso do fígado e à composição aminoacídica da *Spirulina platensis*.

#### AGRADECIMENTO

Os autores agradecem à Fazenda Tamanduá pela doação da *Spirulina platensis*, à Prof<sup>a</sup>. Maria Lúcia da Conceição por disponibilizar o Laboratório de físico-química e microbiologia dos alimentos da UFPB, à Prof<sup>a</sup> Rita de Cássia por dispor o Laboratório de Bromatologia da UFPB, à Equipe do Laboratório de Nutrição Experimental da UFPE, a toda a equipe do Laboratório de Nutrição Experimental da UFPB e ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Nutrição da UFPB.

#### REFERÊNCIAS

1. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Assessment of the World Food Security Situation. Committee on World Food Security Twenty-Seventh Session, Rome, May 28, June 1, 2001.
2. Correia MI, Campos AC. Prevalence of hospital malnutrition in Latin America: the multicenter ELAN study. *Nutrition*. 2003;19: 823-5.
3. Pablo AM, Izaga MA, Alday LA. Assessment of nutritional status on hospital admission: nutritional scores. *Eur J Clin Nutr*. 2003; 57:824-31.
4. Pirlich M, Schütz T, Norman K, Gastell S, Lübke HJ, Bischoff SC et al. The German hospital malnutrition study. *Clin Nutr*. 2006; 25:563-72.
5. Wyszynski DF, Perman M, Crivelli A. Prevalence of hospital malnutrition in Argentina: preliminary results of a population-based study. *Nutrition*. 2003; 19:115-9.
6. D'Souza AL. Ageing and gut. *Postgrad Med J*. 2007; 83:44-53.
7. Moynihan PJ. The relationship between nutrition and systemic and oral well-being in older people. *J Am Dental Assoc*. 2007;138:493-497.
8. Kyle UG, Unger P, Mensi N, Genton L, Pichard C. Nutrition status in patients younger and older than 60 y at hospital admission: a controlled population study in 995 subjects. *Nutrition*. 2002; 18:463-9.
9. Volkert D, Hubsch S, Oster P, Schlierf G. Nutritional support and functional status in undernourished geriatric patients during hospitalization and 6 month follow up. *Aging Clin Exp Res*. 1996; 8:386-95.
10. Waitzberg DL, Caiaffa WT, Correia I TD. Hospital Malnutrition: The Brazilian National Survey (IBRANUTRI): a Study of 4000 Patients. *Nutrition*. 2001; 17: 573-80.
11. Fabre EE, Raynaud-Simon A, Golmard JL, Hebert M, Dulcire X, Succari M et al. Gene polymorphisms of oxidative stress enzymes: prediction of elderly renutrition. *Am J Clin Nutr*. 2008; 87:1504-12.
12. Tannenbaum SR. Single cell protein. Massachusetts: MIT; 1975. v.2.
13. Yada E, Nagata H, Noguchi Y, Kodera Y, Nishimura H, Inada Y et al. An Arginine Specific from *Spirulina platensis*. *Mari Biothec*. 2005;7: 474-80.
14. Loh SP, Omar H, Abdullah SA, Ismail M. Effects of calcium supplementation on iron bioavailability from spirulina. *Nutr Food Sci*. 2006; 36:429-37.
15. Belay A, Ota Y, Miyakawa K, Shimatsu H. Current knowledge on potential health benefits of spiruline. *J Appl Physic*. 1993; 5:235-41.
16. Belay A. The potential application of *Spirulina (Arthorspira)* as a nutritional and therapeutic supplement in health management. *J Am Nutraceutic*. 2002; 5:27-48.
17. Babadzhanyan AS, Abdusamatova N, Yusupova FM, Faizullaeva N, Mezhlumyan LG, Malikova MKh. Chemical Composition of *Spirulina platensis* cultivated in Uzbekistan. *Chem Nat Comp*. 2004; 40:276-9.
18. Layman DK, Boileau RA, Erickson DJ, Painter JE, Shiue H, Sather C et al. A reduced ratio of dietary carbohydrate to protein improves body composition and blood lipid profiles during weight loss in adult women. *J Nutr*. 2003; 7:133-411.
19. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 1975.
20. Vanderzant C, Splittstoesser DF. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3<sup>a</sup> ed. Washington: APHA; 1992.
21. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93. Purified diets for laboratory rodents; final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of AIN-76A Rodent Diet. *J Nutri*. 1993; 123:1939-51.
22. Merusse JLB, Lapichik VBV. Instalações e equipamentos. In: De Luca RR, Alexandre SR, Marques T, Souza NL, Merusse JLB, Neves SP (Eds.). Manual para técnicos em bioterismo. 2.ed. São Paulo: Winner Graph. 1996. p. 15-25.
23. Cecchi HM. Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos. 2<sup>a</sup> ed. Campinas: Unicamp; 2003. p. 22.
24. Friedewald WT, Levi RI, Fredrickson, DS. Estimation of the concentration of low density lipoproteins cholesterol in plasma without use of the ultracentrifuge. *Clin Chem*. 1972; 18:499-502.
25. Prazeres FG, Pessoa DCNP, Bion FM, Arnauld TMS. Exercício físico, crescimento e desenvolvimento: estudo em ratos jovens desnutridos pela dieta básica regional (DBR) e recuperados nutricionalmente. *Rev Bras Educ Fís*. 2004; 18:7-16.
26. Nagoaka S, Shimizu K, Kaneko H, Shibayama F, Morikawa K, Kanamaru Y et al. A novel protein C-phycoerythrin plays a crucial role in the hypocholesterolemic action of *spirulina platensis* concentrate in rats. *J Nutr*. 2005; 2425-30.
27. Pelizer LH, Danesi EDG, Rangel OC, Sassano CEN, Carvalho JCN, Sato S et al. Influence of inoculum age and concentration in *Spirulina platensis* cultivation. *J Food Engin*. 2003; 56:371-5.

28. Araújo KGL, Facchinetti AD, Santos CP. Influência da ingestão e biomassas de *Spirulina* (*Arthrospira sp.*) sobre o peso corporal e consumo de ração em ratos. *Ciênc Tecnol Alimen*. 2003; 23:6-9.
29. Kern M, Ellison D, Marroquin Y, Ambrose M, Mosier K. Effects of soy protein supplemented with methionine on blood lipids and adiposity of rats. *Nutrition*. 2002; 18:654.
30. Nunes ML, Batista BB, Micheli F, Batistella V. Efeitos da desnutrição precoce e reabilitação nutricional em ratos. *J Pediatr*. 2002; 1:39-44.
31. Boza JJ, Moënoz D, Vuichoud J, Jarret AR, Gaudard-de-Weck D, Fritsché R, et al. Food deprivation and refeeding influence growth, nutrient retention and functional recovery of rats. *J Nutr*. 1999; 129:1340-6.
32. Ismail MF, Ali DA, Fernando A, Abdraboh ME, Gaur RL, Ibrahim WM et al. Chemoprevention of rat liver toxicity and carcinogenesis by *Spirulina*. *Int J Biol Sci*. 2009; 5(4):377-87.
33. Torres-Durán PV, Miranda-Zamora R, Paredes-Carbajal MC, Mascher D, Blé-Castillo J, Díaz-Zagoya JC et al. Studies on the preventive effect of *Spirulina maxima* on fatty liver development induced by carbon tetrachloride, in the rat. *J Ethnopharmacol*. 1999; 64(2):141-7.
34. Torres-Durán PV, Miranda-Zamora R, Paredes-Carbajal MC, Mascher D, Díaz-Zagoya JC, Juárez-Oropeza MA. *Spirulina maxima* prevents induction of fatty liver by carbon tetrachloride in the rat. *Biochem Mol Biol Int*. 1998; 44(4):787-93.
35. Nagaoka S, Miwa K, Eto M, Kuzuya Y, Hori G, Yamamoto K. Soy protein peptic hydrolysate with bound phospholipids decreases micellar solubility and cholesterol absorption in rats and caco-2 cells. *J Nutr*. 1999; 129:1725-30.
36. Kouda K, Nakamura H, Kogno H, Ha-Kawa SK, Tokunaga R, Sawada S. Dietary restriction: effects of short-term fasting on protein uptake and cell death/proliferation in the rat liver. *Mech Ageing Develop*. 2004; 125:375-80.
37. Ugochukwu NH, Figgers CL. Dietary caloric restriction modifies inflammatory responses in the livers of streptozotocin-induced diabetic rats. *Nutr Res*. 2006; 26:221-6.
38. Machado DE, Ferreira CLLE, Costa NMB, Oliveira TT. Efeito probiótico na modulação dos níveis de colesterol sérico no peso do fígado de ratos alimentados com dieta rica em colesterol e ácido cólico. *Ciênc Tecnol Alim*. 2003; 23:270-5.
39. Ribeiro Filho FF, Mariosa LS, Ferreira SRG, Zanella MT. Gordura visceral e Síndrome metabólica: mais que uma simples associação. *Arq Bras Endocr Metabol*. 2006; 50:230-8.
40. Brandsch C, Shukla A, Hirche F, Stangl GI, Eder K. Effect of proteins from beef, pork, and turkey meat on plasma and liver lipids of rats compared with casein and soy protein. *Nutrition*. 2006; 22:1162-70.

# Teores de carotenoides em produtos de tomate

## Carotenoid contents in Brazilian tomato products

RIALA6/1259

Cintia Nanci KOBORI<sup>1</sup>, Lísia Senger HUBER<sup>1</sup>, Mieko KIMURA<sup>2</sup>, Delia B. RODRIGUEZ-AMAYA<sup>1\*</sup>

Endereço para correspondência: Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, C.P. 6121, 13083-862 Campinas, SP, Brasil. Tel.: (19) 3521-4013. e-mail: delia@fea.unicamp.br

<sup>1</sup>Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, SP, Brasil

Recebido: 09.09.2009 – Aceito para publicação: 10.02.2010

### RESUMO

A composição dos carotenoides em produtos de tomate foi anteriormente determinada em nosso laboratório, utilizando-se cromatografia em coluna aberta. Em virtude da introdução de novas variedades de tomate, do desenvolvimento de novos produtos e dos avanços tecnológicos nas áreas de processamento e de técnicas analíticas, esses dados necessitavam ser atualizados. Neste contexto, no presente estudo determinou-se a composição de carotenoides em produtos de tomates por meio de técnica CLAE. As amostras de extrato, catchup, polpa, molho pronto e tomate seco foram adquiridas em supermercados em Campinas-SP. Para cada produto, foram adquiridos cinco lotes diferentes de cada uma das três marcas (no total de 65 amostras), em que cada lote foi composto por três embalagens coletadas ao acaso. As faixas de licopeno e de  $\beta$ -caroteno total ( $\mu\text{g/g}$ ) foram, respectivamente, 188-261 e 9,3-13 para extrato, 111-203 e 5,1-7,0 para catchup, 77-117 e 4,4-7,3 para polpa, 93-112 e 5,1-6,4 para molho pronto e 231-471 e 7,0-25 para tomate seco. O tomate seco, que foi analisado pela primeira vez, apresentou os maiores teores de licopeno e luteína. Os teores de  $\beta$ -caroteno do extrato e licopeno do extrato e catchup foram maiores nas amostras analisadas neste estudo, quando comparados com os resultados obtidos no trabalho anterior.

**Palavras-chave.** carotenoides, licopeno, produtos de tomate, CLAE.

### ABSTRACT

The carotenoid contents in Brazilian tomato products were previously determined at our laboratory by using raw material. The data regarding the development of new products, the advances on processing technologies and analytical techniques, need to be updated. In this context, the present study was carried out in order to determine the carotenoid contents of processed tomato products by means of HPLC. Samples of ketchup, sauce, paste, pulp and dried tomato were purchased at supermarkets in Campinas, Brazil. For each product, five different lots from each of the three brands (a total of 65 samples) were purchased, each lot consisting of three randomly collected packages. The lycopene and  $\beta$ -carotene concentration ranges ( $\mu\text{g/g}$ ) were 188-261 and 9.3-13 for paste, 111-203 and 5.1-7.0 for ketchup, 77-117 and 4.4-7.3 for pulp, 93-112 and 5.1-6.4 for sauce, 231-471 and 7.0-25 for dried tomato, respectively. Dried tomatoes, which were analyzed for the first time, showed the highest lycopene and lutein concentrations.  $\beta$ -carotene contents in the paste and lycopene contents in tomato paste and in ketchup samples analyzed by the present study were higher than those obtained in the previous investigation.

**Key words.** carotenoids, lycopene, tomato products, HPLC.

## INTRODUÇÃO

O tomate é um produto agrícola importante no mundo inteiro e é o vegetal mais consumido no país. O Brasil lidera a produção de tomate para processamento industrial na América do Sul, sendo o maior mercado consumidor de seus derivados industrializados. Os programas de melhoramento genético de instituições de pesquisas contribuíram para o progresso da cultura no país, priorizando a obtenção de cultivares mais bem adaptadas às condições climáticas das principais regiões produtoras (áreas do Cerrado em GO e MG), resistentes e/ou tolerantes a doenças e pragas limitantes e com melhores características agrônômicas e industriais<sup>1</sup>.

Ao longo da década de 90, as linhagens foram substituídas por híbridos de alto potencial produtivo e com características que atendiam aos requisitos dos processadores. Assim, as variedades de polinização aberta, que chegaram a ocupar cerca de 75% de toda área cultivada, deixaram praticamente de ser plantadas<sup>2</sup>. O impulso do uso de híbridos começou a se expandir a partir de 1997. Informações obtidas nas indústrias processadoras indicavam que as cultivares híbridas ocupava 45% da área plantada em 1998 e quase a totalidade da área em 2002<sup>3</sup>. De acordo com Melo e Vilela (2004)<sup>2</sup>, os principais híbridos plantados eram a Heinz 9992, APT 533, Heinz 9665, APT 529, Heinz 9553, Hypeel 108, Hycolor 312 e RTP 1095.

Há numerosos estudos sobre carotenoides contidos em tomate e seus derivados na literatura. Giovannucci<sup>4</sup> fez uma extensa revisão sobre os trabalhos publicados sobre tomates, produtos atomatados, câncer e estudos epidemiológicos. Concluiu que os tomates e seus produtos industrializados têm sido associados consistentemente com a diminuição do risco de certos tipos de câncer, com evidências fortes para pulmão, estômago e próstata e sugestivas para câncer cervical, de mama, boca, pâncreas, colo e esôfago. Estes benefícios são sempre atribuídos ao licopeno. Porém, um efeito direto do licopeno ainda não foi comprovado, e outros compostos presentes no tomate também podem ser importantes por suas atividades isoladas ou por interagir com o licopeno.

As atividades biológicas dos carotenoides têm sido relacionadas às suas propriedades antioxidantes, isto é, a sua capacidade de sequestrar o oxigênio singlete e de interagir com radicais livres<sup>5,6</sup>. O licopeno mostrou ser mais eficiente no sequestro de oxigênio singlete que o  $\beta$ -caroteno e outros antioxidantes estudados por Di Mascio et al<sup>7</sup>.

De acordo com Bramley<sup>8</sup>, 85% do licopeno consumido pelos humanos é obtido do tomate ou de seus derivados e o restante é proveniente da melancia, *grapefruit*, goiaba e mamão. O Brasil também conta com fontes de licopeno, como a pitanga<sup>9</sup>, melancia<sup>10</sup>, mamão<sup>11</sup> e o caqui<sup>12</sup>. No entanto, pelo alto consumo de tomate e seus produtos, estes continuam sendo as principais fontes deste carotenoide na dieta brasileira.

No Brasil, foram comercializados, em 2000, cerca de 350 mil toneladas de produto atomatados, sendo 41% de extrato simples concentrado, 30% de molhos prontos, 15% de catchup e 14% de polpa de tomate<sup>13</sup>. Em 2006, as companhias apostaram nos molhos prontos, que apresentavam crescimento contínuo de 46% nos últimos quatro anos, enquanto o consumo de extratos e polpas diminuía<sup>14</sup>.

A importância dos produtos processados de tomate se torna mais evidente quando a biodisponibilidade é considerada. Estudos indicam que o processamento pode aumentar a biodisponibilidade dos carotenoides pela ruptura da parede celular e pela desnaturação das proteínas complexadas com os carotenoides, facilitando a sua liberação da matriz alimentícia. O licopeno do tomate *in natura* ou do suco de tomate sem processamento foi menos absorvido em comparação com o licopeno de produtos de tomate processados, como o suco de tomate cozido com óleo de milho<sup>15</sup>, o tomate cozido com azeite de oliva<sup>16</sup> e o extrato de tomate<sup>17,18,19</sup>.

Bohm e Bitschi<sup>20</sup> verificaram a biodisponibilidade do licopeno em mulheres, separando-as em três grupos que ingeriram tomate *in natura*, suco de tomate ou cápsulas de licopeno oleaginoso. A menor absorção de licopeno ocorreu em mulheres que ingeriram tomate fresco, pois a matriz alimentícia sem processamento deve ter diminuído a biodisponibilidade do licopeno. A ruptura da matriz pela homogeneização mecânica e/ou o tratamento térmico aumentaram a biodisponibilidade do licopeno e do  $\beta$ -caroteno no estudo realizado por van het Hof et al<sup>21</sup> com extrato de tomate. O  $\beta$ -caroteno de cenoura e espinafre submetidos ao tratamento térmico também obteve maior biodisponibilidade em comparação com a obtida dessas fontes *in natura*<sup>22</sup>.

A biodisponibilidade parece estar afetada também pelas formas isoméricas. Os carotenoides estão presentes predominantemente na natureza na forma *trans*, os isômeros *cis* aparecem em concentrações bem menores, ocorrendo um aumento durante o processamento e estocagem. Já no plasma humano, foram encontrados altos teores de *cis*-licopeno<sup>23,24</sup>, indicando uma melhor absorção destes pelo

organismo. De acordo com Boileau et al<sup>25,26</sup>, os isômeros *cis* do licopeno são mais biodisponíveis que as formas *trans* por serem mais solúveis nas micelas de ácidos biliares e por serem incorporados preferencialmente pelos quilomícrons. Por outro lado, o *trans*- $\beta$ -caroteno foi preferencialmente absorvido em comparação com o 9-*cis*- $\beta$ -caroteno em humanos<sup>27,28</sup>. Portanto, quando há quantidades mensuráveis de isômeros *cis* nos alimentos, a separação e a quantificação dos isômeros são recomendáveis.

Tavares e Rodriguez-Amaya<sup>29</sup> já reportaram a composição de carotenoides de tomates e seus produtos determinada por cromatografia em coluna aberta. Porém, considerando a introdução de novas variedades de matéria-prima<sup>1-3</sup>, o desenvolvimento de novos produtos<sup>14</sup> e avanços nas tecnologias de processamento e técnicas analíticas, estes dados necessitavam ser atualizados. Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar os teores de carotenoides em cinco produtos de tomates industrializados, comercializados em Campinas-SP: extrato, catchup, polpa, molho pronto e tomate seco.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras

Foram amostradas três marcas (A, B e C) de cada produto, extrato, polpa, molho pronto e catchup, em diferentes supermercados da região de Campinas-SP. Para cada marca, foram analisados cinco lotes diferentes, compostos por três embalagens por lote coletadas ao acaso do grande lote do supermercado. As análises foram realizadas dentro das datas de validade dos produtos. Como o tomate seco é mais comumente adquirido e consumido a granel pela população, a amostragem foi composta por cinco amostras de 0,5 Kg, compradas em mercados diferentes. O tomate seco e o molho pronto foram analisados pela primeira vez.

### Determinação de carotenoides

A análise de carotenoides foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), baseada na metodologia de Kimura e Rodriguez-Amaya<sup>30</sup>, efetuando-se as adaptações necessárias às amostras. Este método foi validado anteriormente por Kimura et al<sup>31</sup>, utilizando um material de referência certificado.

As três embalagens de cada lote foram homogeneizadas num processador de alimentos. A extração dos carotenoides foi realizada com 2-3 g de amostra,

dependendo do produto, utilizando almofariz e pistilo, misturando celite (hyflosupercel) à amostra e utilizando acetona como solvente de extração. A mistura foi filtrada em funil de Büchner e o resíduo foi levado novamente ao almofariz. A extração e a filtração foram repetidas até que o resíduo se tornasse incolor. Fez-se a partição para éter de petróleo em um funil de separação e o extrato etéreo foi então concentrado em evaporador rotatório ( $T \leq 35^\circ \text{C}$ ) e seco com  $\text{N}_2$ . Imediatamente antes da injeção no cromatógrafo, o extrato seco foi redissolvido em acetona de grau cromatográfico e filtrado em filtro PTFE 0,22  $\mu\text{m}$ .

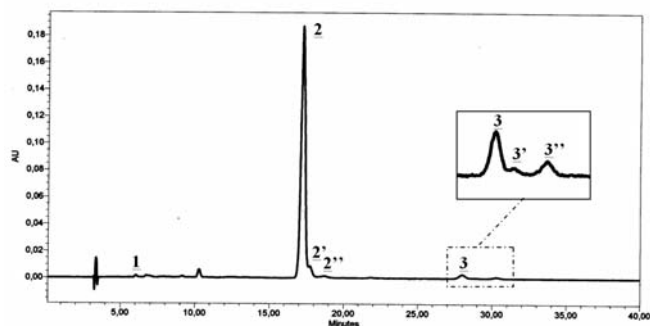
Os padrões foram isolados de melancia (licopeno), rúcula (luteína) e batata doce ( $\beta$ -caroteno) por cromatografia em coluna aberta (CCA) de vidro empacotada com mistura de MgO:hyflosupercel (1:1), previamente ativada por 4 horas a  $110^\circ\text{C}$ . As soluções foram quantificadas espectrofotometricamente na região visível e as concentrações foram corrigidas de acordo com a pureza da solução determinada por CLAE. A média da pureza dos padrões obtidos foram 96% para licopeno, 94% para luteína e 96% para  $\beta$ -caroteno.

A identificação dos carotenoides foi realizada de acordo com Rodriguez-Amaya<sup>31</sup>, utilizando em conjunto o comportamento cromatográfico e cocromatografia com padrões de carotenoides, análise dos espectros de absorção ( $\lambda_{\text{max}}$  e estrutura espectral fina) obtidos pelo DAD e espectrofotômetro UV-Visível e reações químicas específicas para grupos substituintes como acetilação, metilação, redução e rearranjo de grupos epóxidos.

A análise por cromatografia líquida de alta eficiência foi conduzida em um módulo de separação Waters (modelo 2690) equipado com bomba quaternária, degasser a vácuo na linha e detector de arranjo de diodos (DAD) Waters (Modelo 996), controlados por software Millennium (versão 3.20). Foi utilizada uma coluna monomérica  $\text{C}_{18}$  Spherisorb ODS2, 3 mm, 4,6 x 150 mm. A detecção dos carotenoides foi feita nos comprimentos de onda de absorção máxima (max plot) e a quantificação foi realizada por padronização externa. A curva foi composta por cinco pontos em triplicata. As curvas passaram pela origem e foram lineares nas faixas de concentração esperadas para as amostras, os coeficientes de correlação obtidos foram maiores que 0,99.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta um cromatograma típico dos carotenoides dos produtos industrializados de tomate, demonstrando a predominância de licopeno.



**Figura 1.** Cromatograma típico obtido por CLAE dos carotenoides de produtos de tomate. Identificação dos picos: 1. luteína, 2. *trans* licopeno, 2' e 2'' isômeros *cis* do licopeno, 3.  $\beta$ -caroteno e 3' e 3'' isômeros *cis* do  $\beta$ -caroteno. Detecção a 450 nm. Condições cromatográficas estão descritas no texto

A identificação do pico de licopeno foi realizada pelo seu espectro de absorção na região visível ( $\lambda_{\text{máx}}$  a 448, 473 e 505 nm na fase móvel; estrutura espectral % III/II = 71), de acordo com um cromóforo de 11 duplas ligações conjugadas, todas na cadeia poliênica. A ausência de grupos funcionais foi demonstrada pelo comportamento cromatográfico ( $t_R = 17$  minutos). Este carotenoide coeluiu com o padrão de licopeno isolado por CCA.

O  $\beta$ -caroteno apresentou  $\lambda_{\text{máx}}$  a 455 e 482 nm na fase móvel, tendo pouca estrutura espectral (% III/II = 25), refletindo um cromóforo de 11 duplas conjugadas, porém, com duas duplas nos anéis  $\beta$ . O tempo de retenção ( $t_R = 28$  minutos) indica a ausência de substituintes. Além disso, este carotenoide coeluiu com o padrão de  $\beta$ -caroteno isolado por CCA.

A luteína apresentou  $\lambda_{\text{máx}}$  a 424, 448 e 476 nm na fase móvel, tendo estrutura espectral intermediária (% III/II = 60), que é típico para um carotenoide com 10 duplas conjugadas, nove na cadeia poliênica e uma no anel b. O comportamento cromatográfico foi de acordo com o característico para carotenoides dihidroxilados ( $t_R = 6$  minutos). Este carotenoide também coeluiu com o padrão de luteína isolado por CCA.

Observa-se na Tabela 1 que o licopeno total (*trans* + *cis*) foi encontrado em alta concentração em todos os produtos, variando de 77  $\mu\text{g/g}$  em polpa de tomate a 361  $\mu\text{g/g}$  no tomate seco.

Tavares e Rodriguez-Amaya<sup>29</sup> obtiveram faixas de 164–183, 86–103 e 89–133  $\mu\text{g/g}$  para licopeno e 4,3–6,6, 3,5 e 3,0–5,0 para  $\beta$ -caroteno em extrato de tomate enlatado, catchup e polpa embalada em caixa Tetra Pak®, respectivamente. Em comparação com os dados obtidos no presente trabalho, para *trans*- $\beta$ -caroteno, estes valores são

ligeiramente menores para extrato e similares para catchup e polpa; para *trans*-licopeno, os teores são semelhantes para polpa, mais menores para extrato e catchup. As diferenças se devem, provavelmente, às substituições do cultivar de tomate utilizado pela indústria e/ou as modificações realizadas no processamento pela indústria.

**Tabela 1.** Teores dos principais carotenoides nos produtos de tomate em base úmida

Marca	Concentração de carotenoides ( $\mu\text{g/g}$ ) <sup>a</sup>				
	licopeno		$\beta$ -caroteno		luteína
	<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>	total <sup>b</sup>
<b>Extrato (em lata)</b>					
A	243 ± 43	14 ± 3,2	9,2 ± 2,5	3,6 ± 1,0	Tr
B	248 ± 25	13 ± 1,8	9,1 ± 1,5	3,6 ± 0,5	Tr
C	179 ± 23	9,6 ± 1,3	6,5 ± 1,1	2,8 ± 0,1	Tr
<b>Catchup (em frasco plástico)</b>					
A	104 ± 17	6,6 ± 0,6	3,5 ± 0,7	1,5 ± 0,5	Tr
B	192 ± 38	11 ± 1,8	5,2 ± 1,6	1,8 ± 0,6	Tr
C	147 ± 33	8,0 ± 0,2	4,7 ± 1,2	1,8 ± 0,2	Tr
<b>Polpa (em caixa Tetra Pak®)</b>					
A	72 ± 12	5,1 ± 1,2	3,0 ± 0,7	1,4 ± 0,4	Tr
B	110 ± 30	6,7 ± 2,2	5,1 ± 2,1	2,1 ± 0,7	Tr
C	81 ± 23	5,0 ± 0,7	3,2 ± 0,5	1,4 ± 0,2	Tr
<b>Molho pronto (em lata)</b>					
A	90 ± 23	6,6 ± 1,4	3,3 ± 0,7	2,1 ± 0,3	Tr
B	84 ± 12	8,9 ± 0,9	3,0 ± 0,5	2,1 ± 0,4	Tr
C	99 ± 26	13 ± 0,5	4,1 ± 0,5	2,3 ± 0,2	Tr
<b>Tomate seco a granel</b>					
	343 ± 96	18,3 ± 5,2	13 ± 6,8	2,7 ± 0,9	4,0 ± 0,9

<sup>a</sup>Média e desvio padrão dos 5 lotes diferentes;

<sup>b</sup>total = *trans* + *cis*;

Tr = traço (<0,1  $\mu\text{g/g}$ )



A composição de carotenoides em molho pronto e tomate seco foi avaliada pela primeira vez. Os molhos de tomate apresentaram teores de licopeno e  $\beta$ -caroteno similares aos da polpa e bem menores que do extrato, um resultado esperado uma vez que o último é um produto concentrado. Os molhos, porém, estão prontos para serem consumidos, enquanto que o extrato é incorporado em receitas e, portanto, diluído. Já o tomate seco, que é um produto introduzido mais recentemente, possui licopeno,  $\beta$ -caroteno e luteína em concentrações 10 vezes maiores que no tomate fresco e é um produto pronto para consumo. O maior teor de carotenoides deste produto deve ocorrer devido à perda de água durante o processamento, que resulta na concentração destes compostos mesmo com provável degradação devido ao uso de altas temperaturas.

Segundo Melo e Vilela<sup>1</sup>, o desenvolvimento de cultivares para o processamento do tomate seco ainda constitui um importante nicho para pesquisas, pois vem apresentando tendências de franca expansão no mercado. Atualmente, não existem cultivares adequadas para a produção de tomate seco, as cultivares utilizadas possuem grande quantidade de água na polpa, que exige muito tempo para desidratação completa (em média 12 horas). A fabricação de tomate seco no Brasil tem sido realizada por pequenas empresas que ainda utilizam equipamentos artesanais. Mesmo com sua produção ainda não otimizada pela indústria, o tomate seco apresentou as maiores concentrações de todos os carotenoides avaliados.

Embora os produtos de tomate tenham sido extensivamente analisados em outros países, foi encontrado apenas um trabalho brasileiro, além dos dois trabalhos realizados no nosso laboratório, que avaliou somente uma marca de polpa e catchup e ainda reportou a quantificação dos carotenoides individuais em base seca<sup>33</sup>. Os teores de carotenoides totais obtidos em base úmida foram bem superiores para polpa (348-355  $\mu\text{g/g}$ ) e próximos para catchup (123-131  $\mu\text{g/g}$ ) em comparação com os nossos resultados.

Os teores de licopeno e  $\beta$ -caroteno total (mg/g) dos produtos de tomate avaliados nos Estados Unidos, encontrados no banco de dados do USDA (*United States Department of Agriculture*)<sup>34</sup> são, respectivamente, 288 e 9,0 para extrato, 167 e 5,6 para catchup, 218 e 3,1 para polpa, 140 e 2,6 para molho pronto. Estes valores são próximos para o extrato e maiores para catchup e especialmente para polpa e molho pronto, em relação aos dados do presente trabalho.

## CONCLUSÃO

A introdução de novas variedades de matéria-prima e os avanços das tecnologias de processamento refletiu num aumento das concentrações de carotenoides nos produtos de tomates comercializados no Brasil. O desenvolvimento de novos produtos, como os molhos prontos e o tomate seco, também contribui para o aumento da oferta desses alimentos fontes de carotenoides. O tomate seco destacou-se pelos altos teores de licopeno.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), projeto PRONEX n° 2003/10151-4, pelo financiamento.

## REFERÊNCIAS

1. Melo PCT, Vilela NJ. Desafios e perspectivas para a cadeia brasileira do tomate para processamento industrial. *Hortic Bras* 2005; 23 (1): 154-7.
2. Melo PCT, Vilela NJ. Desempenho da cadeia agroindustrial brasileira do tomate na década de 90. *Hortic Bras*. 2004; 22 (1): 154-60.
3. Embrapa Hortaliças. Cultivo de tomate para industrialização. 2003. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Tomate/TomateIndustrial/index.htm>.
4. Giovannucci E. Tomatoes, tomatoes-based products, lycopene, and câncer: review of the epidemiologic literature. *J National Cancer Inst*. 1999; 91 (4): 317-31.
5. Burton GW. Antioxidant action of carotenoids. *J Nutr*. 1989; 119: 109-11.
6. Krinsky NI. Antioxidant unctions of carotenoids. *Free Radical Bio Med*. 1989; 7: 617-35.
7. Di Mascio P, Kaiser S, Sies H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch Biochem Biophys*. 1989; 274: 532-8.
8. Bramley PM. Is lycopene benecial to human health? *Phytochem*. 2000; 54: 233-6.
9. Porcu OM, Rodriguez-Amaya DB. Variation in the carotenoid composition of the lycopene-rich brazilian fruit *Eugenia uniflora* L. *Plant Foods Hum Nutr*. 2008; 63: 195-9.
10. Niizu PY, Rodriguez-Amaya DB. A melancia como fonte de licopeno. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2003; 62(3): 195-200.

11. Sentanin MA, Rodriguez-Amaya DB. Teores de carotenóides em mamão e pêssego determinados por cromatografia líquida de alta eficiência. *Ciênc Tecnol Alim*. 2007; 27: 787-92.
12. Brossard J, Mackinney G. The carotenoids of *Diospyros kaki* (Japanese Persimmons). *J Agric Food Chem*. 1963; 11 (6): 501-3.
13. Araújo L. Atomatados: um mercado disputado por gigantes mundiais. *Brasil Alim*. 2001; 9: 21-2.
14. Brasil. Alimentos. Atomatados: setor substitui embalagens de aço por caixinhas. 2007; 308. Available from: <http://www.signuseditora.com.br/BA/default.asp>.
15. Stahl W, Sies H. Uptake of lycopene and its geometrical isomers is greater from heat-processed than from unprocessed tomato juice in humans. *J Nutr*. 1992; 122: 2161-6.
16. Fielding JM, Rowley KG, Cooper P, O'Dea K. Increases in plasma lycopene concentration after consumption of tomatoes cooked with olive oil. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2005; 14 (2):131-6.
17. Agarwal A, Shen H, Agarwal S, Rao AV. Lycopene content of tomato products: its stability, bioavailability and in vivo antioxidant properties. *J Med Food*. 2001; 4: 9-15.
18. Gartner C, Stahl W, Sies H. Lycopene is more bioavailable from tomato paste than from fresh tomatoes. *Am J Clin Nutr*. 1997; 66: 116-22.
19. Richelle M, Bortlik K, Liardet S, Hager C, Lambelet P, Baur M et al. A food-based formulation provides lycopene with the same bioavailability to humans as that from tomato paste. *J Nutr* 2002; 132: 404-8.
20. Bohm V, Bitsch R. Intestinal absorption of lycopene from different matrices and interactions to other carotenoids, the lipid status and the antioxidant capacity of human plasma. *Eur J Nutr*. 1999; 38: 118-25.
21. van het Hof KH, de Boer BCJ, Tijburg LBM, Lucius BRHM, Zijp I, West CE et al. Carotenoid Bioavailability in Humans from Tomatoes Processed in Different Ways Determined from the Carotenoid Response in the Triglyceride-Rich Lipoprotein Fraction of Plasma after a Single Consumption and in Plasma after Four Days of Consumption. *J Nutr* 2000; 130: 1189-96.
22. Rock CL, Lovalvo JL, Emehiser C, Ruffin MT, Flatt SW, Schwartz SJ. Bioavailability of  $\beta$ -carotene is lower in raw than in processed carrots and spinach in women. *J Nutr*. 1998; 128: 913-6.
23. Stahl W, Schwarz W, Sundquist AR, Sies H. *Cis-trans* isomers of lycopene and  $\beta$ -carotene in human serum and tissues. *Arch Biochem Biophys*. 1992; 294 (1): 173-7.
24. Schierle J, Bretzel W, Bühler I, Faccin N, Hess D, Steiner K et al. Content and isomeric ratio of lycopene in food and human blood plasma. *Food Chem*. 1997; 59 (3): 459-65.
25. Boileau AC, Marchen NR, Wasson K, Atkinson CA, Erdman Jr JW. *Cis*-lycopene is more bioavailable than *trans*-lycopene in vitro and in vivo in lymph-cannulated ferrets. *J Nutr*. 1999; 129: 1176-81.
26. Boileau TWM, Boileau A, Erdman Jr. JW. Bioavailability of *all-trans* and *cis*-isomers of lycopene. *Exp Biol Med*. 2002; 227: 914-9.
27. Gaziano JM, Johnson EJ, Russell RM, Manson JE, Stampfer MJ, Ridker PM et al. Discrimination in absorption or transport of  $\beta$ -carotene isomers after oral supplementation with either *all-trans*-or *9-cis*- $\beta$ -carotene. *Am J Clin Nutr*. 1995; 61: 1248-52.
28. Stahl W, Schwarz W, von Laar J, Sies H. All-trans  $\beta$ -carotene preferentially accumulates in human chylomicrons and very low density lipoproteins compared with the *9-cis* geometrical isomer. *J Nutr*. 1995; 125: 2128-33.
29. Tavares CA, Rodriguez-Amaya DB. Carotenoid composition o brazilian tomatoes and tomatoes products. *Lebensm Wiss Technol*. 1994; 27: 219-24.
30. Kimura M, Rodriguez-Amaya DB. A scheme for obtaining standards and HPLC quantification of leafy vegetable carotenoids. *Food Chem*. 2002; 78 (3): 389-98.
31. Kimura M, Kobori CN, Rodriguez-Amaya DB, Nestel P. Screening and HPLC methods dor carotenoids in sweetpotato, cassava and maize for plant breeding trials. *Food Chem*. 2007, 100, 1734-46.
32. Rodriguez-Amaya DB. A guide to carotenoid analysis in foods. Washington, D. C.: International Life Sciences Institute Press; 1999.
33. Gama JJT, Tadiotti AC, de Sylos CM. Comparison of carotenoid content in tomato, tomato pulp and ketchup by liquid chromatography. *Alim Nutr*. 2006, 17, 353-8.
34. USDA (*United States Department of Agriculture*). National Nutrient Database for Standard Reference. Available from: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>

# Elaboração de massa fresca de macarrão enriquecida com pescado defumado

## Production of fresh paste pasta enriched with smoked fish

RIALA6/1260

Márcia Luzia Ferrarezi MALUF\*, Carlos Eduardo WEIRICH, Jackeline Marcante DALLAGNOL, Márcia Regina SIMÕES, Aldi FEIDEN, Wilson Rogério BOSCOLO

\*Endereço para correspondência: Grupo de Estudos de Manejo na Aquicultura, GEMaQ, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, UNIOESTE Campus Toledo, Rua da Faculdade, 645, Jardim La Salle, CEP 85903-000, Toledo, PR, Brasil. e-mail: mlmaluf@yahoo.com.br

Recebido: 27.04.2009 – Aceito para publicação: 15.03.2010

### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi de produzir massa fresca de macarrão com a incorporação de peixe defumado e avaliar as características microbiológicas, físico-químicas e sensoriais. O peixe utilizado para este experimento foi o pacu (*Piaractus mesopotamicus*), cultivados em tanques-rede no Reservatório da Itaipu Binacional no Município de Santa Helena - PR. Foram realizadas análises quanto aos teores de lipídios, umidade, proteínas, minerais totais, carboidratos e valor calórico, além da qualidade microbiológica do produto *in natura* e da massa de macarrão. A massa de macarrão foi submetida também à análise sensorial com avaliação dos atributos de aparência, cor, odor, sabor e textura. A massa de macarrão apresentou valores de 15,21% de proteínas; as análises físico-químicas indicaram alto teor proteico. Quanto à análise microbiológica do produto, os resultados obtidos apresentaram-se em conformidade com os valores exigidos pela legislação e, portanto, adequado para o consumo humano. A avaliação sensorial da massa de macarrão indicou alta aceitabilidade com 97% de aprovação. O acréscimo de carne de pescado na formulação da massa de macarrão apresentou vantagens qualitativas e quantitativas com relação à sua composição química, além de alta aceitabilidade do produto desenvolvido, o que mostra a viabilidade de sua produção.

**Palavras-chave.** Pacu, *Piaractus mesopotamicus*, tecnologia do pescado, massa alimentícia, processamento do pescado.

### ABSTRACT

The purpose of this study is to prepare fresh paste pasta with the addition of smoked fish, and to assess the microbiological and physical-chemical characteristics, and the sensory aspects. Pacu fish (*Piaractus mesopotamicus*) bred in captivity in the Binational Itaipu Reservoir located in the City of St. Helena - PR was analyzed on the contents of lipids, protein, total minerals, carbohydrates, moisture and caloric value. The Microbiological quality of the fresh product and the prepared pasta was assessed. The sensory aspects of the pasta were used to evaluate the appearance, color, odor, taste and texture characteristics. The pasta paste had 15.21% protein. The physical-chemical analysis on pasta showed high protein contents; and the microbiological results complied with the values established by the legislation in effect, being suitable for human consumption. The acceptability of sensory features on the prepared pasta had 97% of approval. The addition of fish meat in the pasta paste formulation furnished qualitative and quantitative advantages regarding the chemical composition besides the high acceptance, indicating the feasibility of its production.

**Key words.** Pacu, *Piaractus mesopotamicus*, fish technology, pasta, fish processing.

## INTRODUÇÃO

No Brasil, o consumo do pescado ainda é pouco expressivo, sendo considerado um dos menores índices per capita em todo mundo, ficando em torno de 8,7 kg/ano, bem inferior ao recomendado pela FAO (13kg/ano) e aos índices observados no Japão (86kg/ano), na Inglaterra (52kg/ano), na Espanha (35kg/ano), em Portugal (29kg/ano) e na França (24kg/ano)<sup>1</sup>. Este baixo índice do consumo pode ser atribuído à falta de tradição (hábitos do consumidor), à pequena oferta do produto de fácil preparo e variados, disponibilidade de pescado de qualidade e o fator socioeconômico do consumidor<sup>2</sup>.

Atualmente, verifica-se uma mudança no perfil nutricional da população, buscando uma alimentação mais saudável principalmente por produtos de forma mais elaborada possível com alto valor proteico e que apresentem bons atributos nutricionais, extensão da vida útil e segurança do alimento.

Uma alternativa para incrementar este consumo, pode ser direcionada em especial para alimentos de conveniência, pela oferta de novas formas de apresentação de produtos derivados do pescado, uma vez que a maior parte dele é consumida *in natura*, na forma de filé ou pescado inteiro eviscerado.

A indústria brasileira de pescado não tem acompanhado a inovação das indústrias de carnes bovinas e de aves, que fazem melhor uso da matéria-prima e desenvolvem diferentes produtos a partir dela. O consumidor está buscando produtos à base de pescado inovadores, rápidos e práticos.

A carne de pescado é recomendada para o consumo humano, pois é de fácil digestibilidade e excelente fonte de proteínas de alto valor biológico vitamina A, D e complexo B, ácidos graxos essenciais e minerais, principalmente cálcio e fósforo<sup>3,4</sup>. Por isso, se faz necessária a introdução de pescado na alimentação humana que contribuirá muito para a saúde do consumidor.

Nossa dieta contém uma ampla variedade de proteínas de diferentes fontes. É geralmente aceito que a concentração relativa de aminoácidos essenciais na dieta é o fator mais determinante no valor nutricional da proteína de um alimento. Proteínas derivadas de fontes animais, a exemplo dos pescados, são consideradas nutricionalmente superiores àquelas de origem vegetal, pois elas contêm um melhor balanço de aminoácidos essenciais para a dieta<sup>5</sup>.

O pacu (*Piaractus mesopotamicus*) dentre as espécies nativas apresenta grande potencial para a

piscicultura intensiva, devido à adaptabilidade ao cultivo com crescimento rápido, rusticidade, fácil adaptação a rações comerciais, docilidade no manejo e boa aceitabilidade pelo mercado consumidor<sup>6</sup>.

O processo de defumação é uma das alternativas para melhorar o aproveitamento de espécies de pescados. Na atualidade, não é mais empregada somente com o objetivo de conservação e sim como processo através do qual o produto adquire particularidades organolépticas agradáveis<sup>7</sup>.

A proposta deste estudo é utilizar um produto rotineiro, ou seja, uma massa alimentícia, que é bastante consumido em todo mundo, de forma a enriquecê-la nutricionalmente com carne de pescado, pois em termos de valor nutricional, este alimento é deficitário, uma vez que se destaca pela riqueza em carboidrato deixando a desejar em relação à quantidade e qualidade proteica. A massa alimentícia constitui uma das formas mais antigas de alimentação, sendo muito versátil, tanto do ponto de vista nutricional quanto do ponto de vista gastronômico, podendo ser de diversas formas preparadas e servidas<sup>8</sup>. É um alimento produzido com tecnologia simples; de baixo custo; de fácil preparo; rápida e atrativa, disponível nos mais variados formatos, tamanhos e cores; tem vida de prateleira (ou vida útil) relativamente longa, como por exemplo, as massas frescas que tem vida útil em torno de 30 dias; não requer embalagens sofisticadas; do ponto de vista nutricional, são ricas em amido e com baixos teores de gordura; podendo ser enriquecidas com vitaminas e minerais, sendo veículo para melhora da dieta. Estas estão definitivamente incorporadas ao hábito alimentar do brasileiro, sendo consumida por todas as idades e classes sociais, servido como prato principal ou complemento, em muitas combinações, com alto índice de aceitabilidade.

O Brasil está entre os cinco maiores produtores de macarrão do mundo, ficando como 2º maior consumidor, que já faz parte até da cesta básica dos brasileiros. O consumo per capita de macarrão é, em média, de 5,7Kg no País<sup>9</sup>.

O objetivo deste trabalho foi utilizar a carne de pescado na elaboração de massa de macarrão para alimentação humana, e avaliar os parâmetros microbiológicos, físico-químicos e aspectos sensoriais, visando contribuir com o aumento do consumo do pescado.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Matéria-Prima

A matéria-prima utilizada foi pacu (*Piaractus mesopotamicus*), cultivado em tanques-rede instaladas no

Reservatório de Itaipu Binacional do município de Santa Helena – PR.

Os pacus, após a captura, foram acondicionados em caixa térmica, contendo gelo triturado e conduzido ao Laboratório de Tecnologia do Pescado da UNIOESTE – Campus de Toledo-PR.

Os pacus utilizados apresentaram cerca de 850 g de peso vivo no laboratório. Os animais foram devidamente lavados em água clorada, descamados, eviscerados, novamente lavados e pesados.

## MÉTODOS

### Defumação dos pescados

Os pescados foram imersos em uma solução salmoura a 20%, na proporção 2:1 (volume da salmoura/peso) e posteriormente foram adicionados os condimentos, permanecendo em repouso por 1 hora. Após este período, os pescados foram lavados em água corrente para eliminar o excesso de sal e evitar a formação de cristais após a defumação, em seguida foram drenados por 50 minutos e levados a um defumador semi-industrial onde permaneceu em contato com a fumaça por 4 horas e meia a temperatura de 50°C inicial e 80°C final, portanto o processo de defumação foi a quente<sup>10</sup>.

### Processamento do macarrão

Após a defumação, foram retirados os filés dos pescados que posteriormente foram triturados em moedor até apresentar aspecto de farinha para incorporação à massa. Para o preparo da massa, foram pesadas farinha de trigo peneirada (53,2%), ovo em pó integral desidratado (5%) (cada 12,5g foi misturado a 37,5 ml de água, isto corresponde a um ovo *in natura*), sal (1%), urucum (0,2%), e carne de pescado defumado triturado (30,6%) e água (10%).

Os ingredientes foram misturados, em seguida, ocorreu o processo de amassamento e, por último, moldados em trefila com formato de talharim fino. Após a moldagem, a massa foi acondicionada numa bandeja em ambiente seco, ventilado e adequado higienicamente, para que a secagem superficial fosse a mais rápida possível para evitar contaminação ao produto.

### ■ Preparo das amostras para análises laboratoriais

Após o processamento, porções de pescado defumado e massa de macarrão foram secas em estufa sob ventilação forçada a 60°C, posteriormente triturada

em moinhos e separada em alíquotas para as análises posteriores quanto à composição centesimal.

### Composição centesimal

As determinações de umidade residual (105°C), proteínas, lipídeos e cinzas foram realizados em triplicatas, segundo métodos da AOAC (Association of Official Analytical Chemists)<sup>11</sup>.

### Análise microbiológica

Para verificar as condições do processamento, higiene e manipulação do pescado inteiro *in natura* e do macarrão estes foram analisadas microbiologicamente. Após a formulação da massa foram retiradas assepticamente 25g do produto para a realização das análises utilizando-se metodologia para contagem total de bactérias aeróbias mesófilas, pesquisa de coliformes a 45°C (NMP/g), contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva pela técnica direta; pesquisa de *Salmonella* spp. e isolamento de bolores e leveduras de acordo com a metodologia recomendada por Silva et al<sup>12</sup>.

### Análise sensorial

Para a avaliação sensorial do macarrão elaborado com defumado de pacu, foram convidadas aleatoriamente 30 pessoas não treinadas para a avaliação da aceitação e perfil de característica. As amostras foram apresentadas em duas formas, sendo a primeira cozida em água e sal por 30 minutos, e a segunda após o cozimento foram adicionadas ao molho de tomate. Ambas as formas foram apresentadas em pratos codificados utilizando números aleatórios e oferecidas aos provadores para avaliação dos testes abaixo citados.

### Teste de aceitação

Para a avaliação da aceitação pelo consumidor, foi utilizada uma ficha com escala hedônica estruturada de 9 pontos, ancorada entre os pontos de mínimo e máximo: desgostei extremamente (1) até gostei extremamente (9)<sup>13</sup>.

### Teste de perfil de característica

Para o teste de avaliação do perfil de característica foram avaliados os atributos cor, sabor, odor, textura, e aparência de acordo seguinte critério de máximo e mínimo, péssimo (1) à excelente (5).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

## Composição físico-química

Os resultados da composição físico-química da matéria prima, da massa de macarrão fresca enriquecida com pacu defumado e da legislação vigente para massa de macarrão encontram-se na Tabela 1.

**Tabela 1.** Composição físico-química da matéria prima, da massa de macarrão fresca enriquecida com pacu defumado e da legislação vigente para massa de macarrão

Parâmetros (%)	Filé de Pacu Defumado	Macarrão	Massa Fresca (%) Legislação
Umidade	62,93	32,27	35 (Máx.)
Proteína Bruta	17,56	15,21	8 (Mín.)
Lipídios	16,59	9,73	-
Cinzas	2,92	2,18	-
Carboidratos*	-	40,61	-
Kcal (Kcal/100g)**	-	310,85	-

\*cálculo realizado por diferença dos outros componentes

\*\*cálculo realizado por multiplicação da proteína e carboidratos por 4 e gordura por 9

Os resultados físico-químicos obtidos para umidade do filé de pacu defumado apresentaram teores de umidade bem próximos (62,93%) ao recomendado por Moraes et al<sup>14</sup>, que é de 65%.

A água é um constituinte que está em maior proporção na carne de pescado, podendo chegar entre 75-80% da carne, que proporciona um produto com alto teor de umidade<sup>15</sup>. A massa de macarrão fresca foi submetida a um processo de secagem parcial, de forma que o produto final apresentou umidade máxima de 32,27 (g/100g) e, portanto, encontra-se dentro dos parâmetros pré-determinados pela ANVISA na RDC nº 93, de 31 de outubro de 2000, que rege os padrões de identidade e qualidade da massa alimentícia<sup>16</sup>, e estipula máximo de 35,0 (g/100g). Este elevado teor de água pode determinar menor vida de prateleira para as massas alimentícias, pois a maior umidade faz com que os mesmos estejam sujeitos ao desenvolvimento de microrganismos.

Aquino et al<sup>17</sup>, avaliando a composição centesimal de três formulações de macarrão fresco, elaborado com ovo de avestruz desidratado, encontrou valores para umidade em todas as amostras dentro dos parâmetros máximos de

(35%) permitido pela legislação em massa fresca. Esses valores estão próximos aos observados neste trabalho (32,37%), como podemos verificar na Tabela 1.

O teor de lipídeos observado no filé de pacu foi de 16,59%, que é considerado normal para esta espécie. O pescado que possui teor de gordura acima de 8% é considerado pescado gordo<sup>18</sup>. De acordo com Geromel & Forster<sup>15</sup>, a defumação a quente é um processo mais indicado para pescados gordurosos, porque as gotículas de gordura auxiliam a retenção dos compostos da fumaça, não só os aromáticos, como também os que contribuem para a conservação do produto. Do ponto de vista nutricional, os altos teores de ácidos graxos poli-insaturados presentes na carne dos pescados assegura a melhor digestão e pronta assimilação pelos tecidos dos organismos<sup>19</sup>. Por outro lado, a presença de gordura é um dos fatores influentes na vida útil dos produtos e na sua aceitação pelos consumidores, devido às reações lipolíticas e autoxidação, sofridas pelos lipídios<sup>20</sup>. Na massa de macarrão foi observado um teor de 9,73% de lipídios, este teor diminuiu em relação a matéria-prima devido a inclusão dos ingredientes na formulação do produto. No entanto, considerando que esta gordura é rica em ácidos graxos poli-insaturados, poderá contribuir para uma alimentação mais saudável.

O teor de proteínas observada na massa de macarrão (15,21%) foi considerado satisfatório e superior ao índice mínimo de proteínas exigido pela legislação para massas que é de (8%)<sup>16</sup>. Neste trabalho encontraram-se valores superiores de proteínas quando comparados com resultados de massa de macarrão utilizando somente farinha de trigo (12,7%) e semolina (14,03%), encontrados por Chang e Flores<sup>21</sup>. O valor encontrado para proteína no pescado defumado foi de 17,78%, comparando este resultado com o relatado por Pereira<sup>22</sup>, podemos observar que os valores apresentaram dentro da margem citada pelo autor que é de 15 a 22%. Esses dados reforçam a importância da inclusão de pescado em massas, proporcionando um produto com maior valor proteico, rico em aminoácidos que, por sua vez, têm a função de sintetizar proteínas e participar da produção de energia através da gliconeogênese, desempenhando funções específicas intransferíveis e essenciais ao organismo em nível de composição e organização bioquímica<sup>23</sup>.

Com relação ao teor de minerais totais, foram observados valores de 2,92% para filé de pacu defumado e 2,18% para o macarrão, valor acima da legislação de massas de macarrão para cinzas, pois estabelece máximo de 0,65%<sup>16</sup>. Isto pode ser explicado devido à inclusão do pescado moído na massa.

## Qualidade Microbiológica

A presença de bactérias nos alimentos, além de favorecer a deterioração e/ou redução da vida útil desses produtos, possibilita a veiculação de patógenos, acarretando potenciais riscos à saúde do consumidor. Assim, a higiene correta dos alimentos é necessária para garantir a segurança e a sua salubridade em todos os estágios de sua elaboração até o produto final, minimizando a preocupação em saúde pública<sup>24</sup>.

Na necessidade do constante aperfeiçoamento das ações de controle sanitário, com vistas à proteção da saúde da população, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), através da Resolução RDC nº 12 de 2 de janeiro de 2001<sup>25</sup>, estabelece limites para pescado, apresentando padrões para coliformes a 45°C de no máximo 10<sup>2</sup> NMP/g, *Staphylococcus* coagulase positivo no máximo, 10<sup>3</sup> UFC/g e para *Salmonella* spp. ausência em 25g, para o pescado “*in Natura*”. A Resolução RDC nº93 de outubro de 2000: Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Massa Alimentícia Fresca estipula os valores para Coliformes termotolerantes, 10/g (Máx); *Salmonella* ausência em 25g; bolores e leveduras 10<sup>3</sup> (Máx).

Os resultados das análises microbiológicas, apresentados na Tabela 2, evidenciou que a pesquisa de *Staphylococcus* e *Salmonella* spp. no pescado *in natura* e produto final, está dentro dos limites padrões exigidos pela legislação vigente, indicando que a matéria prima e o macarrão foram processados em condições adequadas. O *Staphylococcus* tem seu principal habitat na pele, mucosas nasais e trato respiratório humano. Assim, sua presença em alimentos indica manuseio inadequado do alimento, equipamentos com higienização inadequados, contaminação após o processamento de fontes humanas ou animais<sup>26</sup>.

Com relação aos microrganismos aeróbios mesófilos, não há valor padrão na legislação Federal. O resultado encontrado para mesófilos na matéria prima e produto final 4,2x10<sup>2</sup> UFC/g; 1,2x10<sup>2</sup> UFC/g), respectivamente, valores considerados baixos. Sua contagem tem sido bastante utilizada como indicador de qualidade higiênica em plantas de processamento de alimentos e, quando presente em grande número, indica falha durante a produção<sup>27</sup>. Os microrganismos psicrótróficos são os principais deterioradores do pescado refrigerado<sup>26</sup>, essa microbiota não será inibida pelo efeito da refrigeração. Consequentemente, diminuem a vida de prateleira do produto. Não há limites para esses microrganismos na legislação, uma vez que não acarretam problemas de saúde pública. Os resultados obtidos para psicrótrófilos, tanto para matéria prima, quanto para massa de macarrão, se mostraram inferiores a 10UFC/g, como pode ser observado na Tabela 2, indicando adequadas condições, e propiciando maior vida de prateleira do produto. Segundo Cruz & Soares<sup>28</sup>, as massas frescas comercializadas apresentam uma vida de prateleira de 30 dias.

Na Tabela 2 verifica-se que o número de coliformes a 45°C da matéria prima e do produto final é inferior aos estabelecidos pelos padrões de referência do Ministério da Saúde. A presença de bactéria do grupo dos coliformes, cujo habitat da maioria é o trato intestinal do ser humano e de outros animais homeotermos, indicam contaminação de origem ambiental e fecal do produto<sup>29</sup>. Assim, a pesquisa dos microrganismos indicadores é utilizada para avaliar a qualidade microbiológica dos alimentos e apontar riscos de contaminação de origem fecal com a provável presença de patógenos ou deterioração do alimento, além das indicações relevantes

**Tabela 2.** Caracterização microbiológica do peccado *in natura* e do macarrão enriquecido com pescado

Parâmetros	Filé <i>in natura</i>	Macarrão	Legislação	
			Pescado	Massa Fresca <sup>16</sup>
<i>Staphylococcus</i> coagulase positivo (UFC/g)	ausente	ausente	10 <sup>3</sup> Máx.	-
Mesófilos (UFC/g)	4,2x10 <sup>2</sup>	1,2x10 <sup>2</sup>	-	-
Coliformes a 45°C (NMP/g)	9,3x10 <sup>1</sup>	<3,0	10 <sup>2</sup> Máx.	10 Máx
Bolores (UFC/g)	4,0x10 <sup>1</sup>	2,0x10 <sup>1</sup>	-	10 <sup>3</sup> Máx.
Psicrótrófilos	<10	<10	-	-
Leveduras (UFC/g)	2,0x10 <sup>1</sup>	310,85	-	10 <sup>3</sup> Máx.
<i>Salmonella</i> spp. (UFC/g)	ausente	ausente	ausência em 25g.	ausência em 25g.

UFC/g - Unidades formadoras de Colônias/grama

NMP/g - Número Mais Provável/grama

sobre as condições higiênico-sanitárias durante o processamento, a produção e o armazenamento<sup>26</sup>.

Os resultados encontrados para bolores na matéria-prima e produto final foram de  $4,0 \times 10^1$  e  $2,0 \times 10^1$  UFC/g e leveduras  $2,0 \times 10^1$  e  $1,0 \times 10^1$  NMP/g, respectivamente. Esses microrganismos estão relacionados com a deterioração de massa, podem ser encontrados em todas as fases da produção, podendo citar como fontes o pessoal e o ambiente de processamento<sup>30</sup>.

## Análise Sensorial

### ■ Teste de Perfil de Características

Foram aplicados os testes de perfil de características para julgar os atributos: aparência, cor, odor, sabor e textura, com cinco categorias: Excelente, Muito Bom, Bom, Regular e Péssimo para a massa de macarrão enriquecido com pescado defumado apresentado na Tabela 03.

**Tabela 3.** Porcentagem dos atributos de aceitação do macarrão defumado com relação às categorias analisadas

Atributos	Categorias				
	Excelente	Muito bom	Bom	Regular	Péssimo
Aparência (%)	7	27	46	20	-
Cor (%)	13	47	40	-	-
Odor (%)	23	31	20	13	13
Sabor (%)	20	37	23	20	-
Textura (%)	17	57	23	3	-

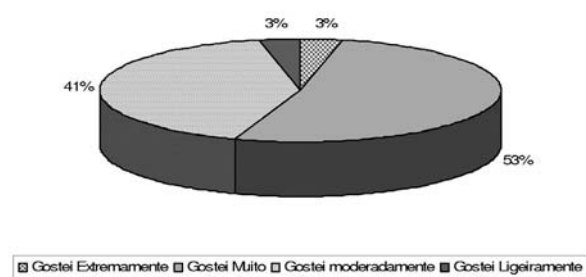
Com relação ao teste de perfil de característica, 80% dos provadores avaliaram a aparência do macarrão como excelente, bom e muito bom. Quanto ao teste do perfil de característica da cor, observamos percentual de 87% para bom e muito bom, e 13% para excelente.

Com base nos dados referentes à característica de odor, avaliado pelos provadores, podemos observar que este atributo não apresentou grande variação, apresentando uma uniformidade entre os provadores, e a soma dos atributos excelente, muito bom e bom obteve 74% de indicação.

Com relação ao sabor, os dados apresentados na Tabela 03 demonstram que 60% dos provadores avaliaram o perfil muito bom e bom, e a característica excelente apresentou uma indicação de 20%. Por final, os dados apresentados para o perfil de característica da textura tiveram 80% dos provadores avaliando este perfil como muito bom e bom, e 17% como excelente, demonstrando que o produto neste ponto também obteve uma boa aceitação.

### ■ Teste Sensorial de Aceitabilidade

Como pode ser observada na Figura 1, a porcentagem da característica de aceitabilidade do macarrão, gostei extremamente, gostei muito e gostei moderadamente, foi de 97% de aprovação do produto pelos provadores, indicando com isso, que o macarrão obteve uma excelente aceitabilidade pelos provadores. Os resultados encontrados nesse estudo foram superiores quando comparados com valores de Pereira<sup>22</sup>, que obteve uma aceitabilidade de 94,4% na elaboração de “fishburger” e 72,3% para “nuggets” de polpa de carne de carpa prateada (*Hypophthal militrix*).



**Figura 1.** Teste de aceitabilidade do macarrão

## CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se verificar que o macarrão preparado com a carne de pescado, apresentou valor proteico (15,21%) superior ao limite da legislação (mínimo de 8%), contendo elevado valor proteico. As análises microbiológicas encontram-se dentro dos padrões microbiológicos, tornando o produto satisfatório para o consumo humano. Na avaliação sensorial, o produto apresentou ótima aceitabilidade com 97% de aprovação. Portanto, considerando que o pescado possui nutrientes importantes à saúde, é viável sua inclusão em alimentos processados, podendo ser uma alternativa para aumentar o consumo de pescado.



## REFERÊNCIAS

- Oetterer M. Tecnologia do pescado: da adoção de técnicas de beneficiamento e conservação do pescado de água doce. [Acessado em 16 de fev. de 2009]. Disponível em [www.esalq.usp.br/departamentos/lan/pdf/beneficiamento.pdf](http://www.esalq.usp.br/departamentos/lan/pdf/beneficiamento.pdf).
- Trondsen T, Scholderer J, Lund E, Eggen AE. Perceived barriers to consumption of fish among Norwegian women. *Research Report*. 2003; 41:301-14.
- Hall GM. *Fish Processing Technology*. New York: VCH Publishers; 1992.
- Ranken MD. *Manual de Industrias de los Alimentos*. 2º ed. Espanã: Editorial Acribia; 1993.
- Kristinsson HG, Rasco BA. Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical and Functional Properties. *Critical Rev Food Sci Nutr*. 2000; 40(1): 43-81.
- Almeida, GSC. Suplementação dietética de vitamina C, desenvolvimento e sanidade do Pacu (*Piaractus mesopotamicus* [dissertação de mestrado]. Piracicaba, São Paulo: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo; 2003, p.47.
- Evangelista J. *Tecnologia de Alimentos*: São Paulo; 2000.
- Associação Brasileira das Indústrias de Massas Alimentícias – ABIMA, 2007 [acessado em 10/12/2008] Disponível em :[http://www.abima.com.br/est\\_mnacional.html](http://www.abima.com.br/est_mnacional.html).
- Dutcosky SD. Desenvolvimento de tecnologia de biscoitos e massas alimentícias isentas de glúten, a partir de farinha de arroz [dissertação de mestrado]. Curitiba, Paraná. Tecnologia Química-UFPR; 1995.
- Ogawa M, Maia EL. *Manual de Pesca- Ciência e Tecnologia do Pescado*. São Paulo. Varela; 1999, v.1, p.429.
- AOAC – Association of Official Analytical Chemists. Horwitz W. (Ed), *Official Methods of Analysis of Official Analytical Chemists*. 17 ed. Arlington: Inc., 1 e 2.; 2000.
- Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. São Paulo: Livraria Varela; 1997.
- Dutcaskey SD. *Análise Sensorial em Alimentos*. Curitiba: Champagnat; 1996.
- Morais C, Machado TM, Tavares M, Takemoto E, Yabiku HY, Martins MS. Defumação líquida da truta arco-íris (*Onchorhynchus mykiss*): Efeitos do processamento e da estocagem nas propriedades físicas, químicas e sensoriais. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 1996, 56(2): 43-8.
- Geromel EJ, Forster RJ. *Princípios Fundamentais em Tecnologia de Pescado*. São Paulo, Secretaria da Indústria e Comércio, Ciência e Tecnologia. Coordenadoria e Comércio. 1982; p.127.
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC n. 93, de 31 de Outubro de 2000. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de massa alimentícia. Diário oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília-DF, 01 novembro 2000. Seção I.
- Aquino JS, Silva JA, Caldas MCS, Mascarenhas RJ. Avaliação centesimal e sensorial do macarrão massa fresca tipo espaguete elaborado com ovo desidratado de avestruz. *Ceres*. 2008; 55(3):173-8.
- Bressan MC. Processamento de pescado de águas doce. In: *Anais da II feira da Pequena Agroindústria*. Serra Negra, 2002: 59-85.
- Marchi JF. Desenvolvimento e avaliação de produtos à base de polpa e surimi produzidos a partir de tilápia nilótica, *Oreochromis niloticus* [dissertação de mestrado]. Viçosa, Minas Gerais: Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa. 1997; p.87.
- Pereira KC, Campos AF. Estado do índice de frescor e das alterações na qualidade dos filés de tilápias (*Oreochromis niloticus*), mantidos a -18°C por 90 dias. In: *International Symposium on Tilapia Aquaculture Proceedings*; 2000; Rio de Janeiro. American Tilapia Association.p.415 -25.
- Chang KY, Flores MEH. Qualidade tecnológico de massas alimentícias frescas elaborados de semolina de trigo durum (T. durum L.) e farinha de trigo (T. aestivum L.) *Ciênc Tecnol Aliment*. 2004; 24(4): 487-93.
- Pereira AJ. Desenvolvimento de Tecnologia para Produção e Utilização da Polpa de Carne de Carpa Prateada (*Hypophthalmichthys molitrix*) na elaboração de Produtos Reestruturados: “Fishburger” e “Nuggets” [dissertação de mestrado]. Curitiba, Paraná: Tecnologia de Alimentos- Setor de Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná; 2003.
- Linder MC. *Nutritional Biochemistry and Metabolism With Clinical Applications*. Department of chemistry and biochemistry, California State University, Fullerton, Califórnia. 1991; p.603.
- Cortez AII. Indicadores de qualidade higiênico sanitária em linguiça frescal comercializada no Município de Jaboticabal, SP. [dissertação de mestrado]. Jaboticabal, São Paulo:Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária Jaboticabal, 2003.p.43.
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – Resolução RDC nº 12 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico para Padrão Microbiológico de Alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília-DF, p.45-53, 10 de jan. 2001. Seção I, nº 7-E. p. 45-53.
- Franco BDGM, Landgraf M. Microrganismos patógenos de importância alimentar. In: Franco BDGM, Landgraf M, editores. *Microbiologia dos alimentos*. 2nd ed. São Paulo: Atheneu; 1996. p.33-8.
- Cardoso ALS, Castro AGM, Tessari ENC, Baldassi L, Pinheiro ES. Pesquisa de *Salmonella* spp., coliformes totais, coliformes fecais, mesófilos, em carcaças e cortes de frango. *Higiene Alimentar*. 2005; 19(128): 144-50.
- Cruz RS, Soares NFF. Efeito da adição de CO2 sobre o crescimento microbiano em macarrão tipo massa fresca. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2002; 22(2):147-50.
- Motta MRA, Belmont MA. Avaliação Microbiológica de carne moída comercializada em supermercados da região Oeste de São Paulo. *Higiene Alimentar*. 2000; 11(78/79): 59-62.
- Schintu M, Meloni P, Sal M, Contu A. Esperienze sul controllo microbiologico di paste fresche di produzione artigianale. *L'Igiene Moderna*. 1996; 105: 55-62.

# Avaliação da qualidade de óleos e gorduras de fritura em bares, restaurantes e lanchonetes

## Assessment of used frying oils and fats in bars, restaurants and snack bars

RIALA6/1261

Valéria Macedo Almeida CAMILO<sup>1</sup>, Deusdélia Teixeira de ALMEIDA<sup>2\*</sup>, Maria da Purificação Nazaré ARAÚJO<sup>2</sup>, Lafaiete Almeida CARDOSO<sup>3</sup>, Júlia Carvalho ANDRADE<sup>2</sup>, Marina BONELLI<sup>2</sup>

\*Endereço para correspondência: Departamento de Ciências dos Alimentos, Escola de Nutrição, Universidade Federal da Bahia. Rua Araújo Pinho, 32 Canela. CEP: 40110150. Salvador, BA, Brasil. Fone: 3283-7700. e-mail: delia@ufba.br

<sup>1</sup>Centro de Ciência da Saúde, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Campus Universitário de Santo Antônio de Jesus, Santo Antônio de Jesus, BA, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Ciências dos Alimentos, Escola de Nutrição, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil

<sup>3</sup>Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil

Recebido: 05.05.2009 – Aceito para publicação: 04.02.2010

### RESUMO

Com o objetivo de avaliar a qualidade de óleos e/ou gorduras utilizados para fritura por imersão em bares, restaurantes e lanchonetes, foram coletadas 180 amostras de óleo e/ou gordura, sendo 90 antes e 90 após fritura. Aplicou-se um questionário para avaliar as técnicas de fritura e a infraestrutura dos estabelecimentos. Foram realizados os métodos analíticos para avaliar a alteração dos óleos e gorduras a saber, compostos polares totais (%), acidez (mg KOH/g) e índice de peróxido (mEq/kg). Das 90 amostras coletadas antes da fritura, 18,18% demonstraram valores de compostos polares superiores ao limite estabelecido (5%), predominantemente nas amostras coletadas em lanchonetes. Quanto aos compostos polares totais, acidez e índice de peróxidos para óleos e gordura de fritura, 7,78%, 12,22% e 2,22% das amostras, respectivamente, apresentaram valores acima dos limites estabelecidos para efetuar o descarte. A avaliação das técnicas de fritura demonstrou dados insatisfatórios, tais como falta de controle da temperatura, tipo de óleo e equipamentos empregados. Os resultados obtidos indicam a necessidade de ações educativas no setor, assim como efetiva fiscalização por parte dos órgãos competentes.

**Palavras-chave.** óleos e gorduras, fritura por imersão, compostos polares, acidez, índice de peróxido e controle de qualidade.

### ABSTRACT

Aiming at assessing the quality of oils and fats employed for frying food in bars, restaurants and snack bars, 180 samples were analyzed, from which 90 were collected before use and 90 after the frying process. A questionnaire was used in order to collect information on food frying procedures and on the respective food-serving places infrastructure. The analysis on alterations in oil and fat samples was performed by using the following analytical methods: total polar compounds (%), free fatty acid (mg KOH/g) and peroxide index (meq/kg). Among the 90 samples collected before the frying procedure, 18.18% showed higher values of polar compounds over the established limit (5%), predominantly in samples collected from snack bars. In 7.78%, 12.22% and 2.22% of the analyzed frying oil and fat samples, the total polar compounds, free fatty acids and peroxide indices, respectively, were in a higher rate than those limit values established for discarding them. The inadequacy on the employed frying procedure was observed as this process was performed without control over the frying temperature, type of oil, and employed equipment. These findings indicate that the food-service locations require close surveillance supervisions.

**Key words.** oils and fats, deep-frying, polar compounds, free fatty acid, peroxide index, quality control.

## INTRODUÇÃO

A fritura de alimentos é uma operação importante por ser um processo econômico, rápido e prático de preparação, por conferir aos alimentos características únicas de odor e sabor e apresentar grande popularidade em diferentes grupos populacionais<sup>1-7</sup>. Contudo, é um método complexo, já que envolve uma série de fatores a serem controlados, tais como o tempo, temperatura, tipo de equipamento, tipo de óleo e alimento, presença de antioxidantes, ar e água<sup>8</sup>.

Distinguem-se dois tipos de fritura de imersão: contínua e descontínua. A fritura contínua, é normalmente utilizada pelo mercado industrial de *snacks* extrusados, massas fritas, pré-fritura e fritura de batatas e a fritura descontínua é empregada, principalmente, pelo mercado institucional que compreende as redes de *fast food*, restaurantes, lanchonetes, cantinas escolares e pastelarias<sup>9</sup>.

No processo de fritura, os óleos são parcialmente hidrolisados para formar ácidos graxos livres, glicerol, mono e diglicerídios e estes compostos vão se acumulando no óleo depois de repetidas frituras. Por outra parte, os óleos também sofrem oxidações com degradação dos triglicerídios formando peróxidos, compostos polares (polímeros, dímeros, ácidos graxos livres, diglicerídios e ácidos graxos livres oxidados)<sup>10</sup>. A má condução do processo de fritura resulta em acúmulo de produtos tóxicos, que afetam tanto a qualidade do produto como a saúde do consumidor<sup>10,11</sup>. Dobagarnes e Márquez-Ruiz<sup>12</sup>, Andrikopoulus et al<sup>13</sup> Soriano, et al<sup>14</sup> e Tavares et al<sup>15</sup> avaliaram óleos de fritura em restaurantes e/ou *fast food* e verificaram que 35%, 17%, 57,8 e 20% das amostras, respectivamente, continham compostos polares acima do limite estabelecido pela legislação (25%).

O Brasil não dispõe de legislação específica que regulamente a fritura por imersão, existindo o Informe Técnico nº 11 de 05 outubro de 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA<sup>16</sup>, o qual recomenda práticas de fritura adequadas visando garantir a qualidade do óleo e do produto e a RDC 216<sup>17</sup>, que estabelece apenas a temperatura máxima de 180°C.

Vários países já fixaram limites para compostos polares entre 24 e 27%. A Austrália, Bélgica, Japão e Finlândia adotam o valor máximo para ácidos graxos livres de 2,5%, na Holanda este valor é de 4,5% e nos Estados Unidos é de 1%. Na França e Bélgica não se permite a utilização de óleos com mais de 2% de ácido linolênico para frituras<sup>18-20</sup>. Outros métodos isolados, como o índice

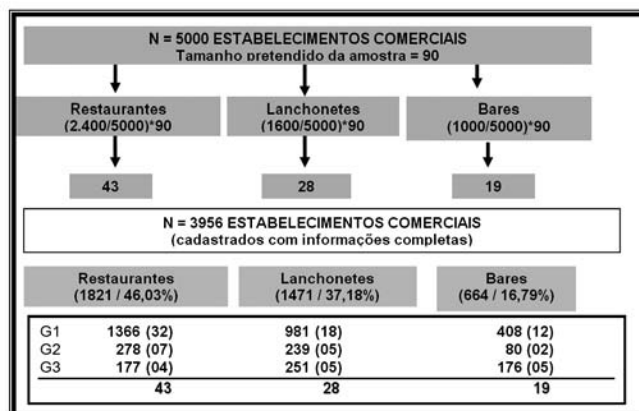
de peróxido (mEq/kg) e a determinação do índice de refração (40°C), são utilizados para controlar a qualidade inicial do óleos e/ou gorduras empregados.

Este estudo objetivou avaliar a qualidade do óleo e/ou gordura de fritura em estabelecimentos comerciais da cidade de Salvador/BA, com o intuito de subsidiar os órgãos legislativos, por meio de dados que retratem a realidade que permeia as práticas populares relacionadas ao processo de fritura dos alimentos, contribuindo, assim, para o desenvolvimento de conhecimentos que possam repercutir para o bem-estar da sociedade.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Seleção dos estabelecimentos

Foi disponibilizado pelo Serviço de Vigilância do Município de Salvador-Bahia, o cadastro de 5000 estabelecimentos comerciais (bares, lanchonetes e restaurantes), a partir do qual se estabeleceu uma proporcionalidade entre os três segmentos, dividindo-se o quantitativo de cada um pela população total (5000) e multiplicando-se pelo tamanho pretendido da amostra (90), obtendo-se os seguintes valores: 19 bares, 28 lanchonetes e 43 restaurantes (**Figura 1**). A seguir, foram excluídos todos os estabelecimentos com informações deficientes, resultando em 3956 locais. Com base na amostra por segmento (19 bares, 28 lanchonetes e 43 restaurantes), foi definido por agrupamento o quantitativo de cada um deles. Assim, para cada agrupamento realizou-se uma proporcionalidade do número total de representantes por segmento. Dessa forma, totalizaram-se 62 estabelecimentos no Agrupamento I, 14 estabelecimentos no Agrupamento II, e 14 estabelecimentos no Agrupamento III (**Figura 1**).



G1= agrupamento 1; G2= agrupamento 2; G3= agrupamento 3

**Figura 1.** Distribuição das amostras por agrupamento e tipo de estabelecimento

### Critérios de substituição

Em caso de recusa ou inexistência do estabelecimento no endereço registrado, o mesmo foi substituído pelo seu antecessor ou sucessor imediato, conforme ordem no banco de dados utilizado para obter a amostragem. Nos casos onde foram verificadas mudança de razão social, mas mantendo-se o endereço previamente sorteado, este estabelecimento foi incluído no estudo.

### Obtenção das amostras

Foram coletadas 180 amostras em triplicata, sendo 90 amostras antes da fritura (óleo e/ou GVH inicial) e 90 após fritura (óleo e/ou GVH de fritura) em 19 bares, 28 lanchonetes e 43 restaurantes. As amostras foram identificadas, ao tempo em que foi preenchido um termo contendo informações sobre a data da coleta, o nome do estabelecimento, tipo do produto, quantidade coletada, assim como assinaturas do responsável pelo estabelecimento e do pesquisador.

Após as coletas, as amostras foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar, com tampa, transportadas em gelo e armazenadas à temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ . No momento das análises, as amostras foram descongeladas, filtradas com papel de filtro, protegidas da luz.

As análises físico-químicas de óleo e/ou GVH iniciais e de fritura foram realizadas em triplicata, sendo: os índices de acidez (mg KOH/g) e peróxido (mEq/Kg) analisados de acordo com o Instituto Adolfo Lutz<sup>21</sup>. Os compostos polares totais (%) foram analisados com o *Fri-Check*<sup>®</sup>, e multiplicados por um fator de 1,25 conforme Osawa et al<sup>22</sup>. Neste estudo, foram estabelecidos os seguintes parâmetros de qualidade para óleos e/ou gorduras inicial:  $\geq 0,6$  mg de KOH/g de acidez;  $\geq 10$  mEq/kg de peróxido<sup>23</sup>,  $\geq 5\%$  de Compostos Polares Totais (CPT)<sup>19</sup>. Como limites de alteração, fixaram-se: acidez  $\geq 1\%$  expressa em ácido oleico, CPT  $\geq 25\%$  e peróxidos  $\geq 15$  mEq/kg<sup>19,20,24-26</sup>.

As informações referentes às variáveis que interferem no processo de fritura por imersão (ex: tempo de utilização do óleo e/ou gordura, temperatura empregada, tipo de óleo, tipo de equipamento) foram coletadas através de questionário semi-estruturado e observação direta no momento da visita.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Escola de Nutrição da UFBA.

### Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado o programa estatístico SPSS (*Statistical Product and Service Solutions*) versão 13.0, variáveis foram cruzadas e analisadas através

de análises descritivas para estimativa pontual (média e desvio padrão).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 pode-se verificar que os valores médios para ácidos graxos livres (mg KOH/g), e peróxidos (mEq/kg) nos óleos e/ou gordura inicial, encontram-se dentro dos limites estabelecidos para este estudo, ainda que existam elevada disparidade entre os valores máximos e mínimos. Neste sentido, o índice de acidez para bares, lanchonetes e restaurantes variou entre 0,1-2,97%, 0,16-0,82% e 0,14-1,33%, respectivamente. Resultados encontrados na literatura para óleos refinados e/ou iniciais expressos em ácido oleico foram da ordem de: 0,13-0,20<sup>15</sup>, 0,05%<sup>27</sup>, 0,07<sup>28</sup>, 0,13<sup>29</sup>. Os valores máximos de acidez no óleo e/ou gordura inicial sugerem a ocorrência de reações hidrolíticas<sup>10</sup>. Neste caso, os estabelecimentos informaram que o óleo era novo, quando, em verdade, estes já tinham sido aquecidos. Já em relação ao índice de peróxido, observaram-se valores máximos muito elevados nos óleos iniciais (Tabela 1), quando comparados aos resultados encontrados por estes mesmos autores.

Evidencia-se que os valores de peróxido para os óleos de fritura, encontram-se dentro dos padrões recomendados pela literatura, excetuando-se 4,65% dos restaurantes (Tabela 2) que atingiram valores superiores a 15 mEq/kg<sup>18</sup>. De acordo com Lima<sup>30</sup>, o índice de peróxido não é um bom indicador para avaliar o grau de oxidação dos óleos e gordura, pois não distingue entre os vários ácidos insaturados, os que sofreram oxidação, nem fornece informações sobre os produtos secundários do processo oxidativo. Além disso, o índice de peróxido apresenta evolução bastante irregular, apresentando períodos de alta e baixa concentração com o decorrer do tempo de fritura<sup>19,31-34</sup>.

Verificou-se que 16 amostras (18,18%) (Tabela 2) apresentaram teores de compostos polares totais (%) no óleo e/ou gordura inicial acima de recomendado pelo estudo (5%). Em geral, óleos refinados tendem a apresentar compostos polares em torno de 3,5%<sup>8,29,35</sup>. De acordo com Masson et al<sup>19</sup>, óleos que apresentam CPT  $\leq 5\%$  são mais recomendados para fritura, dado que estão menos alterados.

As lanchonetes apresentaram níveis de compostos polares totais do óleo e/ou gordura de fritura e acidez nos óleos de fritura acima do recomendado (10,71% e 25,00%, respectivamente), com predomínio em relação aos demais estabelecimentos (Tabela 2). Isso pode ser explicado por uma possível associação de fatores, entre estes, a alta rotatividade das preparações e o atendimento intermitente

que é muito mais intenso nestes locais do que nos bares e restaurantes, características de um sistema descontínuo de fritura. Segundo Keijbets et al<sup>36</sup>, este sistema é mais destrutivo que o sistema contínuo, devido à formação de peróxidos e sua decomposição durante ciclos de resfriamento e reaquecimento, respectivamente, em consequência da maior absorção de oxigênio durante o resfriamento do óleo, favorecendo as reações oxidativas.

**Tabela 1.** Estatística descritiva para os valores de compostos polares totais (%), ácidos graxos livres (mg KOH/g), peróxidos (mEq/kg), dos óleos e/ou gordura inicial e de fritura coletados nos estabelecimentos comerciais de Salvador, no ano de 2007

Bares					
Indicadores físico-químicos	n	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
CPR	18,0	0,00	16,75	4,41	4,44
CPF	19,0	2,88	39,13	6,04	8,68
IAR	18,0	0,14	2,97	0,48	0,63
IAF	19,0	0,16	7,32	0,80	1,60
IPR	18,0	0,07	7,39	1,37	1,92
IPF	19,0	1,10	13,44	5,76	3,46
Lanchonete					
CPR	27,0	0,00	11,60	4,79	2,91
CPF	28,0	1,44	33,04	11,08	8,94
IAR	27,0	0,16	0,82	0,34	0,18
IAF	28,0	0,14	8,27	1,09	1,76
IPR	27,0	0,13	9,06	1,29	1,76
IPF	28,0	0,70	14,65	4,52	3,69
Restaurantes					
CPR	43,0	0,00	19,29	3,40	2,66
CPF	43,0	2,88	57,29	8,13	10,31
IAR	43,0	0,14	1,33	0,35	0,19
IAF	43,0	0,11	1,55	0,41	0,29
IPR	43,0	0,17	6,00	0,86	0,92
IPF	43,0	0,63	16,6	5,08	4,11

n = número total de amostras; CPR = compostos polares do óleo e/ou gordura inicial; CPF = compostos polares do óleo e/ou gordura de fritura; IAR = índice de acidez do óleo e/ou gordura inicial; IAF = índice de acidez do óleo e/ou gordura final; IPR = índice de peróxido do óleo e/ou gordura inicial; IPF = índice de peróxido do óleo e/ou gordura de fritura

**Tabela 2.** Distribuição das amostras em relação aos indicadores químicos e limites estabelecidos para descarte de óleos refinados e de fritura

Estabelecimentos	CPT		Acidez		Peróxidos		
	(%)	(%)	mg KOH/g	(%)	(meq/kg)	(meq/kg)	
Análises	≥ 5%	≥ 25%	≥ 0,6	≥ 1	≥ 10	≥ 15	
	CPR	CPF	IAR	IAF	IPR	IPF	
Bares	n	03	01	02	02	00	00
	%	16,66	5,26	11,11	10,52	0,00	0,00
Lanchonetes	n	10	03	04	07	00	00
	%	37,03	10,71	14,80	25,00	0,00	0,00
Restaurantes	n	03	03	02	02	00	02
	%	6,98	6,98	4,70	4,65	0,00	4,65
% médio		18,18	7,78	9,10	12,22	0,0	2,22

n = número total de amostras; CPT = Compostos polares totais; CPR = compostos polares do óleo e/ou gordura inicial; CPF = compostos polares do óleo e/ou gordura de fritura; IAR = índice de acidez do óleo e/ou gordura inicial; IAF = índice de acidez do óleo e/ou gordura final; IPR = índice de peróxido do óleo e/ou gordura inicial; IPF = índice de peróxido do óleo e/ou gordura de fritura. Para óleo de fritura: Bares n = 19; lanchonetes n = 28; restaurantes n = 43 (n = 90). Para óleo novo: bares = 18 e lanchonete = 27 e restaurantes = 43 (n = 88)

Sabe-se que nas lanchonetes da cidade estudada, predominam as frituras de massas e salgados, quando comparados com os restaurantes e bares, mais facilmente sujeitas à carbonização, com desprendimento de partículas responsáveis pela maior termo-oxidação do óleo<sup>37</sup>. Resultados similares foram encontrados por Dobarganes e Márquez-Ruiz<sup>12</sup> e Ans et al<sup>31</sup>, que detectaram o maior número de amostras para descarte em estabelecimentos que preparam massa frita. Segundo Peréz-Camino et al<sup>38</sup>, a presença de óleos e gorduras com essas características na dieta tem uma considerável influência sob seu valor nutricional, apresentando dificuldades para ser hidrolisada pela lipase pancreática e consequentemente diminuindo sua digestibilidade.

Conforme os resultados da Tabela 3, 74 estabelecimentos empregaram o óleo de soja refinado como meio de fritura, 15 locais usaram a GVH e apenas 1 lanchonete empregou a mistura Soja + GVH. Estes resultados coadunam com os encontrados por outros autores que demonstraram a predominância do uso de óleo de soja em frituras<sup>15,31</sup>. Segundo a literatura<sup>12,18,39</sup>, não é recomendado o emprego do óleo de soja em frituras, devido ao predomínio do ácido

linolênico, insaturado, que acelera as reações termooxidativas, com maior tendência a formação de polímeros<sup>40</sup>, compostos polares e monômeros oxidados<sup>18,41</sup>.

Destacar que os CPT não se viram alterados com o emprego da GVH, o que não descarta sua elevada estabilidade, dado que a acidez é proveniente do processo inicial de hidrólise do óleo, enquanto os CPT apresentam-se mais alterados com o decorrer do tempo de fritura<sup>32,42,43</sup>. Em estudos conduzidos por Tavares<sup>15</sup> não se observaram diferenças de acidez entre amostras fritas com óleo de soja e gordura hidrogenada e das 40% de amostras a serem descartadas com CPT  $\geq 25\%$ , 70% foram fritas com óleo de soja e 30% com GVH. Ressaltar que apesar de serem economicamente viáveis e mais estáveis, as GVH apresenta ácidos graxos *trans*, conhecidos como fatores de risco para o surgimento de doenças cardiovasculares<sup>44,45</sup>.

Em relação à acidez, os maiores percentuais de amostras em desacordo com os limites estabelecidos foram provenientes do uso de gordura vegetal hidrogenada (Tabela 3). Alguns autores<sup>8,15</sup> ressaltam que a GVH é mais utilizada em frituras devido a sua maior estabilidade oxidativa, atribuída a sua elevada composição em ácidos graxos saturados. Isso possivelmente se deveu a uma associação de fatores acima mencionados, ou seja, a fritura descontinua, o tipo de alimento frito e a má operacionalização do processo de fritura.

**Tabela 3.** Distribuição das amostras de acordo com o tipo de óleo e/ou gordura e os indicadores de descarte

Estabelecimento	Tipo de óleo	n	CPT $\geq 25\%$	Acidez $\geq 1\%$	Peróxidos $\geq 15$ meq/kg
Bares	Soja	19	01 (5,5)	02 (10,5)	00
	Uso variado	01	00	01 (100)	00
Lanchonetes	Soja	16	03 (18,8)	01 (6,3)	00
	Gordura	11	00	05 (45,4)	00
Restaurantes	Soja	39	03 (7,7)	01 (2,6)	02 (5,1)
	Gordura	04	00	01 (25,0)	00

CPT = compostos polares totais do óleo e/ou gordura de fritura. N = número total de amostras. Os números absolutos indicam o número de amostras que deveriam ser descartadas e os valores entre parênteses o percentual das mesmas. Os termos Soja e Gordura significam óleo de soja refinado e gordura vegetal hidrogenada, respectivamente. O termo "Uso variado" diz respeito à mistura de soja e gordura no processamento de fritura. n = número total de amostras

Por outro lado, a maioria das amostras de óleos e/ou gordura de frituras com resultados condenatórios para CPT (%) e acidez (mg KOH/g) foram provenientes de fritadeiras (Tabela 4), o que não era de se esperar, uma vez que tais utensílios são produzidos em aço inox. que não reagem com o óleo apresentam termostato para o adequado controle da temperatura, relação superfície/volume, que permite menor contato do óleo com o oxigênio atmosférico<sup>4</sup>. No entanto, observou-se que 89,5% dos bares, 60,7% das lanchonetes e 69,8% dos restaurantes não sabiam e/ou não verificavam a temperatura do óleo e/ou da gordura do banho de fritura (Tabela 5), o que pode gerar alterações no óleo, no alimento ou em ambos<sup>4,26,30</sup>.

**Tabela 4.** Distribuição das amostras de óleo e/ou gordura de fritura para descarte em função do tipo de equipamento utilizado

Tipos de equipamentos	n	CPT $\geq 25\%$	Acidez $\geq 1\%$	Peróxidos $\geq 15$ mEq/kg
Fritadeira doméstica	2	0	0	0
Fritadeira industrial	17	1 (5,8)	6 (35,29)	0
Fritadeira com sistema de água e sal	12	3 (25,0)	4 (33,3)	0
Frigideira doméstica	36	0	0	1 (2,8)
Outros	4	1 (25,0)	0	0
Tacho	19	2 (11,1)	1 (5,3)	1 (5,3)

CPT = compostos polares totais do óleo e/ou gordura de fritura; N = número total de amostras; os números absolutos indicam o número de amostras que deveriam ser descartadas e os valores entre parênteses o percentual das mesmas. n = número total de amostras

**Tabela 5.** Temperaturas (°C) empregadas no processo de fritura, segundo informações obtidas junto aos estabelecimentos

	Bares		Lanchonetes		Restaurantes	
	n	%	n	%	n	%
100°C	-	-	-	-	5,0	11,6
150°C	-	-	2,0	7,1	3,0	7,0
180°C	2,0	10,5	7,0	25,0	3,0	7,0
200°C	-	-	2,0	7,1	2,0	4,7
Não sabe	9,0	47,4	10,0	35,7	19,0	44,2
Não verifica	8,0	42,1	7,0	25,0	11,0	25,6

- Não se aplica; n = número total de amostras

Além disso, observou-se que estas amostras apresentaram maior percentual para descarte quando não houve reposição do óleo (Tabela 6). Sabe-se que quanto mais rápida a renovação do óleo, mais lenta é a formação de ácidos graxos livres, além disso, a alta rotatividade do óleo fresco dilui os índices analíticos e evita que o teor de 25% de compostos polares seja alcançado<sup>19</sup>, recomendando-se um nível de reposição diária entre 15 a 25% em relação à capacidade da fritadeira<sup>37</sup>.

**Tabela 6.** Reposição do óleo e/ou gordura de fritura em função das amostras para descarte

Existência de reposição do óleo	n	CPT ≥ 25 %	Acidez ≥ 1%	Peróxidos ≥ 15 mEq/kg
Sim	62	2 (3,2)	4 (6,4)	2 (3,2)
Não	28	5 (17,9)	7 (25,0)	0 (0,0)

CPT = compostos polares totais do óleo e/ou gordura de fritura. N = número total de amostras. Os números absolutos indicam o número de amostras que deveriam ser descartadas, e os valores entre parênteses, o percentual das mesmas. n = número total de amostras

**Tabela 7.** Distribuição das amostras em função do tempo de utilização do óleo e/ou gordura utilizados

Estabelecimento	Tempo de uso do óleo	n	CPT ≥ 25 %	Acidez ≥ 1%	Peróxidos ≥ 15 meq/kg
Bares	x ≤ 4	14	01 (7,1)	01 (7,14)	00
	4 ≥ x ≤ 8	02	00	01 (50,0)	00
	Não se aplica	03	00	00	00
<b>Total</b>		19	(7,1)	(5,2)	(00)
Lanchonetes	x ≤ 4	22	02 (9,1)	04 (18,1)	00
	4 ≥ x ≤ 8	05	01 (20,0)	03 (60,0)	00
	Não se aplica	01	00	00	00
<b>Total</b>		28	(10,71)	(25,0)	(00)
Restaurantes	x ≤ 4	27	00	00	02 (8,6)
	4 ≥ x ≤ 8	05	02 (40,0)	02 (40,0)	00
	8 ≥ x ≤ 15	03	01 (33,3)	00	00
	Não se aplica	07	00	00	00
	Sem informação	01	00	00	00
<b>Total</b>		43	(6,9)	(4,6)	(4,6)

CPT = compostos polares totais do óleo e/ou gordura de fritura; n = número total de amostras; os números absolutos indicam o número de amostras que deveriam ser descartadas, e os valores entre parênteses, o percentual das mesmas. x = número de dias de utilização do óleo

O tempo de fritura está na dependência, não somente da temperatura do óleo e do alimento, mas da quantidade de alimento, seu tamanho, forma e conteúdo inicial. Os dados da Tabela 7 demonstram que a maior porcentagem de estabelecimentos utiliza o óleo por um período de até quatro dias. Salienta-se que 7 (16,2%) restaurantes e 3 (15,8%) dos bares não observam o tempo de uso do óleo como um parâmetro para avaliar sua qualidade. Também se verificou um maior percentual de amostras com compostos polares e a acidez acima do recomendado, quanto maior o tempo de utilização do óleo (Tabela 7), a exemplo de outros estudos<sup>32,46</sup>.

## CONCLUSÕES

Baseados nos parâmetros de acidez, peróxido e compostos polares totais 7,78%, 12,22% e 2,22%, respectivamente, das amostras analisadas de óleo e/ou gordura de fritura deveriam ser descartadas. É notório que a falta de controle das variáveis envolvidas no processo, tais como temperatura, tempo, tipo de alimento e óleo contribuíram marcadamente para estes resultados.

Ressaltar que a quantidade de amostras alteradas poderia ter sido maior, caso as mesmas fossem coletadas no momento do descarte, quando o estabelecimento decide trocar o óleo. Finalmente, é recomendável investimento por parte das empresas, em capacitação de pessoal, e em infraestrutura, além de uma efetiva fiscalização dos órgãos competentes com vistas à melhoria da alimentação ofertada à população.

## AGRADECIMENTOS

Aos técnicos da Vigilância Sanitária de Salvador, proprietários, responsáveis e funcionários dos estabelecimentos visitados, por acreditarem na importância do estudo.

À FAPESB (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia) pelo financiamento do estudo (Termo de outorga APR0437/2005).

## REFERÊNCIAS

1. Dobarganes MC, Márquez-Ruiz G, Velasco J. Interactions between fat and food deep-frying. *Eur J Lipid Sci Tec*. 2000; 102 (8-9): 521-8.

2. Varela G, Ruiz-Roso B. Some effects of deep frying on dietary fat intake. *Nutr Rev*. 1992; 50 (9): 256-62.
3. Paul S, Mittal GS. Regulating the use of degraded oil/fat in deep-fat/oil food frying. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 1997; 37 (7): 635-62.
4. Metha U, Swinburn B. A review of factors affecting fat absorption in hot chips. *Crit Rev. Food Science. Nutr*. 2001; 41 (2): 133-54.
5. Rywotycki R. Food frying process control system. *J Food Eng*. 2003; 59 (4): 339-42.
6. Mellema M. Mechanism and reduction of fat uptake in deep-fat fried foods. *Trends Food Sci*. 2003; 14 (9): 364-73.
7. Juarez MD, Alfaro ME. Nutrient retention factors of deep-fried milanesas. *J Food Comp Anal*. 2004; 17(1): 119-24.
8. Cuesta C, Sánchez-Muniz FJ. Quality control during repeated frying. *Grasas y Aceites*. 1998; 49 (3-4): 310-8.
9. Sanibal E, Mancini-Filho J. Alterações físicas, químicas e nutricionais de óleos submetidos ao processo de fritura. *Ciênc. Tecnol. Aliment*. 2002; 18 (18): 48-54.
10. Fritsch CW. Measurements of frying fat deterioration: A Brief Review. *JAOCs*. 1981; March: 272-4.
11. Billek G. Health aspects of thermoxidized oils and fats. *Eur J Lipid Sci Technol*. 1985; 102 (8-9): 587-93.
12. Dobarganes MC, Márquez-Ruiz G. Calidad de las grasas de fritura en el sector de restauración de Andalucía. *Grasas y Aceites* 1995; 46 (2): 115-20.
13. Andrikopoulos NK, Boskou G, Dedoussis GVZ, Chiou A, Tzamtzis VA, e Papanthanasios A. Quality assessment of frying oils and fats from 63 restaurants in Athens, Greece. *Food Service Technol*. 2003; 3: 49-59.
14. Soriano JM, Moltó JC e Mañes J. Hazard analysis and critical control points in deep-fat frying. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*. 2002; 104: 174-7
15. Tavares M, Gonzalez E, Silva MLP, Bartosi RCF. Avaliação da qualidade de óleos e gorduras utilizados para fritura no comércio da região metropolitana da Baixada Santista, estado de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*. 2007; 66 (1): 40-4.
16. Brasil Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Informe Técnico nº. 11 de 05/10/2004. Dispõe sobre Boas Práticas de Fabricação para utilização e descarte de óleos utilizados em frituras. Disponível em: [www.anvisa.gov.br/alimento/informes](http://www.anvisa.gov.br/alimento/informes). Acesso em 20 de março de 2009.
17. Brasil Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 216, de 15 de set. 2004. Dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. Disponível em <[http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?mode=PRINT\\_VERSION&id=12546](http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?mode=PRINT_VERSION&id=12546)>. Acesso em: 16 abril 2009.
18. Firestone D, Stier RF, Blumenthal MM. Regulation of frying fats and oils. *Food Technol*. 1991; 2: 90-4.
19. Masson L, Robert P, Izaurieta M, Romero N, Ortiz J. Fat deterioration in deep fat frying of french fries potatoes at restaurant and food shop sector. *Grasas y Aceites*. 1999; 5 (6): 460-8.
20. Gertz C. Chemical and physical parameters as quality indicators of used frying fats. *Eur. J. Lipid Sci. and Technol*. 2000; 102: 566-72.
21. 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. 1018pp.
22. Osawa CC, Gonçalves GAL, Grimaldi R. Emprego do *fri-check* na avaliação da qualidade de óleos e gorduras de fritura. *Hig Aliment*. 2006; 20 (145): 73-9.
23. Brasil Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada nº. 270 de 22/09/2005. Aprova o regulamento técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em 22 de abril de 2009.
24. Machado ER. Processo de fritura descontinua: alterações nos óleos e gorduras e contribuição às ações de vigilância sanitária. [tese de Doutorado]. Rio de Janeiro: RJ, FIOCRUZ. 2006.
25. Velasco J, Marmesat S, Bordeaux O, Márquez-Ruiz G, Dobarganes MC. Formation and evolution of monoepoxy fatty acids in thermoxidized olive and sunflower oils and quantitation in used frying oils from restaurants and fried food outlets. *J. Agric. Food Chem*. 2004; 52: 4438-43.
26. Monferrer A, Villalta J. La fritura desde un punto de vista práctico (I). *Alimentación, Equipos y Tecnología*. 1993; 21 (4): 85-90.
27. Dobarganes, MC, Pérez-Camino MC. e Gutiérrez González-Quijano R. Métodos analíticos de aplicación en grasas calentadas. I. Determinación de ésteres metílicos no alterados. *Grasas y Aceites*. 1984; 35: 172-7.
28. Machado ER, Dobarganes MC, Abrantes SMP. Alterações dos óleos de palma e de soja em fritura descontinua de batatas. *Ciênc. Tecnol. Aliment*. 2008; 28 (4): 786-92.
29. Jorge N, e Soares BBP. Comportamento do óleo de milho em frituras. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*. 2004; 63 (1): 63-9.
30. Lima JR, Gonçalves LAG. Parâmetros de avaliação da qualidade de óleo de soja utilizado para fritura. *Química Nova*. 1994; 17 (5): 392-6.
31. Ans VG, Mattos ES, Jorge N. Avaliação da qualidade dos óleos de fritura usados em restaurantes, lanchonetes e similares. *Ciênc. Tecnol Aliment* 1999; 19 (3): 1-15.
32. Cella RCF, Regitano-D'Arce MAB, Spoto MHE. Comportamento do óleo de soja refinado utilizado em fritura por imersão com alimentos de origem vegetal. *Ciênc. Tecnol. Aliment*. 2002; 22 (2): 111-6.
33. Pérez-Camino MC, Guinda A, Márquez-Ruiz G, Dobarganes MC. Alteración de las grasas usadas en fritura. Correlación entre índices analíticos y métodos de evaluación directa de compuestos de degradación. *Grasas y Aceites* 1988; 39 (2): 72-6.
34. Croon LB, Rogstad A, Leth, T, Kiutamo, TA. Comparative study of analytical methods for quality evaluation of frying fat. *Fette Seifen Anstrichm*. 1986; 88, (3): 87-91.
35. Jorge N, Gonçalves LAG. Comportamento do óleo de girassol com alto teor de ácido oléico em termoxidação e fritura. *Ciênc. Tecnol. Aliment*. 1998; 18 (3): 335-42.
36. Keijbets MJH, Ebbenhorst-Seller G, Ruisch JB. Deep-fat finish-frying of french fries in unhydrogenated refined soybean oil. *Fette Seifen Anstrichmittel*. 1986; 88 (2): 48-52.
37. Stevenson SG, Vaisey-Genser M, Eskin NAM. Quality control in the use of deep frying oils. *J Am Oil Chem Soc*. 1984; 61 (6): 1102 - 8.



38. Pérez-Camino MC, Márquez-Ruiz G, Dobarganes MC. Alteración de grasas en fritura: comportamiento de aceites de oliva y girasol en freidoras domesticas. *Grasas y Aceites*. 1987; 38 (5): 307-12.
39. Angelo AJST. Lipid Oxidation in Foods. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 1996; 36 (3): 175-224.
40. Machado ER, Marmesat S, Dobarganes MC, Abrantes SMP. Avaliação quantitativa de monoepoxiácidos, monocetoácidos e monohidroxiácidos em óleos e gorduras provenientes de fritura descontínua de batatas. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2008; 28 (3): 75-82.
41. Machado ER, Marmesat S, Abrantes S, Dobarganes MC. Uncontrolled variables in frying studies: differences in repeatability between thermoxidation and frying experiments. *Grasas y Aceites*. 2007; 58 (3): 283-8.
42. Saguy IS, Dana D. Integrated approach to deep fat frying: engineering, nutrition, health and consumer aspects. *J Food Eng*. 2003; (56): 143-52.
43. Mcsavage J, Trevisan S. The use and abuse of frying oil. *Food Ser Technol*. 2001; 1 (2): 85-92.
44. Dutra AR, Oliveira VR. Os ácidos graxos trans e seus riscos para a saúde. *Hig Aliment*. 2006; 20 (141): 61-5.
45. Costa AGV, Bressan J, Sabarense CM. Ácidos Graxos Trans: Alimentos e Efeitos na Saúde. *ALAN*. 2006; 56 (1):12-21.
46. Jorge N, Damy PC, Corsini MS, Del Ré PV. Medidas da estabilidade oxidativa e compostos polares totais do óleo de soja refinado e da gordura vegetal hidrogenada em frituras. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2005; 64 (2): 162-6.

# Melhoria das condições de higiene em pontos de venda de cachorro-quente

## Improvement of the hygiene conditions in hot dog points of sale

RIALA6/1262

Fernanda BERBICZ<sup>1</sup>, Tânia Maria de Souza GENTA<sup>2</sup>, Camila Sampaio MANGOLIN<sup>3</sup>, Juliana Catti Flores FIDELIS<sup>3</sup>, Lívia Rosas FERREIRA<sup>3</sup>, Julia Regina Tedesco RODELLA<sup>3</sup>, Márcia PORTILHO<sup>4</sup>, Graciette MATIOLI<sup>4\*</sup>

\*Endereço para correspondência: Departamento de Farmácia e Farmacologia, Universidade Estadual de Maringá. Avenida Colombo 5790, Bloco P02, CEP 87020-900, Maringá-PR, Brasil. Fone: (44) 3261-4301 Fax: +55 (44) 3261-4119. e-mail: gmatioli@uem.br

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Maringá

<sup>2</sup>Serviço Nacional do Comércio, SENAC

<sup>3</sup>Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá

<sup>4</sup>Departamento de Farmácia e Farmacologia Universidade Estadual de Maringá

Recebido: 23.03.2009 – Aceito para publicação: 30.03.2010

### RESUMO

O alimento comercializado por ambulantes pode oferecer riscos à saúde da população, embora satisfaça as necessidades de obtenção de alimentos rápidos, de baixo custo e em local próximo ao trabalho, funcionando como alternativa para o sustento de milhões de pessoas. O presente trabalho teve por objetivo analisar microbiologicamente alimentos produzidos e comercializados por ambulantes da cidade de Maringá (PR), bem como treiná-los em Boas Práticas na Manipulação de Alimentos, considerando a necessidade de adequação à Resolução 216/2004 do Ministério da Saúde. Foram realizadas análises microbiológicas de 42 amostras de alimentos coletados nos pontos de comercialização e foi aplicado *check list* para avaliar a existência de Boas Práticas. As análises microbiológicas mostraram contaminação em 14,3% amostras para Coliformes a 45°C, e 2,4% para Estafilococos Coagulase Positiva e nenhuma para *Salmonella* spp., *B. cereus* e Clostrídio Sulfito Redutor a 46°C (RDC n. 12/2001). A partir do primeiro *check list*, foi detectada uma não conformidade de 33,4%. O programa de treinamento das Boas Práticas de Manipulação teve carga horária de 12 horas. Após o segundo *check list*, realizado em uma amostra de 10 ambulantes, pôde-se perceber que alguns aspectos, principalmente de higienização foram melhorados. Houve um avanço na divulgação do conhecimento básico e aplicado sobre cuidados na manipulação de alimentos, prevenindo surtos de doenças transmitidas por alimentos.

**Palavras-chave.** cachorro-quente, alimento seguro, higiene dos alimentos, alimentos de rua, *check list*.

### ABSTRACT

The street food commerce might cause health risks to the population, although it satisfies the needs of obtaining fast low-cost foods, near the work and can be an alternative for the people sustenance. The present work aims at performing microbiology analyzes of foods produced and marketed in the streets of Maringá (PR) city, as well as to train them on Good Practices, considering the adaptation required by the Resolution 216/2004 (Govt. edict). Microbiology analyzes of 42 food samples were collected in the marketing points. In order to evaluate the application of Good Practices, a checklist was used. The microbiological analyses found contamination by Coliforms at 45°C in 14.3% of the samples and by *Staphylococcus* positive coagulase in 2.4% of the samples (RDC 12/2001). No contamination by *Salmonella* spp. and *B. cereus* was found in any of the samples. In the first checklist, a 33.4% non-conformity was detected. The Good Practices training program was enforced in 12 hours. After the second checklist accomplished in a sample of 10 street food points of sale, and there could be observed that some aspects such as hygiene have improved. There was a progress in the spread of the basic and applied knowledge for handling food, avoiding disease outbreaks spread by food.

**Key words.** hot dog, food safety, food hygiene, street food, checklist.

## INTRODUÇÃO

A situação econômica do país, dificuldades sociais e de urbanização, em conjunto com outros fatores, tem acarretado o crescimento do setor econômico informal, incluindo o comércio de alimentos nas ruas<sup>1</sup>. Nos países em desenvolvimento este tipo de comércio tem especial importância, pois constitui uma atividade econômica alternativa para muitos desempregados. Geralmente estes alimentos são produtos prontos para o consumo, preparados no próprio local de comercialização, em vias de intenso movimento e grande afluxo de pessoas, como: pontos de ônibus, escolas, praças, entradas de hospitais, feiras e mercados<sup>2</sup>.

Grande parte dos consumidores desconhece os requisitos necessários para uma correta manipulação de alimentos, incluindo o armazenamento (locais, temperatura, tempo de armazenamento) e, principalmente, os perigos que podem estar associados a alimentos contaminados. Outro perigo importante, também ignorado pela população, é o manipulador como veículo de contaminação de alimentos, à medida que, pela falta de conhecimento sobre técnicas de manipulação higiênica, coloca em risco a saúde das pessoas que consomem os alimentos por ele servidos<sup>2,3,4</sup>.

Diferentes alimentos comercializados em vias públicas são referenciados como prováveis riscos de saúde para a população em função da presença de microrganismos patogênicos. Tais microrganismos se desenvolvem nos alimentos devido às condições de higiene inadequadas e ao armazenamento em temperaturas ambientais elevadas<sup>2,5,6</sup>. Diante desta constatação, a segurança alimentar tornou-se um tema de discussão entre organizações governamentais, instituições de ensino e indústrias alimentícias, uma vez que se fazem necessários programas que assegurem à população produtos que não sejam prejudiciais à saúde, programas que difundam a legislação e sensibilizem o profissional para adoção de boas práticas operacionais na manipulação, preparo e comércio de alimentos mais seguros. Faustino et al<sup>7</sup> enfatizam a importância dos laboratórios de saúde pública atuar em conjunto com a vigilância sanitária dos municípios para ajudar na investigação e na elucidação dos possíveis agentes causadores de toxinfecção alimentar.

Uma iniciativa de parceria entre as vigilâncias sanitárias estaduais, municipais e representantes locais do Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial (Senai) e do Serviço de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (Sebrae) tem mostrado resultados positivos. Trata-se do Programa Alimento Seguro (PAS), cujo objetivo é

capacitar profissionais através de cursos e treinamentos voltados ao controle sanitário<sup>8</sup>. Segundo Ricardo Oliva, diretor da ANVISA, trata-se de um “grande projeto de desenvolvimento social agregado à qualidade do alimento”<sup>8</sup>. Diferentes projetos têm sido realizados: a produção de sorvete no Rio Grande do Sul, de acarajé na Bahia e de farinha de mandioca no Acre. Em Porto Alegre, o PAS implantou o programa Lanche Legal. A partir de ações estabelecidas por este programa, ambulantes cadastrados que receberam cursos de Boas Práticas de Fabricação são orientados durante inspeções da vigilância Sanitária<sup>8</sup>.

Tendo em vista que em Maringá (PR) já se encontram cerca de 300 pontos de venda de alimentos por ambulantes, como estabelece o levantamento feito junto à Secretaria da Vigilância Municipal de Maringá (PR), foi de extrema importância desenvolver, junto aos membros da Associação de Ambulantes dos Municípios, sensibilização para a necessidade de implantação de boas práticas de manipulação, bem como proporcionar condições para produção e comercialização de alimentos seguros servidos à população. Desta forma, há uma prevenção de surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) e a promoção da satisfação do público consumidor deste segmento quanto à segurança dos alimentos que consome.

Portanto, diante da necessidade de adequação à Resolução 216/2004 do Ministério da Saúde<sup>9</sup>, em vigor desde setembro de 2004, essa pesquisa teve por objetivo realizar um *check list* para avaliar o índice de conformidade existentes nos pontos de comercialização de cachorro-quente do município de Maringá e analisar microbiologicamente amostras de alimentos coletados nesses pontos de comercialização, visando garantir um alimento seguro.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostragem

A amostragem partiu de 300 pontos de vendas ambulantes localizados em várias regiões do município de Maringá, Paraná, cadastrados no ano de 2006 pela Secretaria Municipal de Saúde, através da Coordenação da Vigilância Sanitária. Desta amostragem, fizeram parte da pesquisa 42 ambulantes que comercializam cachorro-quente.

### Coleta das amostras de alimentos

Em cada ponto de venda de cachorro-quente foi coletada uma amostra de lanche comercializado. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos esterilizados, etiquetados, transportadas em recipiente

isotérmico, acompanhados de relatório preenchido com nome do estabelecimento, data, hora e método da colheita. As amostras foram mantidas sob refrigeração entre 0 e 4°C até a realização das análises microbiológicas.

### **Determinação dos agentes microbiológicos envolvidos**

Os microrganismos contaminantes pesquisados foram os preconizados pela Resolução-RDC nº 12/2001 do Ministério da Saúde<sup>10</sup>, que regulamenta os padrões microbiológicos dos alimentos (item 18, inciso a). As análises de alimentos foram realizadas segundo o *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Food*<sup>11</sup>.

### **Métodos estatísticos**

Para determinação estatística foi realizado o desenho de estudo quantitativo longitudinal considerando o nível de significância de 5% e nível de confiança de 95%. Para análise dos resultados foram utilizados métodos estatísticos para análise de medidas repetidas.

### **Check list**

Para avaliar as condições higiênico-sanitárias dos pontos de vendas de cachorro-quente pesquisados, foi elaborado um *check list* a partir de modelo utilizado pelo Programa Alimento Seguro (PAS), entre os anos de 2001 e 2004, para implantação das Boas Práticas de Manipulação<sup>12</sup>. O *check list* foi simplificado de forma a agrupar as questões semelhantes, eliminar itens não exigidos pela legislação para o segmento mesa, bem como itens que não se aplicavam aos estabelecimentos pesquisados, chegando a um total de 52 questões. Segundo Tomich et al<sup>13</sup>, os itens imprescindíveis são aqueles considerados críticos para a proteção contra surtos de doenças alimentares e que necessitam de correção imediata quando não atendidos. Quando um estabelecimento apresenta não conformidades para os itens críticos é considerado crítico na produção de alimentos<sup>12</sup>.

Todos os 42 estabelecimentos passaram pelo treinamento em Boas Práticas de Manipulação e receberam uma visita, na qual foi realizado um primeiro *check list* e foi coletada uma amostra de cachorro-quente. Após as análises microbiológicas das amostras foi realizado um segundo *check list* em uma amostra aleatória de 10 do total de ambulantes que participaram da pesquisa.

Através do *check list* foram avaliados os seguintes aspectos: aspectos gerais de recursos humanos, condições ambientais externas, aspectos gerais de instalação e saneamento, aspectos gerais de equipamentos e utensílios, aspectos gerais de higienização e aspectos gerais de produção.

As respostas apresentadas no *check list* foram: “Conforme” (C) quando o ambulante cumpriu o critério observado, “Não Conforme” (NC) quando não atendeu ao critério observado e “Não Aplicável” (NA) quando o item foi considerado não pertinente ao local ou setor avaliado<sup>12</sup>. Os pontos de vendas receberam a classificação de críticos quando apresentaram não conformidades para os itens considerados imprescindíveis para a produção de alimento seguro.

### **Treinamento em Boas Práticas de Manipulação**

A Resolução RDC nº 216/2004<sup>9</sup> estabelece procedimentos de Boas Práticas de Manipulação para serviços de alimentação a fim de garantir as condições higiênico-sanitárias do alimento preparado. Com base nesta resolução, foi realizado treinamento em Boas Práticas de Manipulação para os ambulantes, constando do seguinte programa: Perigos em Alimentos – biológicos, químico e físicos; Doenças transmitidas por alimentos; Higiene pessoal, do ambiente e dos alimentos; Manipulação de alimentos – critérios de segurança na produção de alimentos.

## **RESULTADOS**

### **Seleção dos ambulantes, treinamento, *check list* e coleta das amostras**

A pesquisa teve seu início com a sensibilização junto aos membros da Associação de Ambulantes do Município de Maringá para a necessidade de implantação de Boas Práticas no âmbito dos ambulantes. Passaram pelo treinamento em Boas Práticas de Manipulação 42 estabelecimentos, que receberam uma visita, na qual foi realizado um primeiro *check list* e foi coletada uma amostra de cachorro-quente.

Durante o treinamento, os ambulantes receberam uma Cartilha do Manipulador de Alimentos. Também receberam termômetros para o controle de temperatura no processamento dos alimentos por eles elaborados. Ao final do treinamento todos os ambulantes receberam certificado de participação fornecido pelo SENAC.

Para o preenchimento dos *check list*, observaram-se as condições higiênico-sanitárias dos instrumentos utilizados para o preparo dos lanches, das instalações do carrinho de cachorro-quente, do ambiente no qual ele se situa e também dos manipuladores que trabalham no local. A partir do primeiro *check list* foi detectada uma não conformidade de 33,4% ( $\pm 11,3$ ), o que corresponde a 1/3 dos 52 itens analisados. De cada aspecto avaliado no *check list* foi possível chegar aos resultados apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Resultados do primeiro *check list* aplicado nos estabelecimentos de vendas de cachorros-quentes na cidade de Maringá, Paraná, em 2008

Itens avaliados	Aspectos gerais de recursos humanos	Condições ambientais externas	Aspectos gerais de instalação e saneamento	Aspectos gerais de equipamentos e utensílios	Aspectos gerais de higienização	Aspectos gerais de produção
<b>Ambulantes não-conformes</b>	35,7%	35,7%	23,8%	6,0%	17,9%	36,3%

Os itens gerais, dispostos na Tabela 1, são compostos por diversos subitens, sendo alguns considerados mais críticos que os outros. No grupo dos aspectos gerais de recursos humanos, os itens que consideramos os maiores responsáveis pelo elevado número de não-conformidades incluíram a não utilização de equipamentos de proteção individual (EPI), como luvas, toucas e jalecos, a manipulação do dinheiro e também as atitudes do manipulador durante o preparo dos lanches (conversar, tossir, mascar chicletes).

A respeito das condições ambientais, a localização dos carrinhos de cachorro-quente em avenidas com fluxo intenso de veículos, inclusive caminhões, foi o fator responsável pela elevada taxa de não conformidades.

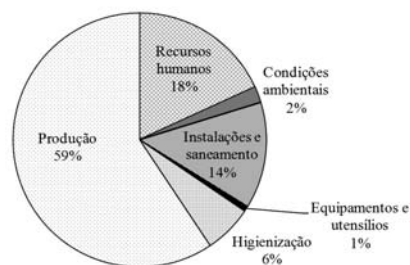
As instalações e saneamento do carrinho apresentaram um nível menor de irregularidades, porém com um item muito preocupante: 38% dos carrinhos não tinham condições para que o manipulador pudesse lavar as mãos quando necessário, o que é considerado inaceitável quando se diz respeito à manipulação de um alimento.

Com relação aos utensílios e das condições de higienização, a maioria dos estabelecimentos visitados apresentava produtos corretos para limpeza em geral e os utensílios utilizados eram de material apropriado.

Quanto aos aspectos gerais de produção, estes foram os mais preocupantes de todos os verificados. Como pode ser observado na Figura 1, este item foi o que apresentou maior porcentagem de não conformidades. Ainda dentro dos aspectos gerais de produção, os subitens que mais chamaram a atenção durante as visitas foram: em 60% dos locais os lanches corriam riscos de contaminação (química, física e/ou biológica) na montagem dos lanches, em 52% havia o reaproveitamento de sobras frias de forma inadequada e em 88% dos locais não houve obediência da legislação que proíbe a utilização de dispensadores de uso repetido (bismagas) para molhos, devendo os mesmos serem oferecidos em sache individual.

Os resultados dos dois *check list* aplicados em 10 dos pontos de vendas pesquisados foram submetidos à

análise de variância (ANOVA), considerando os subitens como causa de variação. O resultado obtido pelo teste F-Snedecor foi estatisticamente significativo ( $p < 0,0001$ ), confirmando uma melhora significativa entre a aplicação do primeiro e segundo *check list* (Tabela 2).



**Figura 1.** Porcentagem de subitens não conformes em cada aspecto avaliado no *check list* realizado nos pontos de venda de cachorros-quentes na cidade de Maringá, Paraná, em 2008

**Tabela 2.** Resultados das não conformidades (NC) obtidas através dos *check list* aplicados em uma amostra de 10 ambulantes antes (Primeiro *check list*) e após o treinamento em Boas Práticas de Manipulação (Segundo *check list*)

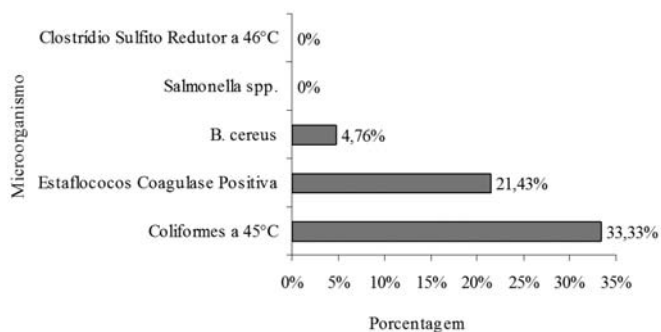
Ambulantes	Primeiro <i>Check list</i> <sup>a</sup>		Segundo <i>Check list</i> <sup>b</sup>	
	Itens NC	Itens críticos NC	Itens NC	Itens críticos NC
1	11 (21,2%)	7 (19,4%)	9 (17,3%)	5 (13,9%)
2	15 (28,8%)	10 (27,8%)	8 (15,4%)	4 (11,1%)
3	9 (17,3%)	5 (13,9%)	7 (13,5%)	4 (11,1%)
4	15 (28,8%)	8 (22,2%)	10 (19,2%)	6 (16,7%)
5	21 (40,4%)	13 (36,1%)	5 (9,6%)	3 (8,3%)
6	7 (13,5%)	4 (11,1%)	2 (3,8%)	1 (2,8%)
7	19 (36,5%)	12 (33,3%)	4 (7,7%)	2 (5,6%)
8	24 (46,2%)	19 (52,8%)	7 (13,5%)	5 (13,9%)
9	9 (17,3%)	7 (19,4%)	4 (7,7%)	2 (5,6%)
10	19 (36,5%)	13 (36,1%)	8 (15,4%)	6 (16,7%)

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significativas entre os *check list* ( $p \leq 0,05$ ). <sup>a</sup>Total de subitens NC pesquisados: 52; <sup>b</sup>Total de subitens críticos NC: 36

## Análises microbiológicas

Após a realização do primeiro *check list*, as amostras de lanche coletadas foram encaminhadas para o laboratório. Foram realizadas análises microbiológicas a fim de detectar se nas mesmas havia a presença dos seguintes microorganismos: *Bacillus cereus*, *Salmonella* spp., Clostrídio Sulfito Redutor (CSR) a 46°C, Coliformes a 45°C e Estafilococos Coagulase Positiva. A Tabela 3 apresenta os resultados referentes as análises microbiológicas.

A partir dos dados da Tabela 3 foram obtidos os resultados apresentados na Figura 2. Seguindo os padrões estabelecidos pela resolução RDC nº12 de 02 de janeiro de 2001<sup>10</sup> da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, foi possível observar que somente CSR a 46°C e *Salmonella* spp. não foram detectados nas amostras analisadas. Apesar de 4,8% dos lanches terem apresentado *Bacillus cereus*, nenhum deles ultrapassou o limite permitido. Quanto aos Coliformes a 45°C foi observado valor superior ao permitido pela RDC em 6 amostras analisadas (14,3%) e para Estafilococos Coagulase Positiva em uma amostra analisada (2,4%).



**Figura 2.** Porcentagem de microorganismos presentes nas amostras analisadas de cachorros-quentes coletados em 42 ambulantes na cidade de Maringá, Paraná, em 2008

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Para prevenir as doenças transmitidas por alimentos, uma higiene rígida deve ser obedecida. Entre as etapas de preparo e distribuição, o controle da temperatura e do tempo de espera é necessário para impedir o crescimento de microorganismos patogênicos<sup>14</sup>.

Dentre os resultados das análises microbiológicas realizadas nos cachorros-quentes, foi alarmante o obtido para Coliformes a 45°C, mostrando que em cada sete lanches vendidos, um é impróprio para consumo. Os coliformes constituem um grupo de enterobactérias presentes nas fezes e no ambiente, como o solo e as

**Tabela 3.** Resultados das análises microbiológicas de amostras de cachorros-quentes coletados em 42 ambulantes na cidade de Maringá, Paraná, em 2008

Ambulante	<i>Salmonella</i> sp	<i>Bacillus cereus</i> (UFC/g)	Coliformes a 45°C (NMP/g)	Clostrídio Sulfito Redutor (UFC/g)	Estafilococos Coagulase Positiva (UFC/g)
1	ausência	<10	<3	<10	<10
2	ausência	<10	<3	<10	<10
3	ausência	<10	20	<10	<10
4	ausência	<10	<3	<10	<10
5	ausência	<10	<3	<10	<10
6	ausência	<10	<3	<10	<10
7	ausência	<10	<3	<10	<10
8	ausência	<10	20	<10	2,5x10 <sup>2</sup>
9	ausência	<10	93	<10	3,8x10 <sup>3</sup>
10	ausência	<10	<3	<10	2,0x10 <sup>2</sup>
11	ausência	<10	93	<10	<10
12	ausência	<10	43	<10	<10
13	ausência	<10	<3	<10	<10
14	ausência	<10	3	<10	5,5x10 <sup>2</sup>
15	ausência	<10	<3	<10	<10
16	ausência	<10	210	<10	<10
17	ausência	<10	3	<10	<10
18	ausência	<10	3	<10	<10
19	ausência	<10	<3	<10	<10
20	ausência	<10	<3	<10	<10
21	ausência	<10	210	<10	<10
22	ausência	10	28	<10	<10
23	ausência	<10	150	<10	1,0x10 <sup>2</sup>
24	ausência	<10	<3	<10	<10
25	ausência	<10	<3	<10	<10
26	ausência	<10	28	<10	3,5x10 <sup>2</sup>
27	ausência	<10	7	<10	50
28	ausência	<10	<3	<10	<10
29	ausência	<10	<3	<10	<10
30	ausência	<10	<3	<10	<10
31	ausência	<10	4	<10	<10
32	ausência	1,0x10 <sup>2</sup>	<3	<10	<10
33	ausência	<10	<3	<10	<10
34	ausência	<10	<3	<10	<10
35	ausência	<10	210	<10	9,0x10 <sup>2</sup>
36	ausência	3,0x10 <sup>2</sup>	150	<10	<10
37	ausência	<10	<3	<10	<10
38	ausência	<10	<3	<10	<10
39	ausência	<10	<3	<10	1,5x10 <sup>2</sup>
40	ausência	<10	<3	<10	<10
41	ausência	<10	210	<10	1,5x10 <sup>2</sup>
42	ausência	<10	11	<10	<10

Padrões estabelecidos pela resolução RDC n.º 12 de 02 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA): *Salmonella* spp./25g = ausente; *B. cereus* = 10<sup>5</sup> UFC/g; Coliformes a 45°C = 10<sup>5</sup> NMP/g; Clostrídio Sulfito Redutor a 46°C = 10<sup>3</sup> UFC/g; Estafilococos Coagulase Positiva = 10<sup>3</sup> UFC/g

superfícies de vegetais, animais e utensílios. A sua pesquisa nos alimentos é utilizada como indicação da qualidade higiênico-sanitária. Os coliformes são subdivididos em dois grupos: totais (Coliformes a 35°C), os quais são oriundos do ambiente e utilizados como indicadores da qualidade higiênica dos alimentos, e fecais (Coliformes a 45°C) que são provenientes de uma contaminação fecal e usados como indicadores de qualidade sanitária dos alimentos<sup>15</sup>. Rodrigues et al<sup>4</sup>, ao avaliarem amostras de cachorros-quentes da cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, encontraram um percentual de 25% das amostras insatisfatórias para este grupo de microrganismos. Hanashiro et al<sup>1</sup> obtiveram resultados semelhantes a Rodrigues et al<sup>4</sup> para coliformes fecais em amostras de cachorros-quentes coletadas em uma área restrita da cidade de São Paulo, com 24% de resultados acima do permitido. Portanto, é possível observar que a falta de higiene na manipulação de alimentos não é um problema regional, mas de preocupação nacional.

A presença elevada de *Estafilococos Coagulase Positiva* em alimentos indica falta de higiene na manipulação e sua pesquisa é importante porque é uma bactéria potencialmente patogênica podendo, inclusive, ser toxigênica<sup>15</sup>. Rodrigues et al<sup>4</sup> obtiveram valores de 37% das amostras positivas e acima do limite para este microrganismo, Hanashiro et al<sup>1</sup> não o detectaram em seus estudos. O resultado obtido na presente pesquisa (Figura 2), embora menor do que o encontrado por Rodrigues et al<sup>4</sup>, foi maior do que o permitido pela legislação vigente e superior a Hanashiro et al<sup>1</sup>.

A *Salmonella* spp. não foi detectada em nenhuma amostra de cachorro-quente analisada, resultado idêntico ao obtido por Rodrigues et al<sup>4</sup>, o que sugere baixa prevalência desta bactéria neste tipo de alimento.

Através da avaliação dos resultados obtidos com a realização do primeiro *check list* e das análises microbiológicas dos cachorros-quentes, pôde-se concluir que grande parte das não conformidades e contaminações observadas podem ser corrigidas a partir da adoção de técnicas simples como: práticas de saneamento básico com a utilização de água potável em reservatório apropriado; armazenamento adequado das matérias-primas, especialmente no que diz respeito aos vasilhames utilizados e temperatura de armazenamento; higienização adequada dos vegetais empregados; instalação do ponto de venda próximo a locais com disponibilidade de sanitários que possam ser utilizados pelos manipuladores dos alimentos, entre outras

medidas. Neste sentido, a realização do treinamento em Boas Práticas de Manipulação torna-se importante ferramenta de educação sanitária no intuito de melhorar as condições dos pontos de venda de cachorro-quente.

Após o segundo *check list*, realizado em uma amostra de 10 ambulantes, pôde-se perceber que alguns aspectos, principalmente de higienização foram melhorados. O que mais chamou a atenção foi que lixeiras foram tampadas, o detergente tem sido substituído pelo álcool na limpeza, o contato com dinheiro vem sendo feito de forma que não envolva o contato com o lanche, em certos locais utilizam-se agora papéis de mão descartáveis ao invés de pano úmido para pequenas limpezas. Também foi possível verificar que os ambulantes se mostraram muito interessados em ideias novas sugeridas por nós, como a utilização de termômetros para verificar se as temperaturas utilizadas são adequadas, sugestão de lâmpadas que não atraiam insetos, lixeiras que abrem com um pedal, entre outros.

Apesar de todos estes avanços, verifica-se que ainda há alguns aspectos que precisam ser melhorados em muitos lugares. Entretanto, pode-se afirmar que os trabalhos de treinamento e conscientização dos ambulantes quanto à necessidade da adoção de técnicas adequadas têm resultados muito mais eficientes e duradouros do que as ações de punição que, por não educarem, levam a reincidências nas não conformidades. Considerando a importância social e econômica do comércio ambulante para o município, a partir da conscientização dos ambulantes e da implantação das Boas Práticas de Manipulação, a população que usufrui dos serviços prestados por estes trabalhadores é grandemente beneficiada com o consumo de alimentos mais seguros.

---

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Secretaria de Vigilância Sanitária de Maringá pelo suporte e apoio na coleta de amostras, ao SENAC pela parceria na realização do treinamento em Boas Práticas de Manipulação e à Fundação Araucária pelo financiamento da pesquisa.

---

#### REFERÊNCIAS

1. Hanashiro A, Morita M, Matt GR, Matt MH, Torres EAFS. Microbiological quality of selected street foods from a restricted area of São Paulo city, Brazil. *Food Control*. 2005; 16: 439-44.

2. Arámbulo P, Almeida CR, Cuéllar, J, Belotti, AJ. Street food vending in Latin America. *Bull. PAHO*. 1994; 28(4): 344-54.
3. Cruz AG, Louza BJG, Corno CN, Fernandez-Ferreira E, Teixeira FM, Santos GO et al. A questão da higiene de manipuladores das lanchonetes localizadas ao redor do campus do CEFET/Química de Nilópolis, R.J. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2003; 62(3): 245-8.
4. Rodrigues KL, Gomes JP, Conceição RCS, Brod CS, Carvalhas JB, Aleixo JAG. Condições higiênico-sanitárias no comércio ambulante de alimentos em Pelotas-RS. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2003; 23(3): 447-52.
5. Garin B, Aidara A, Spiegel A, Arrive P, Bastarud A, Cartel JL et al. Multicenter study of street foods in 13 towns on four continents by the food and environmental hygiene study group of Pasteur and associated institutes. *J Food Prot*. 2002; 65(1): 146-52.
6. Estado do Sergipe. Prefeitura Municipal de Aracaju. Secretaria Municipal de Saúde. Coordenação de Vigilância Sanitária. Análise dos riscos sanitários do comércio ambulante de alimentos no pré-caju 2008.
7. Faustino JS, Passos EC, Mello ARP, Araújo ALM, Souza CV, Jorge LIF et al. Análises microbiológicas de alimentos processados na Baixada Santista, envolvidos em doenças transmitidas por alimentos, no período de 2000 – 2006. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2007; 66(1): 26-30.
8. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Estados apóiam produtores e investem em segurança alimentar. *Rev Saúde Pública*. 2004; 38(5): 745-7.
9. 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. Brasília, DF, 16 de set. 2004. Disponível em: [<http://legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=12546#>].
10. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Estabelecer os Padrões Microbiológicos Sanitários para Alimentos especificados no Anexo I e determinar os critérios para a Conclusão e Interpretação dos Resultados das Análises Microbiológicas de Alimentos Destinados ao Consumo Humano especificados no Anexo II. Brasília, DF, 16 de set. 2004. Disponível em: [[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12\\_01rdc.htm#](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm#)].
11. Vanderzant C, Splittstoesser DF. Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 3ed. Washington: APHA; 1992.
12. SENAC - Serviço Nacional de Aprendizagem Comercial. Guia Passo a Passo: Implantação de Boas Práticas e Sistema APPCC. Projeto APPCC Mesa. 2ª ed. Rio de Janeiro; 2002.
13. Tomich RGP, Tomich TR, Amaral C A A, Junqueira R. G. Pereira AJG. Metodologia para Avaliação das boas práticas de fabricação em indústrias de pão de queijo. *Ciênc Tecnol Alim*. 2005; 25: 115-20.
14. SENAC - Serviço Nacional de Aprendizagem Comercial. Cartilha do Manipulador de Alimentos. Projeto APPCC Mesa. 2ª ed. Rio de Janeiro, 2002.
15. Franco BDGM, Landgraf M. *Microbiologia dos Alimentos*. 2ª ed. São Paulo: Atheneu; 1996.



## Capacidade antioxidante da microalga *Spirulina platensis* em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* submetidas ao estressor paraquat

Antioxidant capacity of the *Spirulina platensis* microalgae on *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells exposed to paraquat stressor

RIALA6/1263

Cíntia GUARIENTI<sup>1\*</sup>, Telma Elita BERTOLIN<sup>2</sup>, Jorge Alberto Vieira COSTA<sup>1</sup>

\*Endereço para correspondência: \*BR 285, km 171, Bairro São José, Caixa Postal 611, CEP 99001-970, Passo Fundo, RS. Fone: (54) 3316 – 8490. e-mail: cguarienti@yahoo.com.br

<sup>1</sup>Laboratório de Engenharia Bioquímica - Universidade Federal do Rio Grande

<sup>2</sup>Laboratório de Fermentações - Universidade de Passo Fundo

Recebido: 17.09.2009 – Aceito para publicação: 15.03.2010

### RESUMO

Em virtude de várias publicações terem mostrado a alta associação entre a geração de radicais livres e as doenças crônico-degenerativas, tem havido grande interesse por alimentos funcionais antioxidantes. O excesso de espécies reativas no organismo resulta em estresse oxidativo que provoca danos celulares e teciduais. A microalga *Spirulina* tem sido pesquisada em função de suas propriedades nutricionais e antioxidantes. O objetivo desse trabalho foi de avaliar a atividade antioxidante da microalga *Spirulina*, utilizando-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo biológico. A levedura foi submetida ao estressor 1,1'- dimetil - 4,4'- bipyridílio (paraquat), nas concentrações 0, 10 e 15 mM. O potencial antioxidante foi avaliado pela técnica de sobrevivência celular (plaqueamento) e pelo ensaio de lipoperoxidação (valores de TBA). Observou-se aumento significativo de sobrevivência celular ( $p \leq 0,05$ ), quando submetidos aos tratamentos com paraquat e *Spirulina*, em comparação com o experimento em que foi utilizado somente o paraquat. O agente estressor gerou aumento significativo ( $p \leq 0,05$ ) na lipoperoxidação (valores de TBA), o qual foi atenuado pelo tratamento com *Spirulina*, não diferindo do tratamento controle ( $p > 0,05$ ). A microalga *Spirulina* apresentou capacidade antioxidante, que protege as células da levedura contra os danos oxidantes provocados pelo paraquat.

**Palavras-chave.** antioxidante, estresse oxidativo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Spirulina*.

### ABSTRACT

Because of some studies that have shown the occurrence of high correlation between free radicals generation and chronic degenerative diseases, the option for consuming antioxidant functional foods has been increasing. The excess of reactive species in the organism results in an oxidative stress that causes cellular and tissues damages. The microalgae *Spirulina* has been investigated due to its nutritional and antioxidant properties. The present study assessed the antioxidant capacity of microalgae *Spirulina* on *Saccharomyces cerevisiae* yeast, as a biological model, which has been exposed to stressor 1,1' - dimethyl - 4,4' - bipyridyl (paraquat) at 0.10 and 15 mM concentrations. The antioxidant potential was evaluated on cellular survival by plaque assay and on lipoperoxidation technique (values of TBA). The cellular survival rate increased significantly ( $p \leq 0.05$ ) when treated with both paraquat and *Spirulina*, in comparison to those treated only with paraquat. The stressor agent caused a significant increase ( $p \leq 0.05$ ) in lipoperoxidation values (TBA), which was attenuated by treating with *Spirulina*, not differing from the control treatment ( $p > 0.05$ ). Therefore, the microalgae *Spirulina* shows antioxidant capacity, which protects yeast cells against the oxidative damages caused by paraquat.

**Key words.** antioxidant, oxidative stress, *Saccharomyces cerevisiae*, *Spirulina*.

## INTRODUÇÃO

O interesse de diferentes segmentos, dentre eles a indústria de alimentos, por componentes bioquímicos ativos, também denominados alimentos funcionais, tem sido fundamentado nas questões qualidade de vida, longevidade e saúde. O termo funcional aplicado aos alimentos tem assumido diferente conotação que é a de proporcionar um benefício fisiológico adicional, além daquele de satisfazer as necessidades nutricionais básicas<sup>1</sup>. Um dos fatores que pode caracterizar um alimento como funcional é seu potencial como antioxidante.

Os antioxidantes atuam como varredores de radicais livres (RL) e espécies reativas de oxigênio (ERO). A produção destas espécies reativas é parte integrante do metabolismo humano, sendo observada em diversas condições fisiológicas e desempenhando papel fundamental no metabolismo celular. O excesso de radicais livres pode gerar o estresse oxidativo, o que pode provocar alterações teciduais responsáveis por diversas patologias<sup>2</sup>. O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante<sup>3</sup>, sendo o sistema oxidante predominante e responsável por citotoxicidade em vários tipos de células. Entre os diversos agentes oxidantes existentes, encontra-se o herbicida paraquat (1,1 - dimetil - 4,4' biperidílio), que é uma fonte exógena de radicais livres<sup>4</sup>. O paraquat em presença de NADPH (fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo) gera o radical paraquat, superóxido e hidroxila<sup>4,5</sup>. O paraquat reage com o NADPH sofrendo uma redução por ação da enzima NADPH-citocromo P<sub>450</sub> redutase, o que resulta na geração de um radical paraquat. Entretanto, sob condições aeróbicas, esse elétron é transferido ao oxigênio, que se transforma em ânion superóxido (O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>)<sup>6,7</sup>.

Embora o organismo disponha de efetivas defesas antioxidantes para neutralizar os radicais livres, dentre elas as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona (GX), existem situações fisiológicas promotoras de estresse oxidativo, onde a suplementação com antioxidantes exógenos apresenta relevante importância para manter o equilíbrio entre pró e antioxidantes. A crescente busca por produtos com atividade antioxidante em terapias preventivas relacionadas ao estresse oxidativo, confere atenção especial aos produtos naturais<sup>4</sup>.

A *Spirulina* é uma cianobactéria consumida a milhares de anos por Astecas e Maias como fonte de alimentação primária, que contém elevados níveis de antioxidante, como por exemplo, carotenoides<sup>8</sup>, especialmente beta-caroteno<sup>9</sup> e ficocianina, que é seu pigmento principal<sup>10</sup>.

A microalga *Spirulina* apresenta características que sugerem aplicações clínicas que lhe conferem efeitos terapêuticos em pacientes acometidos de diversas patologias<sup>11</sup>. A *Spirulina* vem sendo fonte de pesquisa devido a evidências de seu potencial terapêutico na prevenção e diminuição dos danos causados por dislipidemias e sua atuação como composto com atividade antioxidante<sup>12</sup>.

A avaliação da capacidade antioxidante empregando animais de laboratório é, em geral, de difícil execução e necessita de um número elevado de animais para assegurar resultados significativos. Os ensaios realizados com microrganismos são fáceis, rápidos e podem utilizar um grande número de células com as mesmas características genéticas. A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, sob o ponto de vista genético e metabólico, é um dos organismos mais utilizados em testes biológicos<sup>13</sup>. Várias razões tornam a levedura *Saccharomyces cerevisiae* um modelo de sistema eucariótico unicelular para estudos de estresse oxidativo. Seu metabolismo é semelhante ao de eucariotos superiores, com mecanismos próprios de ativação metabólica (citocromo P<sub>450</sub>) e de detoxificação, que não estão presentes em bactérias<sup>13,14</sup>. A avaliação da capacidade antioxidante pode ser realizada pela medida da sobrevivência de células tratadas com o antioxidante e agentes estressores, como por exemplo, a apomorfina, o paraquat<sup>14,15,16</sup> e o glutamato monossódico<sup>17,18</sup>.

Neste contexto, objetivou-se avaliar a capacidade antioxidante da microalga *Spirulina platensis*, na viabilidade celular e na lipoperoxidação (valores de TBA) da levedura *Saccharomyces cerevisiae* frente ao estresse oxidativo gerado pela adição de 1,1' - dimetil - 4,4' - biperidílio (paraquat).

## MATERIAL E MÉTODOS

### Antioxidante

Foi analisada como substância antioxidante a biomassa da microalga *Spirulina*, Cepa LEB-18. A concentração de *Spirulina* utilizada nos ensaios foi 0,025 mM, maior concentração não citotóxica de antioxidante para a levedura *Saccharomyces cerevisiae*<sup>19</sup>. A medida da concentração de *Spirulina* foi realizada indiretamente, utilizando o peso molecular de seu principal pigmento (ficocianina) e considerando que este representa 20% da microalga.

### Agente estressor

Como agente estressor foi utilizado o 1,1' - dimetil - 4,4' - biperidílio (paraquat), nas concentrações 0 mM, 10 mM e 15 mM.

### Cultivos e tratamentos

Os cultivos foram realizados em erlenmeyers de 250 mL, contendo 160 mL de meio de cultivo e 16 mL do inóculo (10 % do volume inicial). Os cultivos foram submetidos a agitação orbital termostaticada (150 rpm, 30°C), para o crescimento da levedura em aerobiose. Para os tratamentos, aproximadamente  $2 \times 10^6$  células/mL proveniente da fase exponencial de crescimento foram tratadas com as soluções do antioxidante e do agente estressor.

Foram realizados cinco tratamentos: tratamento controle (sem adição de estressor e de antioxidante); tratamento com paraquat 10 mM e tratamento com paraquat 15 mM (somente adição de paraquat nas concentrações 10 mM e 15 mM, respectivamente); tratamento com paraquat 10 mM + *Spirulina* e tratamento com paraquat 15 mM + *Spirulina* (com adição de *Spirulina* e com paraquat nas concentrações 10 mM e 15 mM, respectivamente).

Após a adição do agente estressor e do antioxidante, os tratamentos foram incubados por 21 h a 28°C para posterior análises.

### Sobrevivência celular

Para a determinação da sobrevivência celular, procedeu-se o plaqueamento das células em meio contendo 2% de glicose, 1% de extrato de malte, 0,5% de extrato de levedura, 0,02% de fosfato de sódio monobásico e 2% de agar. Após a semeadura, as placas foram incubadas a 28°C por 48h. Procedeu-se a contagem das colônias em cada placa e determinou-se a sobrevivência celular em logaritmo de unidades formadoras de colônia (Log UFC).

### Lipoperoxidação

Para a quantificação da lipoperoxidação, foi realizada a análise de TBA (ácido tiobarbitúrico). Para a análise foram retirados 5 mL do tratamento e procedeu-se a sonificação por 20 min. Adicionou-se 2,5 mL de tricloroacético (TCA) 15% e submeteu-se a mistura a centrifugação por 15 min a 3000 rpm. Adicionou-se 2,5 mL de TBA (0,28% em 90% de ácido acético) a 2,5 mL do sobrenadante. Submeteu-se a mistura a banho maria (95°C) por 30 min. A leitura em espectrofotômetro foi realizada a 532 nm. A quantificação das proteínas foi realizada pelo método de Lowry<sup>20</sup>. O valor de TBA foi quantificado em nmol de malonaldeído por miligrama de proteína (nmol malonaldeído/mg proteína).

### Análise Estatística

Os resultados foram submetidos a tratamento estatístico por análise de variância e pós-teste de Tukey a 5% de significância ( $p \leq 0,05$ ) utilizando o Programa R v. 2.10.1 (Development Core Team)<sup>21</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise estatística dos resultados referentes à Tabela 1 mostra diferença significativa entre os tratamentos ( $p \leq 0,05$ ). Os grupos tratados com estressor (paraquat 10 mM e paraquat 15 mM) apresentaram níveis de sobrevivência celular estatisticamente inferiores ao controle, indicando morte celular causada pelo estressor. Este resultado mostra que concentrações de paraquat 10 mM e 15 mM exercem efeito citotóxico sobre células da levedura. Quando se analisa a adição da microalga *Spirulina* com o agente estressor paraquat (10 e 15 mM) verifica-se que a sobrevivência celular aumenta, chegando a valores estatísticos iguais ao tratamento controle.

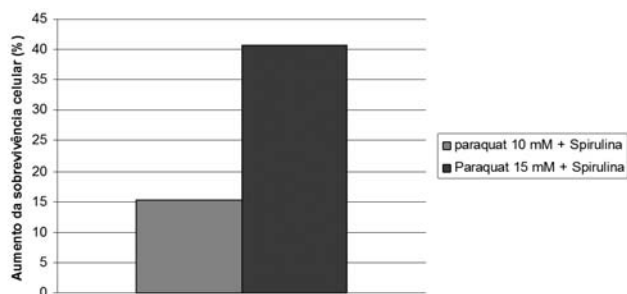
**Tabela 1.** Sobrevivência celular para os diferentes tratamentos das células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*

TRATAMENTOS	SOBREVIVÊNCIA CELULAR (Log UFC)
Controle	8,53 ± 0,06 <sup>a</sup>
Paraquat 10 mM	8,04 ± 0,05 <sup>b</sup>
Paraquat 15 mM	7,78 ± 0,16 <sup>b</sup>
Paraquat 10 mM + <i>Spirulina</i>	8,38 ± 0,09 <sup>a</sup>
Paraquat 15 mM + <i>Spirulina</i>	8,37 ± 0,06 <sup>a</sup>

\*Letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de significância

Os resultados de sobrevivência celular também foram analisados pela comparação dos valores percentuais de sobrevivência da levedura tratada somente com o paraquat, e tratada com esse agente estressor adicionado de *Spirulina*, como agente antioxidante. A contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) do tratamento controle representa 100% de sobrevivência, uma vez que não teve influência dos agentes

estressor e antioxidante. A sobrevivência celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* tratada com paraquat foi de 39,4% e 17,1% quando usadas as concentrações 10 mM e 15 mM, respectivamente. A adição da *Spirulina* aos tratamentos elevou a sobrevivência para 54,8% e 57,8%, respectivamente, mostrando aumento 15,3% para a concentração 10 mM de paraquat e 40,8% para a concentração 15 mM (Figura 1).



**Figura 1.** Aumento do percentual de sobrevivência da levedura *Saccharomyces cerevisiae* tratada com *Spirulina* em presença de paraquat

Resultados semelhantes, de aumento no percentual de sobrevivência da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, foram encontrados por Soares et al<sup>22</sup> utilizando o estressor paraquat nas concentrações 10 mM e 15 mM e o BHT (butilhidroxitolueno) como agente antioxidante, sendo o aumento de 19,95% e 20,92% quando usadas as concentrações 10 e 15 mM, respectivamente.

O tratamento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* com *Spirulina* e paraquat na concentração de 15 mM, mostrou aumento do percentual de sobrevivência (40,8%) superior ao valor experimental encontrados por Soares et al<sup>19</sup> (32%), que testaram naringinina como antioxidante frente a apomorfina como agente estressor.

A *Spirulina* foi capaz de proteger as células da levedura dos danos oxidativos causados pelo paraquat em ambas as concentrações testadas, porém a atividade da *Spirulina* foi mais pronunciada quando se utilizou a concentração 15 mM de paraquat.

Os grupos que receberam o agente estressor (paraquat), em ambas as concentrações, apresentaram valores de TBA significativamente superiores aos tratamentos com *Spirulina platensis* (Tabela 2). Considerando que o TBA reflete a quantidade de malonaldeído, o aldeído individual mais abundante resultante da peroxidação lipídica<sup>23</sup>, estes resultados indicam que o herbicida paraquat promove a peroxidação e a *Spirulina* atua minimizando este efeito deletério nas células da levedura.

**Tabela 2.** Índice de TBA da levedura *Saccharomyces cerevisiae* para os tratamentos com paraquat em presença e ausência de *Spirulina*

TRATAMENTOS	TBA* (nmol malonaldeído/mg de proteína)
Controle	6,64 ± 0,14 <sup>a</sup>
Paraquat 10 mM	9,58 ± 0,27 <sup>b</sup>
Paraquat 15 mM	9,86 ± 0,98 <sup>b</sup>
Paraquat 10 mM + <i>Spirulina</i>	5,35 ± 0,22 <sup>a</sup>
Paraquat 15 mM + <i>Spirulina</i>	5,81 ± 1,35 <sup>a</sup>

\*Letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Tukey,  $p \leq 0,05$

O estresse oxidativo como componente do processo metabólico e a excitocidade são responsáveis pelo desenvolvimento de neurodegenerações<sup>24,25,26,27</sup>. Estes eventos refletem um desequilíbrio entre espécies reativas de oxigênio (ERO) e sua degradação pelo sistema antioxidante<sup>28,29</sup>. Este desequilíbrio pode ser originário de uma superprodução de ERO e/ou uma redução nas defesas antioxidantes<sup>30,31,32</sup>.

A atuação da microalga *Spirulina* na manutenção dos parâmetros avaliados mostra uma atenuação dos radicais livres e dos danos gerados. Essa proteção antioxidante reforça a teoria de Pompella<sup>33</sup>, que ressalta a importante relação entre a inclusão de antioxidantes na dieta e a diminuição do risco do desenvolvimento de doenças associadas ao acúmulo de radicais livres.

Estes resultados reforçam a ideia dos benefícios da utilização de antioxidantes em alimentos, cosméticos e medicamentos, que foram comprovados em diversas pesquisas<sup>4,34,35,36,37</sup>, por este motivo existe a busca crescente em pesquisas relacionados com a capacidade antioxidante de compostos naturais, a fim de que possam vir a substituir os antioxidantes sintéticos como o BHT, sem prejuízo da capacidade antioxidante e sem os efeitos indesejáveis relatados para os mesmos<sup>38</sup>.

## CONCLUSÃO

O uso da *Spirulina* em células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* tratadas com paraquat 10 e

15 mM aumentou a sobrevivência celular em 15,3% e 40,8%, respectivamente.

Os valores de TBA (medida de lipoperoxidação) encontrados para o tratamento com 10 mM de paraquat + *Spirulina* e 15 mM de paraquat + *Spirulina* foram significativamente inferiores aos tratados com paraquat 10 e 15 Mm e não diferiram do controle.

Os resultados de atenuação do estresse oxidativo da levedura *Saccharomyces cerevisiae* frente ao estressor 1,1'- dimetil - 4,4'- biperidílio (paraquat), pela *Spirulina*, corroboram com os resultados já existentes de seu potencial antioxidante.

## REFERÊNCIAS

1. Hasler CM. Functional Foods for Health Program. Department of Food Science and Human Nutrition da University of Illinois. *Food Technol*. 1998; 52: 57-62.
2. Drodge W. Free radical in the physiological control of cell function. *Phys. Rev*. 2002; 41: 47-95.
3. Finkel T, Holbrook. *N J Nature* (London, U.K.) 2000; 408: 239-41.
4. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Rad. in Biol. and Med.* 3 ed. Clarendon. Oxford, 2000.
5. Bulkley GB. Free radicals and other reactive oxygen metabolites: clinical relevance and the therapeutic efficacy of antioxidant therapy. *Surgery*. 1993; 113: 479-483.
6. Smith P, Heath D. Paraquat. *CRC Crit. Rev. Toxicol*. 1976; 4: 411-45.
7. Farrington JA. Bipyridylum quaternary salts and related compounds. V. Pulse radiolysis studies of the reaction of paraquat radical with oxygen. Implications for the mode of action of bipyridyl herbicides. *Biochem. Biophys. Acta*. 1973; 314: 372-81.
8. Annapura VV, Deosthale Y G, Bamji M S. *Spirulina* as a source of vitamin A. *Plant Foods Hum. Nutr*. 1991; 41: 125-34.
9. Careri M, Furlattini L, Mangia A, Musc M, Anklam E, Theobald A et al. Supercritical fluid extraction for liquid chromatographic determination of carotenoids in *Spirulina* Pacifica algae: a chemometric approach. *J. Chromat.* 2001; 912: 61-71.
10. Reddy CM, Bhat VB, Kiranmai G, Reddy MN, Reddanna P, Madyastha KM. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 by C-phycoyanin, a biliprotein from *Spirulina platensis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000; 277: 599-603.
11. Richmond A. *Handbook of Microalgal Mass Culture*. Boston: CRC Press. ISBN 0-84933240-0. 1990.
12. Belay A. The potential application of *Spirulina* (*Arthrospira*) as a nutritional and therapeutic supplement in health management. *J. of the American Nutraceutical Assoc.* 2002; 5 (2): 27-48.
13. Henriques JAP, Dafré AL, Picada JN, Marisa AF, Salvador M. Espécies reativas de oxigênio e avaliação de antioxidante em sistemas biológicos. In: Serafini LA, Barros NM, Azevedo JL. *Biotecnol. na Agricult. e na Agroind. Guaíba: Agropecuária*. 2001; 1: 227-52.
14. Soares DG, Andrezza AC, Salvador M. Sequestering ability of butylated hydroxytoluene, propyl gallate, resveratrol, and vitamins C and E against ABTS, DPPH, and hydroxyl free radicals in chemical and biological systems. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51: 1077-80.
15. Espín JC, Soler-Rivas C, Wichers HJ. Characterization of the total free scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2 diphenyl- 1-picrylhydrazyl radical. *J. Agric. Food Chem.* 2000; 48: 648-56.
16. Benzie IFF, Szeto YT. Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/ antioxidant power assay. *J. Agric. Food Chem.* 1999; 47: 633-6.
17. Farombi EO, Onyema OO. Monosodium glutamate-induced oxidative damage and genotoxicity in the rat: modulatory role of vitamin C, vitamin E and quercetin. *Hum. Exp. Toxicol.* 2006; 25: 251-9.
18. Diniz YS. Toxicity of hipercaloric diet and monosodium glutamate: oxidative stress and metabolic shifting in hepatic tissue. *Food Chemical Toxicol.* 2004; 42: 313-9.
19. Soares DG, Andrezza AC, Salvador M. Avaliação de compostos antioxidantes em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. *Brazilian J. of Pharm. Sci.* 2005; 41.
20. Lowry HO, Rosenbrough N J, Farr A L, Randall R J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193: 265-75.
21. Montgomery DC, Runger GC. *Applied statistics and probability for engineers*. Wiley.
22. Soares DG, Andrezza AC, Salvador M. *Saccharomyces cerevisiae* como modelo biológico para avaliação da capacidade antioxidante de compostos. *Rev. Bras. Farm.* 2004; 85: 45-7.
23. Esterbauer H, Cheeseman K. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynoneal. *Method. Enzymol.* 1990; 186: 407-8.
24. Rodrigues CM, Spellman SR, Sola S, Grande AW, Linehan-Stieers C, Low WC et al. Neuroprotection by a bile acid in an acute stroke model in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2002; 22: 463-71.
25. Alexi T, Borlongan CV, Faull RL, Williams CE, Clark RG, Gluckman PD et al. Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases. *Prog. Neurobiol.* 2000; 60: 409-70.
26. Bruce-Keller AJ, Umberger G, Mcfall R, Mattson MP. Food restriction reduces brain damage and improves behavioral outcome following excitotoxic and metabolic insults. *Ann. Neurol.* 1999; 45: 8-15.
27. Mattson MP, Pedersen WA, Duan W, Culmsee C, Camandola S. Cellular and molecular mechanisms underlying perturbed energy metabolism and neuronal degeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1999; 893: 154-75.
28. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 1984; 219: 1-14.
29. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.* 1982; 47: 412-26.
30. Ahmad M, Yousuf S, Khan MB, Hoda MN, Ahmad AS, Ansari MA et al. Attenuation by Nardostachys jatamansi of 6-hydroxydopamine-induced parkinsonism in rats: behavioral, neurochemical, and immunohistochemical studies. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2006; 83: 150-60.

31. Butterfield DA, Koppal T, Subramaniam R, Yatin S. Vitamin E as an antioxidant/free radical scavenger against amyloid beta-peptide-induced oxidative stress in neocortical synaptosomal membranes and hippocampal neurons in culture: insights into Alzheimer's disease. *Rev. Neurosci.* 1999; 10: 141-9.
32. Jenner P, Olanow CW. Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurol.* 1996; 47: 161-70.
33. Pompella A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. *Intern. J. Vitamin Nutrit. Res.* 1997. 67: 289-97.
34. Dalla Corte CL. Avaliação dos efeitos do tratamento crônico com neurolépticos e sua interação com substâncias potencialmente antioxidantes sobre parâmetros de estresse oxidativo no fígado e rim de ratos. [Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica Toxicológica]. Santa Maria – RS. Universidade Federal de Santa Maria. 2008.
35. Dani C, Pasquali MAB, Oliveira MR, Umezu FM, Salvador M, Henriques JAP et al. Protective effects of purple grape juice on carbon tetrachloride-induced oxidative stress in brain of adult wistar rats. *J. Med. Food.* 2008; 11: 55-61.
36. Wagner C, Fachineto R, Dalla Corte CL, Brito VB, Severo D, Dias GOC et al. Quercitrin, a glycoside form of quercetin, prevents lipid peroxidation in vitro. *Brain Res.* 2006; 192-8.
37. Ko SH, Choi SW, Ye SK, Cho BL, Kim HS, Chung MH. Comparison of the antioxidant activities of nine different fruits in human plasma. *J. Medic. Food.* 2005; 8: 41-6.
38. Zeiger E. Mutagenicity of chemicals added to food. *Mutation Res.* 1999; 250: 53-61.

## Variação da qualidade do leite cru refrigerado em função do período do ano e do tipo de ordenha

Change in the quality of cooled raw milk due to the year period and type of milking

RIALA6/1264

Marco Antônio Pereira da SILVA<sup>1\*</sup>, Priscila Alonso dos SANTOS<sup>1</sup>, José Waldemar da SILVA<sup>1</sup>, Karen Martins LEÃO<sup>1</sup>, Antônio Nonato de OLIVEIRA<sup>2</sup>, Edmar Soares NICOLAU<sup>2</sup>

\*Endereço para correspondência: Instituto Federal Goiano. Campus Rio Verde. Rodovia Sul Goiana, Km 01, Caixa Postal 66, Zona Rural, CEP – 75.901-040, Rio Verde, GO, Brasil. Tel. (64) 3620-5626. e-mail: marcotonyrv@yahoo.com.br

<sup>1</sup>Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, GO, Brasil

<sup>2</sup>Centro de Pesquisa em Alimentos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás.Goiânia, GO, Brasil

Recebido: 17.11.2009 – Aceito para publicação: 30.03.2010

### RESUMO

O objetivo desta investigação foi de avaliar a qualidade do leite cru refrigerado estocado em propriedades rurais nos períodos de tempo chuvoso e seco. As amostras foram avaliadas quanto a CCS, CBT, composição centesimal, contagem de microrganismos psicrotóxicos e acidez titulável; os dados foram submetidos à análise de variância. Os fatores analisados foram: período do ano (chuvoso ou seco) e tipo de ordenha (manual ou mecânica), em delineamento inteiramente randômico e em arranjo fatorial 2 x 2. A comparação dos resultados em função do período de ano e tipo de ordenha foi realizada por meio do teste F da análise de variância; utilizando-se o programa software SISVAR. A taxa de CBT do leite cru refrigerado estava acima do limite estabelecido pela legislação, o que serve de alerta aos produtores e indústrias na obtenção e processamento de leite com qualidade higiênico-sanitária adequada.

**Palavras-chave.** CCS, CBT, leite refrigerado, microrganismos psicrotóxicos.

### ABSTRACT

The present investigation aims at evaluating the quality of cooled raw milk stored in dairy farms during rainy and dry weathers. The collected samples were analyzed on SCC, TBC, centesimal composition, psychrotrophics count and titratable acidity; the variance analysis was employed for evaluating the observed data. The analyzed factors were weather period (rainy or dry) and milking procedure (manual or mechanical), in a random delineation and in factorial arrangement 2 x 2. The data comparison as per year period and milking technique was performed by means of variance analysis (F-test), using the SISVAR software. The TBC rate of cooled raw milk was over the limit established by the legislation in effect, which indicated the inadequate hygienic-sanitary quality of the cooled raw milk samples analyzed.

**Key words.** cooled raw milk, psychrotrophics microorganisms, SCC, TBC.

## INTRODUÇÃO

O resfriamento logo após a ordenha, e a coleta granelizada, são importantes medidas para garantir a qualidade microbiológica do leite<sup>1</sup>. No entanto, a aplicação isolada dessas medidas, não é suficiente, sendo necessário o uso de práticas higiênicas, durante toda a etapa produtiva, para que a indústria possa receber o leite granelizado com uma baixa contagem bacteriana total (CBT).

A composição microbiológica e físico-química do leite está relacionada à estação do ano, raça, nutrição e fisiologia do animal. O mês, idade ao parto e estágio da lactação são importantes quando se avaliam as variações na produção e composição química do leite<sup>2</sup>. Gonzalez et al<sup>3</sup> observaram a influência dos meses do ano na composição química do leite e na incidência de mastite, o que foi relacionado à disponibilidade e qualidade dos alimentos e às condições climáticas favoráveis aos microrganismos.

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a qualidade do leite cru refrigerado estocado em propriedades rurais nos períodos chuvoso e seco, e a influência do tipo de ordenha.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta das amostras

As amostras de leite cru refrigerado foram coletadas de produtores rurais do Sudoeste Goiano. A empresa com inscrição no Serviço de Inspeção Federal (SIF) possuía fornecedores de leite integrados a um programa de coleta granelizada.

As análises eletrônicas (CCS, CBT) e composição centesimal foram realizadas no Laboratório de Qualidade do Leite (LQL) do Centro de Pesquisa em Alimentos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás. As análises microbiológicas e de acidez titulável foram realizadas nos Laboratórios da Unidade de Agroindústria do Instituto Federal Goiano – *Campus* Rio Verde – GO (IFGoiano).

As amostras de leite cru refrigerado foram coletadas de tanques de expansão de produtores individuais. Foram coletadas amostras em sete propriedades rurais nos períodos chuvoso e sete no período seco.

Das sete propriedades rurais, em cinco a ordenha era realizada manualmente e em duas a ordenha era mecânica. Não foi observado nenhum tipo de tratamento da água de abastecimento, e a pastagem era constituída de *Brachiaria*.

A coleta das amostras de leite cru refrigerado era realizada após o resfriamento de pelo menos duas horas no tanque de expansão, perfazendo um total de 28 amostras por período. As propriedades que subsidiaram as coletas foram as mesmas nos dois períodos avaliados.

Para a avaliação da contagem de microrganismos psicotróficos e acidez titulável as amostras foram coletadas em condições assépticas, com o uso de coletor de aço inoxidável e armazenadas em frascos de cor âmbar ( $\pm 250$  mL). Para a avaliação da CCS e composição centesimal as amostras foram coletadas diretamente em frascos contendo pastilha com conservante Bronopol. A coleta das amostras para a CBT foi realizada diretamente em frascos esterilizados contendo conservante Azidiol. Em seguida as amostras eram acondicionadas em caixa isotérmica contendo gelo e encaminhadas para serem analisadas (LQL e IFGoiano).

### Contagem bacteriana total

A contagem bacteriana total (CBT) foi realizada por meio do equipamento Bactoscan FC (Foss Electric A/S. Hillerod, Denmark). Os resultados foram expressos em UFC/mL.

### Contagem de microrganismos psicotróficos

A diluição da amostra foi preparada pipetando-se, assepticamente, 25 mL da amostra, para um frasco tipo Erlenmeyer, contendo 225 mL de água peptonada 0,1% (diluição  $10^{-1}$ ). A partir desta diluição, foram preparadas diluições decimais até  $10^{-6}$ , empregando-se o mesmo diluente. Foi adicionado 1 mL das diluições em placas de Petri (15 x 100) esterilizadas, em duplicata, e adicionados de 15 a 17 mL de ágar padrão para contagem fundido e resfriado a 45°C e homogeneizada (APHA<sup>4</sup>). Após a solidificação do ágar em temperatura ambiente, as placas foram incubadas invertidas a 7°C/10 dias<sup>5</sup>. As contagens foram realizadas em contador de colônias, em placas que continham entre 25 a 250 colônias. Para calcular o número de unidades formadoras de colônia (UFC)/mL, foi multiplicado o número de colônias, em cada placa, pelo inverso da diluição inoculada.

### Contagem de microrganismos psicotróficos proteolíticos

As diluições decimais foram preparadas conforme o descrito para a contagem de microrganismos psicotróficos. Após as diluições decimais, foi adicionado 1 mL de cada diluição em placas de Petri esterilizadas e adicionados de 15 a 17 mL de ágar leite (agar padrão acrescido de 10%



de leite em pó desnatado reconstituído a 10%) preparado recentemente, fundido e resfriado a 45°C. As placas foram incubadas a 21°C/72 horas<sup>5</sup>. As colônias de microrganismos psicotróficos proteolíticos apresentaram-se rodeadas por uma zona clara como resultado da conversão da caseína em compostos nitrogenados solúveis. Como o meio é opaco, utilizou-se um precipitante químico (ácido acético a 10%) para detectar a proteólise, e assim, confirmar se as zonas claras eram causadas por proteólise ou pela formação de ácidos devido à fermentação de carboidratos. Efetuou-se a contagem de colônias que possuíam halo transparente ao redor e calculou-se o número de UFC/mL.

### Contagem de *Pseudomonas* spp.

As diluições decimais foram preparadas conforme o descrito para a contagem de microrganismos psicotróficos. Após a realização das diluições decimais, foi adicionado 0,1 mL das diluições em placas de Petri esterilizadas e adicionados de 15 a 17 mL de *Pseudomonas* Agar Base com 5 mL de glicerol. As amostras foram inoculadas no meio de cultura, espalhadas com alça de Drigalski, sendo imediatamente incubadas a temperatura de 28°C por 48 horas. Ao fim desse período, realizou-se a leitura e interpretação<sup>6</sup>. Os resultados foram expressos em UFC/mL.

### Contagem de células somáticas

A análise de células somáticas (CS) foi realizada através do equipamento Fossomatic 5000 Basic (Foss Electric A/S. Hillerod, Denmark). O resultado foi expresso em CS/mL.

### Acidez titulável

A análise foi realizada de acordo com a metodologia descrita por BRASIL<sup>7</sup>. Os resultados foram expressos em gramas (g) de ácido láctico/100 mL.

### Composição centesimal

Os teores de gordura, proteína, lactose, extrato seco total (EST) e extrato seco desengordurado (ESD) foram determinados pelo equipamento Milkoscan 4000 (Foss Electric A/S. Hillerod, Denmark). Os resultados foram expressos em porcentagem (%).

### Análises Estatísticas

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com período do ano (chuvoso ou seco) e tipo de ordenha (manual ou mecânica) em arranjo fatorial 2 x 2. A comparação do período do ano e do tipo

de ordenha foi realizada por meio do teste F da análise de variância. As análises estatísticas foram realizadas por meio do Software SISVAR<sup>8</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a análise estatística, não houve significância da interação tipo de ordenha e período do ano.

Na Tabela 1 pode ser observado o resultado da qualidade microbiológica e CCS do leite cru refrigerado.

**Tabela 1.** Qualidade microbiológica e CCS do leite cru refrigerado em função do período do ano e tipo de ordenha

Parâmetros	Período do ano		Tipo de ordenha	
	Chuvoso	Seco	Manual	Mecânica
CBT (UFC/mL)	2,3 x 10 <sup>5</sup> ns	1,9 x 10 <sup>6</sup> ns	2,9 x 10 <sup>5</sup> b	3,0 x 10 <sup>6</sup> a
Psicotróficos (UFC/mL)	3,0 x 10 <sup>5</sup> A	2,7 x 10 <sup>5</sup> B	3,1 x 10 <sup>5</sup> ns	2,2 x 10 <sup>5</sup> ns
Proteolíticos (UFC/mL)	1,5 x 10 <sup>5</sup> ns	6,7 x 10 <sup>4</sup> ns	1,2 x 10 <sup>5</sup> ns	8,3 x 10 <sup>4</sup> ns
<i>Pseudomonas</i> spp. (UFC/mL)	4,7 x 10 <sup>4</sup> A	6,8 x 10 <sup>3</sup> B	1,9 x 10 <sup>4</sup> b	4,6 x 10 <sup>4</sup> a
CCS (CS/mL)	2,9 x 10 <sup>5</sup> B	4,9 x 10 <sup>5</sup> A	2,9 x 10 <sup>5</sup> b	6,6 x 10 <sup>5</sup> a

Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas (período do ano) ou minúsculas (tipo de ordenha) na linha diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). ns = não significativo.

A legislação brasileira estabeleceu através da IN 51 que o leite cru refrigerado não deve exceder o limite de 750 mil UFC/mL, no período entre julho de 2008 a julho de 2011, nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul.

Os resultados da CBT obtidos no presente estudo ficaram acima do permitido pela IN 51 no leite ordenhado mecanicamente e durante a estação seca, isso pode ser relacionado à falta de higiene por parte dos manipuladores.

Os valores médios da CBT do presente estudo estão de acordo com Santos<sup>9</sup>, que observou uma alta CBT (4,3 x 10<sup>6</sup>) UFC/mL em amostras de leite granelizado.

Silveira et al<sup>10</sup> relataram que a carga microbiana presente no leite *in natura* tem influência das estações do ano, das práticas de produção e manuseio na propriedade rural, localização geográfica, temperatura de permanência do leite e distância do transporte entre a propriedade rural e o local de beneficiamento.

Os resultados da contagem de psicotróficos do presente estudo ficaram abaixo dos valores encontrados por Santos<sup>9</sup>, que foram de  $2,1 \times 10^6$  UFC/mL. Resultados maiores também foram obtidos por Pinto et al<sup>11</sup>, que relataram contagem de bactérias psicotróficas variando de  $2,0 \times 10^2$  UFC/mL a  $1,0 \times 10^7$  UFC/mL.

De acordo com Fox<sup>12</sup>, as bactérias psicotróficas não são significativas quanto à proteólise, a menos que a população exceda  $10^6$  UFC/mL, entretanto, Cromie<sup>13</sup> relatou que os problemas aparecem quando a contagem atinge  $10^7$  UFC/mL. Para Cousin<sup>14</sup>, os microrganismos psicotróficos evidenciaram atividades bioquímicas mesmo em temperaturas próximas a 0°C.

Embora no período seco a CBT tenha sido mais elevada, a maior contagem de psicotróficos foi observada no período chuvoso, demonstrando que esses microrganismos não têm uma relação direta com a microbiota total e o número de microrganismos psicotróficos e sim com o meio ambiente.

Os resultados da contagem de bactérias psicotróficas proteolíticas observadas neste estudo pode levar ao aumento da proteólise no leite e derivados. Segundo Vidal-Martins et al<sup>15</sup>, durante o armazenamento do leite UAT houve aumento do índice proteolítico e da viscosidade aparente durante a estocagem, relacionado à presença de proteases produzidas por bactérias psicotróficas contaminantes no leite cru. Fonseca e Santos<sup>16</sup> relataram que a temperatura de refrigeração, de cinco a 10°C, contribuiu para a multiplicação de microrganismos psicotróficos.

Os valores da contagem de *Pseudomonas* spp. diferiram significativamente entre os períodos do ano, deixando evidente que esse grupo de microrganismos se desenvolve bem em ambientes com condições higiênico-sanitárias inadequadas. Na época das chuvas a qualidade da água, as condições de higiene dos estábulos, utensílios e ordenhadores, a sanidade do rebanho, contribuíram de modo decisivo, para a maior contagem de psicotróficos. Pode se observar também uma maior contagem de *Pseudomonas* spp. no leite obtido através de ordenha mecânica, evidenciando condições inadequadas de higiene desses equipamentos.

Os resultados da contagem de *Pseudomonas* spp., do presente estudo foram menores que os valores obtidos por Pinto et al<sup>11</sup>, que relataram uma contagem de *Pseudomonas* spp., variando de  $1,0 \times 10^1$  UFC/mL a  $3,8 \times 10^6$  UFC/mL.

Dentre os microrganismos psicotróficos, o gênero *Pseudomonas* spp. representa o grupo de microrganismos

deterioradores predominantes no leite cru refrigerado, particularmente as *Pseudomonas fluorescens*. Costa et al<sup>17</sup> observaram que as *Pseudomonas fluorescens* presentes no leite *in natura*, armazenado a 6°C, produziram enzimas com elevada atividade proteolítica, a partir das 72 horas de incubação e quando a contagem atingia ao redor de  $10^7$  UFC/mL. As proteases liberadas por bactérias proteolíticas causam impacto econômico negativo na industrialização do leite, pois atuam diretamente sobre a caseína, causando sabor amargo no leite e derivados lácteos. Já a lipase, é responsável pelo sabor rançoso do leite devido a liberação de ácidos graxos de cadeia curta<sup>18</sup>.

Lorenzetti<sup>19</sup> observou que durante a estocagem do leite, a contagem de microrganismos psicotróficos aumentou, mesmo com o leite sob temperatura de refrigeração, recomendando-se o menor tempo possível de estocagem para a matéria-prima.

Os resultados médios da CCS foram mais elevados no período seco ( $4,9 \times 10^5$  CS/mL), sendo que no período chuvoso a CCS foi de  $2,9 \times 10^5$  CS/mL. No leite ordenhado mecanicamente ( $6,6 \times 10^5$  CS/mL) os resultados médios da CCS foram maiores que no leite obtido através da ordenha manual ( $2,9 \times 10^5$  CS/mL).

Nas amostras avaliadas por Bueno et al<sup>20</sup> foi observado uma maior CCS no período seco, o que corrobora com os resultados obtidos no presente estudo. A maior CCS no leite obtido através de ordenha mecânica pode estar relacionada ao mau uso dos utensílios e equipamentos de ordenha e à falta de higienização dos tetos antes e após a ordenha, refletindo de maneira expressiva na ocorrência de mastite nos rebanhos.

A CCS do presente estudo está abaixo do limite estabelecido por BRASIL<sup>21</sup> para o recebimento do leite cru refrigerado que é de 750 mil CS/mL, entretanto, os resultados são preocupantes, pois evidenciaram uma alta incidência de mastite sub-clínica nos rebanhos avaliados. A elevada CCS no tanque de expansão pode sinalizar perda de produção de leite, sendo que a baixa CCS no tanque de expansão é um indicativo de bom estado sanitário da glândula mamária.

Os resultados da CCS obtidos no presente estudo foram semelhantes aos valores descritos por Machado et al<sup>22</sup>. Ao avaliarem a qualidade do leite estocado em tanques de expansão em algumas regiões do país, esses pesquisadores obtiveram média de 641 mil CS/mL.

A maior CCS obtida no período seco pode estar relacionada às observações realizadas por Harmon<sup>23</sup> e Philpot<sup>24</sup>, que relataram que a CCS pode aumentar nos meses

mais quentes do ano em decorrência da menor produção de leite e consequente concentração das células somáticas.

Das sete propriedades avaliadas nesta pesquisa cinco ordenhavam o leite manualmente e apenas duas realizavam a ordenha mecanicamente. De acordo com Zanela et al<sup>25</sup>, a maior especialização dos sistemas resulta em maior produção de leite por animal e menor CCS, entretanto, no presente estudo quando o leite foi ordenhado mecanicamente os resultados da CCS foram mais elevados.

Os resultados da acidez titulável e composição centesimal são apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Qualidade físico-química do leite cru refrigerado em função do período do ano e tipo de ordenha

Parâmetros	Período do ano		Tipo de ordenha	
	Chuvoso	Seco	Manual	Mecânica
Acidez titulável (g ácido láctico/100 mL)	0,159 ns	0,169 ns	0,166 ns	0,161 ns
Gordura (%)	3,67 B	4,05 A	4,00 a	3,52 b
Proteína (%)	3,25 ns	3,32 ns	3,27 ns	3,35 ns
Lactose (%)	4,46 B	4,61 A	4,57 a	4,45 b
EST (%)	12,39 B	12,98 A	12,84 a	12,29 b
ESD (%)	8,72 B	8,93 A	8,84 ns	8,77 ns

Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas (período do ano) ou minúsculas (tipo de ordenha) na linha diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). ns = não significativo

Os resultados da acidez titulável estavam de acordo com a legislação brasileira que recomenda o recebimento de leite cru refrigerado com acidez variando de 0,14 a 0,18 g de ácido láctico/100 mL de leite. Resultados semelhantes foram observados por Martins et al<sup>26</sup>, que obtiveram média de 16°D para o mês de março (período chuvoso) e 15,5°D para o mês de julho (período seco).

Os resultados do teor de gordura obtidos no presente estudo estão de acordo com o recomendado por Brasil<sup>21</sup> que admite o recebimento de leite cru refrigerado com o mínimo de 3,0% de gordura. A elevação do teor de gordura no período seco foi relacionada ao maior fornecimento de fibra ao gado de leite, a dieta nesse período era constituída de pastagens de *Brachiaria* e em

alguns casos os animais eram suplementados com cana de açúcar triturada. O maior teor de gordura nesse período também pode ser relacionado à incidência de mastite no rebanho, visto que houve uma maior CCS. Pereira et al<sup>27</sup> observaram maior concentração de gordura no leite de vacas com mastite. Bueno et al<sup>20</sup> informaram que essa elevação pode ser apenas de caráter relativo, em virtude da redução expressiva nos demais componentes. Esses pesquisadores relataram que o teor de gordura do leite diminuiu em consequência da inibição da síntese na glândula mamária.

No presente estudo a porcentagem de gordura foi mais elevada no leite ordenhado manualmente, entretanto, Reis et al<sup>28</sup> encontraram menor teor de gordura no leite submetido ao método de coleta manual em relação ao obtido por ordenha mecânica. Porém, esses pesquisadores informaram que este resultado pode ser relacionado ao fato de que, na coleta manual, coletou-se somente amostra da porção inicial da ordenha, logo, os percentuais de gordura do leite foram menores em relação aos percentuais do leite oriundo de ordenha completa, como é o caso do presente estudo. O menor teor de gordura, observado nas amostras da ordenha mecânica, pode ser relacionado à genética do rebanho, pois os animais com sangue predominantemente holandês produzem menor teor de gordura quando comparado às demais raças.

Os resultados do teor de proteína foram compatíveis com os valores observados por Santos<sup>9</sup>, que obteve 3,23% de proteína em amostras de leite cru refrigerado.

O teor de lactose foi mais elevado durante o período seco e no leite ordenhado manualmente do que o leite obtido no período chuvoso e ordenhado através de ordenha mecânica. Esses resultados ficaram próximos do valor obtido por Santos<sup>9</sup>, que foi de 4,40% de lactose e Noro et al<sup>2</sup>, que relataram média de 4,46% (período chuvoso) e 4,55% (período seco). Os resultados de lactose do presente estudo foram mais elevados no período seco, quando foi observada uma maior CCS, entretanto, Bueno et al<sup>20</sup> observaram uma redução do teor de lactose de 4,60% para 4,36% a medida que a CCS aumentou.

A maior CCS observada no período seco não influenciou os resultados dos sólidos totais, enquanto Bueno et al<sup>20</sup> observaram uma diminuição no EST do leite cru refrigerado em função do aumento da CCS. Houve uma redução de 12,61% para 12,20%.

Os resultados do EST observados nesta pesquisa foram maiores que os resultados obtidos por Gonzalez et al<sup>3</sup>, que relataram média de 12,08% no período chuvoso e

12,04% no período seco e Martins et al<sup>26</sup>, que obtiveram média de 11,41% no período chuvoso e 11,24% no período seco, entretanto esses pesquisadores observaram maior EST no período chuvoso.

Os resultados da composição físico-química ficaram dentro dos limites estabelecidos por BRASIL<sup>21</sup>. Na pesquisa realizada por Zanela et al<sup>25</sup> apenas 41,8% das amostras de leite enquadraram-se nos limites estabelecidos pela IN 51.

## CONCLUSÃO

A CCS e CBT foram mais elevadas no leite granelizado coletado durante o período seco e obtido através da ordenha manual. Evidenciando a necessidade da adoção de medidas higiênico-sanitárias por parte dos elos envolvidos na cadeia produtiva do leite e especialmente quanto ao uso de tecnologia para obtenção do leite *in natura*, a fim de que o leite granelizado possa atender às exigências da legislação quanto a CBT.

A composição centesimal atendeu aos requisitos mínimos estabelecidos pela legislação brasileira para o recebimento do leite cru refrigerado.

## REFERÊNCIAS

1. Nero LA, Mattos MR, Beloti V, Barros MAE, Pinto JPAN, Andrade NJ et al. Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa 51. *Cienc Tecnol Aliment*. 2005; 25(1): 191-5.
2. Noro G, Gonzalez FHD, Campos R, Durr JW. Fatores ambientais que afetam a produção e a composição do leite em rebanhos assistidos por cooperativas no Rio Grande do Sul. *R Bras Zootec*. 2006; 35 (3): 1129-35.
3. Gonzalez HL, Fischer V, Ribeiro MER, Gomes JF, Stumpf Jr W, Silva MA. Avaliação da qualidade do leite na bacia leiteira de Pelotas, RS. Efeito dos meses do ano. *R Bras Zootec*. 2004; 33 (6): 1531-43.
4. APHA – American Public Health Association. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4. ed. Washington: APHA, 2001.
5. Marshall RT. *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*. 16th ed. APHA, Washington, D.C 1992.
6. King EO, Ward MK, Raney DE. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J Lab Clin Med*. 1954; 44: 301.
7. Brasil. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. *Diário Oficial [da] União, Brasília, DF, 14 dez. 2006. Seção 1, Página 8*.
8. Ferreira DF. *Sisvar: versão 4.3 (Build 43)*. Lavras: Departamento de Ciências Exatas: Universidade Federal de Lavras; 2003.
9. Santos PA. Avaliação do leite cru refrigerado produzido na região sudoeste do estado de Goiás estocado por diferentes períodos [Tese de doutorado]. Goiânia, Goiás: Universidade Federal de Goiás, 2008. 50 pp.
10. Silveira IA, Carvalho EP, Teixeira D. Influência de microrganismos psicrotóxicos sobre a qualidade do leite cru refrigerado. Uma revisão. *Hig Aliment*. 2000; 12 (55): 21-7.
11. Pinto CLO, Martins ML, Vanetti MCD. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrotóxicas proteolíticas. *Cienc Tecnol Aliment*. 2006; 26 (3): 645-51.
12. Fox PF (ed.). *Developments in Dairy Chemistry – 4. Functional Milk Proteins*. Elsevier Applied Science, Elsevier Science Publisher Ltd. London and New York; 1989.
13. Cromie S. Psychrotrophs and their enzyme residues in cheese milk. *Austr J Dairy Technol*. 1992; 47 (2): 96-100.
14. Cousin MA. Presence and activity of Psychrotrophic bacteria in South East Queensland dairy products. *Austr J Dairy Technol*. 1982; 37: 147.
15. Vidal-Martins AMC, Salotti BM, Rossi Junior OD, Penna ALB. Evolução do índice proteolítico e do comportamento reológico durante a vida de prateleira de leite UAT/UHT. *Cienc Tecnol Aliment*. 2005; 25 (4): 698-704.
16. Fonseca LFL, Santos MV. *Qualidade do leite e controle de mastite*: Lemos Editora: 2000.
17. Costa LM, Gómez MF, Molina LH, Romero A. Purificación y caracterización de proteasas de *Pseudomonas fluorescens* y sus efectos sobre las proteínas de la leche. *Arch Latinoameric Nutric*, 2002; 52 (2): 1-13.
18. Brito JRFB, Brito MAVP. *Qualidade higiênica do leite*. Juiz de Fora: Embrapa-CNPGL-ADT; 1998.
19. Lorenzetti DK. Influência do tempo e da temperatura no desenvolvimento de microrganismos psicrotóxicos no leite cru de dois estados da região sul [Tese de doutorado]. Curitiba, Paraná: Universidade Federal do Paraná, 2006. 71 pp.
20. Bueno VFF, Mesquita AJ, Nicolau ES, Oliveira NA, Oliveira JP, Neves RBS et al. Contagem celular somática: relação com a composição centesimal do leite e período do ano no Estado de Goiás. *Cienc Rural*. 2005; 35 (4): 848-54.
21. Brasil. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova e Oficializa o Regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru refrigerado. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 20 set. 2002. Seção 1, Página 13-22*.
22. Machado PF, Pereira AR, Silva LFP, Sarriés GA. Células somáticas no leite em rebanhos brasileiros. *Scientia Agrícola*. 2000; 57 (2): 359-61.
23. Harmon RJ. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *J Dairy Sci*. 1994; 77 (7): 2103-12.
24. Philpot NW, Nickerson SC. *Vencendo a luta contra a mastite*. Piracicaba: Westfalia Surge/Westfalia Landtechnik do Brasil; 2002.

25. Zanela MB, Fischer V, Ribeiro MER, Stumpf Junior W, Zanela C, Marques LT et al. Qualidade do leite em sistemas de produção na região Sul do Rio Grande do Sul. *Pesq Agropec Bras*. 2006; 41 (1): 153-9.
26. Martins PRG, Silva CA, Fischer V, Ribeiro MER, Stumpf Júnior W, Zanela MB. Produção e qualidade do leite na bacia leiteira de Pelotas-RS em diferentes meses do ano. *Cienc Rural*. 2006; 36 (1): 209-14.
27. Pereira AR, Silva LFP, Molon LK, Machado PF, Barancelli G. Efeito do nível de células somáticas sobre os constituintes do leite I – gordura e proteína. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 1999; 36 (3): 429-33.
28. Reis GL, Alves AA, Lana AMQ, Coelho SG, Souza MR, Cerqueira MMOP et al. Procedimentos de coleta de leite cru individual e sua relação com a composição físico-química e a contagem de células somáticas. *Cienc Rural*. 2007; 37 (4): 1134-8.

# Comparação dos resultados de exames preventivos e de rastreamento de câncer de colo do útero em mulheres brasileiras

## Comparative study of the results found in preventive examinations and in uterine cervix cancer screening procedures performed with Brazilian women

RIALA6/1265

Fernanda ARCARO<sup>1\*</sup>, Nicolle de Araújo MACHADO<sup>1</sup>, Paulo Schiavom DUARTE<sup>2</sup>, Patrícia HAAS<sup>1</sup>

\*Endereço para correspondência: Departamento de Análises Clínicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil. e-mail: fearcaro@yahoo.com.br

<sup>1</sup>Departamento de Análises Clínicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

Recebido: 19.07.2009 – Aceito para publicação: 30.03.2010

### RESUMO

Foram avaliados os resultados dos exames preventivos e realizado o rastreamento de câncer de colo de útero, registrados em uma clínica ginecológica de atendimento particular e conveniado, comparando-os com os dados do Sistema Único de Saúde (SUS). Os exames preventivos de colo de útero realizados no período de janeiro de 2005 a julho de 2008, em clínica ginecológica de atendimento particular e conveniado de Florianópolis – SC, foram analisados, por meio de preenchimento de cadastro. Esses dados foram comparados com os resultados dos exames preventivos realizados pelo SUS na cidade de Florianópolis no mesmo período, disponíveis no site do DATASUS. A maioria dos exames realizados na clínica particular e conveniado ao SUS de Florianópolis apresentou resultados dentro da normalidade. Contudo, as amostras registradas no SUS demonstraram menor frequência de alterações escamosas atípicas de significado indeterminado, possivelmente não neoplásico, neoplasia intraepitelial cervical grau 1, 2 e 3, Papilomavírus humano (HPV) e *Candida spp.*, quando comparados com os dados obtidos em clínica de atendimento particular. Os exames citopatológicos realizados pela clínica particular registraram resultados de menor gravidade do que as análises realizadas pelo SUS. A variação nas características observadas pode ter ocorrido em função das diferenças socioeconômicas e da periodicidade do exame.

**Palavras-chave.** câncer de colo de útero, HPV, exame citopatológico.

### ABSTRACT

This study assesses the results from preventives examinations and cervical cancer screenings carried out, between January 2005 and July 2008, at a private gynecological clinic and at an agreed health service located in Florianópolis-SC, whose data were recorded in a reference file. These data were analyzed in parallel with those results from preventive exams performed by the Public Health System of Florianópolis in the same period, available at the DATASUS site. The majority of diagnosis results considered normal were found in patients examined at the private and at the agreed service clinic. Nonetheless, the samples analyzed by SUS (Brazilian public health system) showed a lower frequency of atypical squamous cells of unknown significance, such as cervical intraepithelial neoplasia 1, 2 and 3, Human papillomavirus (HPV) and *Candida spp.* than those reported by the private clinic. It was evidenced that the examinations carried out at the private and agreed gynecological clinic showed less severe cytopathogenic changes as compared to the results recorded by SUS examinations. This variation on cytopathogenicity findings might occur due to socio-economic differences and periodicity of examinations.

**Key words.** uterine cervix cancer, HPV, cytopathologic examination.

## INTRODUÇÃO

O câncer do colo do útero é o segundo tipo de câncer mais comum entre as mulheres, com aproximadamente 500 mil casos novos por ano no mundo, sendo responsável pelo óbito de, aproximadamente, 230 mil mulheres anualmente<sup>1</sup>. O Brasil está entre os doze países com maior taxa de incidência deste câncer<sup>2</sup>.

A flora vaginal normal é formada predominantemente por lactobacilos, porém, podem existir pequenas quantidades de outras bactérias aeróbicas e anaeróbicas. Esses lactobacilos atuam como protetores naturais, produzindo ácido lático, o que permite a manutenção do pH vaginal ideal (aproximadamente 4,5), e peróxido de hidrogênio, o qual inibe o crescimento de microrganismos não produtores de catalase. O desequilíbrio dessa flora resulta em vaginites e/ou vaginoses, que estão associadas ao aumento do risco de complicações ginecológicas, como inflamações da pelve, cervicites, inflamações pós-cirúrgicas, a presença do vírus humano da imunodeficiência (HIV) e lesões intraepiteliais cervicais<sup>3,4</sup>. Muitos estudos têm sido realizados para verificar a correlação entre a alteração da microflora vaginal e o desenvolvimento do câncer do colo do útero, visto que vaginites e vaginoses facilitam a infecção da paciente pelo Papilomavírus humano (HPV)<sup>5,6</sup>, que é uma condição diretamente relacionada ao surgimento dessa neoplasia<sup>7</sup>.

O HPV é um vírus DNA que infecta o epitélio e possui mais de 100 genótipos, que apresentam tropismo e potencial oncogênico distintos<sup>8</sup>. A infecção pelo HPV é muito comum em mulheres, após o início da vida sexual, obtendo um pico de contaminação em mulheres em torno dos 20 anos a 24 anos de idade. Quando a infecção HPV de alto risco persiste, o controle do ciclo celular pode ser perturbado, resultando em neoplasias intraepiteliais cervicais<sup>9</sup>. Estudos epidemiológicos têm mostrado que apenas uma pequena fração das mulheres infectadas por tipos oncogênicos de HPV irá progredir para lesão intraepitelial de alto risco e câncer do colo do útero, demonstrando que o HPV é necessário para o desenvolvimento dessa neoplasia, porém não é condição única, e portanto, outros fatores devem ser associados para que ocorra a evolução dessa malignidade<sup>10</sup>. Dentre esses fatores, pode-se citar o uso de contraceptivos orais por mais de 5 anos, que aumentam em até 4 vezes o risco de câncer de colo de útero entre as mulheres infectadas pelo HPV<sup>11</sup>, o tabagismo, que aumenta em até 3 vezes o risco; a multiplicidade de parceiros sexuais, a multiparidade e a iniciação sexual precoce<sup>12</sup>.

O tabagismo é um importante fator de risco para o desenvolvimento de câncer, e a incidência para diversos tipos de neoplasias no Brasil está aumentando especialmente entre as mulheres, devido a uma difusão do tabagismo pelo sexo feminino<sup>13</sup>. Esse hábito contribui diretamente para a ocorrência de câncer de pulmão, laringe, esôfago, boca e faringe principalmente, porém, também aumentam a probabilidade de desenvolver outros tipos de carcinomas. Mulheres tabagistas apresentam risco de desenvolver neoplasia intraepitelial 2,8 vezes maior quando comparadas às não fumantes<sup>14</sup>.

A principal estratégia utilizada em programas de rastreamento voltados ao controle do câncer do colo do útero constitui no teste Papanicolaou, o qual é um exame rápido e permite o diagnóstico da lesão na fase intraepitelial em mulheres assintomáticas, o que é possível pela sua lenta evolução<sup>15,16</sup>. A implantação desse método possibilita uma redução de cerca de 80% da mortalidade por esta neoplasia através do rastreamento e tratamento das lesões precursoras com alto potencial de malignidade ou carcinoma *in situ*<sup>7</sup>. Essa redução é possível, não só devido a eficácia do método, mas também à existência de profissionais capacitados para sua execução, ampla abrangência do público alvo e viabilidade de custos e recursos<sup>9,17</sup>. A maior incidência dessa neoplasia encontra-se entre mulheres na faixa etária de 40 anos a 60 anos de idade, e apenas uma pequena porcentagem ocorre antes dos 30 anos. No Brasil, apesar de ser um dos primeiros países onde foi implantado o teste Papanicolaou, a doença continua a ser um grave problema de saúde pública. Isto porque somente 30% das mulheres brasileiras submetem-se ao exame citopatológico pelo menos três vezes na vida, o que resulta em diagnósticos já em fase avançada em 70% dos casos<sup>18</sup>.

O objetivo deste estudo foi descrever a influência de fatores comportamentais na prevalência do câncer de colo de útero na população feminina da cidade de Florianópolis, SC, por meio da análise de informações referentes a 387 mulheres registradas em uma clínica ginecológica que atende convênios médicos e particulares, entre o período de janeiro de 2005 a julho de 2008, fazendo um comparativo com os dados do DATASUS no mesmo município.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizada uma análise dos exames preventivos de colo uterino, referentes a 387 mulheres, atendidas em uma clínica especializada em ginecologia e obstetrícia do

município de Florianópolis, SC. Estas pacientes realizaram este exame por convênios médicos ou atendimento particular. Através do preenchimento de um cadastro, foram avaliados variáveis como tabagismo, uso de anticoncepcionais orais, número de parceiros sexuais, doenças sexualmente transmissíveis, critérios inflamatórios, lesões de baixo e alto grau e neoplasias. As informações foram coletadas entre o período de janeiro de 2005 a julho de 2008, fazendo um paralelo de dados com o atendimento de mulheres pelo SUS na cidade de Florianópolis no período de janeiro de 2005 a abril de 2006, dados disponíveis no site do DATASUS.

Tanto na clínica ginecológica como no SUS, a coleta do material para realização do Papanicolaou consiste no preenchimento de um formulário com informações da paciente, como data da última menstruação, número de partos, uso de contraceptivo oral. Para a coleta, é introduzido um espéculo vaginal e é realizada a descamação, ou esfoliação da superfície do colo e da vagina com auxílio de uma espátula de madeira (espátula de Ayre), em movimento rotatório para coletar material ectocervical. Com o auxílio de uma escova endocervical e movimentos rotatórios, coleta-se o material da endocérvice, abrangendo sempre a região da junção escamos colunar (JEC). Posteriormente é realizado o esfregaço, com boa espessura e uniformidade, em lâmina de vidro e fixado com etanol 96° ou polietilenoglicol<sup>19</sup>. O ideal seria a associação do preventivo com a captura híbrida para minimizar os falsos negativos. No entanto, o SUS, até o momento, não disponibiliza este exame, sendo que na clínica particular é solicitado com frequência.

## RESULTADOS

A população de estudo foi constituída de 387 mulheres, que apresentavam idade entre 12 anos e 69 anos de idade (média de 31,9 anos). A população atendida pelo SUS no município de Florianópolis, durante o período avaliado, variou de 11 anos a 65 anos de idade (média de 37,8 anos)<sup>20</sup>, a qual é superior à idade média da população de estudo da clínica ginecológica.

A Tabela 1. demonstra que na população de estudo, 235 casos (61%) apresentavam alterações citológicas como inflamação, alterações escamosas atípicas de significado indeterminado possivelmente não neoplásico, Neoplasia Intraepitelial Cervical Grau 1 (NIC 1), Neoplasia Intraepitelial Cervical Grau 2 (NIC 2), Neoplasia Intraepitelial Cervical Grau 3 (NIC 3), Carcinoma *in situ* ou carcinoma invasivo, correspondendo essas alterações a 61% da população. No SUS, a população que apresentava essas

alterações citológicas, foi de 28.644 (93%), o que demonstra diferença no resultado dos exames entre a população estudada na clínica e os resultados obtidos no DATASUS.

**Tabela 1.** Alterações citológicas nos preventivos realizados na clínica ginecológica e no SUS da cidade de Florianópolis

	Clínica Ginecológica (Jan 2005 a jul 2008)	SUS (Jan 2005 a abr 2006)
Número de pacientes avaliadas	387	30.800
Alterações citológicas	61%	93%
Sem alterações citológicas	39%	7%

**Tabela 2.** Agentes patológicos, presentes nos exames de preventivo registrados na clínica ginecológica de atendimento particular e conveniado de Florianópolis, SC, no período de Janeiro 2005 a julho de 2008

	Número de casos	% dos casos
<b>Alterações citológicas</b>		
NCM <sup>a</sup>	194	50,13
Inflamação	213	55,04
NIC 1 <sup>b</sup>	9	2,33
NIC 2 <sup>c</sup>	3	0,78
NIC 3 <sup>d</sup>	1	0,26
ASC-US <sup>e</sup>	9	2,33
<b>Agentes patológicos</b>		
HPV <sup>f</sup>	22	5,68
<i>Trichomonas vaginalis</i>	2	0,52
Cândida sp	74	19,12
Clamídia	3	0,78
Herpes vírus	2	0,52
<i>Gardenerella vaginalis</i>	49	12,66
Bact. Cocobacilares	3	0,78
<b>Total de casos</b>	<b>387</b>	

<sup>a</sup>Nenhum caso maligno, <sup>b</sup>Neoplasia intra-epitelial Cervical Grau 1, <sup>c</sup>Neoplasia intraepitelial Cervical Grau 2, <sup>d</sup>Neoplasia intraepitelial Cervical Grau 3, <sup>e</sup>Alterações escamosas atípicas de significado indeterminado possivelmente não neoplásico, <sup>f</sup>Papiloma vírus humano



Na clínica ginecológica, das 387 mulheres avaliadas, 180 (46,5%) declararam ter parceiros fixos, o que reduz em até 3,8 vezes a chance de desenvolver uma neoplasia intraepitelial quando comparada às mulheres que relatam ter 4 ou mais parceiros sexuais<sup>14</sup>. Em relação ao tabagismo, 31 (8%) mulheres relataram hábito de fumar e 337 (87%) faziam o uso de anticoncepcionais orais. Os resultados dos exames preventivos da clínica ginecológica e do SUS, na cidade de Florianópolis, estão apresentados na tabela 2.

Avaliando o período de janeiro de 2005 a abril de 2006, o Sistema Único de Saúde (SUS) do estado de Santa Catarina registrou 601.515 coletas de amostras para realizar o exame citopatológico cérvicovaginal, sendo que 30.800 amostras foram na cidade de Florianópolis, SC (Tabela 2). A faixa etária predominante das pacientes que realizaram esse exame foi de 20 anos a 34 anos de idade. Destas, 0,78% apresentaram-se como nenhum caso maligno (NCM); 91,93% com inflamação; 0,44% células escamosas atípicas de significado indeterminado, possivelmente não neoplásicas;

**Tabela 3.** Agentes patológicos presentes nos exames preventivos registrados no DATASUS na cidade de Florianópolis, SC, no período de janeiro de 2005 a abril de 2006

	Número de casos	% dos casos
<b>Alterações citológicas</b>		
NCM <sup>a</sup>	243	0,79
Inflamação	28.315	91,93
NIC 1 <sup>b</sup>	136	0,44
NIC 2 <sup>c</sup>	53	0,17
NIC 3 <sup>d</sup>	34	0,11
ASC-US <sup>e</sup>	136	0,442
<b>Agentes patológicos</b>		
HPV <sup>f</sup>	58	0,19
<i>Trichomonas vaginalis</i>	163	0,53
Cândida sp	524	1,70
Clamidia	3	0,01
Herpes vírus	3	0,01
<i>Gardenerella vaginalis</i>	3.537	11,48
Bact. Cocobacilares	35.290	114,578
<b>Total de casos</b>	<b>30.800</b>	

<sup>a</sup>Nenhum caso maligno, <sup>b</sup>Neoplasia intraepitelial Cervical Grau 1, <sup>c</sup>Neoplasia intraepitelial Cervical Grau 2, <sup>d</sup>Neoplasia intraepitelial Cervical Grau 3, <sup>e</sup>Alterações escamosas atípicas de significado indeterminado possivelmente não neoplásico, <sup>f</sup>Papiloma vírus humano

0,44% como NIC 1; 0,17% NIC 2; 0,11% NIC 3; 0,01% carcinoma invasivo escamoso e 1 caso de adenocarcinoma invasivo. A presença de HPV foi relatada em 0,19% das amostras, e a microflora predominante foram Lactobacilos, bacilos e cocos, porém também foram relatados a presença de Bacilos supracitoplasmáticos (sugestivos de *Gardnerella/Mobiluncus*) (11,48%); *Candida* sp. (1,7%); *Trichomonas vaginalis* (0,53%); efeito citopático compatível com vírus do grupo Herpes (0,01%) e alterações sugestivas de *Clamidia* (0,01%)<sup>20</sup>.

## DISCUSSÃO

Comparando os dados dos preventivos provenientes da clínica privada com os dados de pacientes atendidas pelo SUS, podemos observar um discreto aumento dos resultados positivos da clínica em relação ao SUS. A grande maioria dos agentes patológicos e atípias celulares, foi observada na população pesquisada na clínica, sendo que apenas os dados de inflamação e *Trichomonas vaginalis* apresentaram maior prevalência nos dados do SUS.

Um estudo realizado em uma clínica citológica em Ibadan, na Nigéria, a ocorrência de Bacilos supracitoplasmáticos (sugestivos de *Gardnerella/Mobiluncus*) foi relatada em 9,8% dos exames, *Trichomonas vaginalis* em 2,5% e *Candida albicans* em 2,2%<sup>21</sup>. Já em um laboratório de Belo Horizonte (Brasil), a frequência relatada desses agentes foi 14,1%, 1,1% e 6,9% respectivamente<sup>22</sup>, valores discretamente inferiores aos obtidos em uma pesquisa realizada no Chile, que relata *Candida* em 16,8%, Bacilos supracitoplasmáticos (sugestivos de *Gardnerella/Mobiluncus*) em 11,1% e *Trichomonas* em 1,6%<sup>23</sup>. Em contrapartida, provavelmente devido ao baixo poder socioeconômico das pacientes, em uma clínica citológica em Nairobi, no Kenia, a ocorrência desses agentes foi de 75% para bacilos supracitoplasmáticos, 34% para *Trichomonas vaginalis* e 24% para *Candida* sp.<sup>24</sup>. A frequência de *Candida* nos exames citopatológicos é muito variável<sup>25</sup>, sendo que oscila entre 6,3 e 22,2% na maioria dos estudos presentes na literatura<sup>26,27</sup>. Os dados estão de acordo com os resultados obtidos pela pesquisa, porém difere dos resultados obtidos pelo SUS no município de Florianópolis, que obteve valor inferior.

Em relação aos bacilos supracitoplasmáticos, a maioria das pesquisas relata ocorrência em 17,3% a 38,1% dos exames<sup>26,28</sup>, valores superiores aos obtidos no presente trabalho tanto no SUS quanto na clínica privada.

O diagnóstico de *Trichomonas vaginalis* foi relatado em 0,5% das amostras, valor que está em concordância com os valores obtidos na literatura entre 0,18%<sup>27</sup> e 3,4%<sup>29</sup>. Irie et al<sup>30</sup> obtiveram frequência de HPV pelo teste papanicolaou de 2,7 % e Chiuchetta et al<sup>27</sup> de 1,6%, resultados inferiores aos deste trabalho (5,7%), porém superiores ao relatado pelo SUS em Florianópolis (0,19%).

É necessário destacar que o número de pacientes que realiza o exame citopatológico periodicamente, seja em clínicas particulares, convênios médicos ou pelo SUS, ainda é insatisfatório, fato que inviabiliza uma redução ainda mais significativa dos casos de câncer de colo uterino. Segundo o Instituto Nacional do Câncer, o exame preventivo deveria ser realizado em mulheres de 25 anos a 60 anos de idade, ou mulheres que já tenham atividade sexual, mesmo antes desta faixa de idade, uma vez por ano e, caso a paciente apresente resultado negativo por 2 anos consecutivos, é indicado que o exame passe a ser realizado a cada 3 anos<sup>7</sup>.

Estudos relatam que o câncer invasivo é mais frequente em mulheres após os 40 anos de idade. Cerca de 30% a 71% dos carcinomas *in situ* não tratados evoluem para invasão em 10 anos. Então, a maioria dos diagnósticos de neoplasias pré-invasivas se faz em torno dos 20 aos 30 anos de idade, que representa a faixa etária com mulheres no ápice da vida reprodutiva, sendo que, justamente nesta época, há falha do sistema de saúde em oferecer programas preventivos eficazes<sup>31</sup>.

A não realização desse exame pode ocorrer devido a diversas causas como falta de conhecimento quanto aos fatores facilitadores ou causadores do câncer de colo uterino: desconhecimento quanto à existência deste tipo de exame e/ou de sua utilidade; concepção de que câncer é uma doença fatal e que, portanto, não adianta realizar o exame para prevenção ou diagnóstico precoce do mesmo; dificuldade na relação médico-paciente; oposição do companheiro/marido à realização deste tipo de exame; rejeição por parte da mulher por se tratar de um exame pélvico; longo tempo de espera até a obtenção do resultado do exame; e ideia de que se trata de um exame de custo elevado<sup>32,33</sup>.

Os resultados dentro da normalidade dos exames preventivos registrados em uma clínica ginecológica de atendimento particular e conveniado de Florianópolis foram, aproximadamente, 64 vezes maior e o índice de inflamação foi 1,7 vezes menor que os resultados apresentados pelo SUS nesse município. Entretanto, as amostras analisadas através do SUS demonstraram uma menor incidência de células escamosas atípicas de

significado indeterminado, possivelmente não neoplásicas; NIC 1 e 2 (4,7 a 5,2 vezes menor) e NIC 3 (1,8 vezes menor) em relação à clínica privada. Essa diferença significativa pode ocorrer devido a diversos fatores, como por exemplo, uma coleta não representativa da JEC, a qual é essencial para que a amostra seja considerada satisfatória para a análise, pois é nessa região que ocorre o desenvolvimento de neoplasias intraepiteliais cervical e carcinomas<sup>34</sup>. A avaliação citológica também pode ser prejudicada quando ocorre sangramento durante a coleta<sup>35</sup>.

O aumento dos casos positivos em mulheres atendidas pelo SUS pode ocorrer decorrente ao menor nível socioeconômico dessas pacientes, falta de informações sobre a importância do exame, dificuldade de acesso a consultas médicas, entre outros fatores que resultariam em uma realização não periódica do exame Papanicolaou, o que dificulta um acompanhamento e diagnóstico precoce de alguma lesão<sup>36</sup>.

Dentre os agentes causadores de vaginites e vaginoses, o que apresentou maior variação foi a *Candida spp.*, cuja prevalência foi aproximadamente 11,2 vezes menor nas amostras avaliadas através do SUS.

A ocorrência de resultados positivos para HPV foi 30 vezes maior na clínica ginecológica em relação ao SUS. Esse aumento pode ser devido à utilização de métodos com maior sensibilidade pela clínica, como por exemplo, a captura híbrida, ou a um possível aumento do risco de exposição ao HPV por mulheres com maiores níveis socioeconômicos. É importante salientar que, para essas pacientes que tem acesso à captura híbrida, o que favorece o diagnóstico, minimizando assim, os falsos negativos nessa população, conseqüentemente, a possibilidade de um número mais elevado de ocorrência do HPV. O exame Papanicolaou é o método de rotina para detecção de HPV pelo SUS. Porém, esse exame apresenta algumas limitações inerentes ao método, já que detecta alterações provocadas pelo HPV e não o vírus propriamente dito<sup>37</sup>. O índice de citologia falso-negativo é muito variável e na maioria dos estudos tem sido estimado entre 20 e 40%<sup>38</sup>. Além disso, o método apresenta uma variação dos resultados interobservador, o que alerta para o uso de outros métodos complementares de diagnóstico<sup>39</sup>.

Em contrapartida, apenas foi detectado carcinoma invasivo escamoso e adenocarcinoma invasivo em amostra analisada pelo SUS. Porém a amostragem obtida pelo DATASUS é consideravelmente maior àquela obtida na clínica de atendimento particular e conveniado, o que poderia justificar o dado obtido.

O uso de método contraceptivo hormonal foi referido por 60% das mulheres envolvidas na pesquisa. Alguns estudos têm demonstrado que o uso de contraceptivo oral (ACO) é um fator de risco para infecção por HPV devido a alterações hormonais que levariam a imunomodulação, o que resultaria em um aumento da susceptibilidade à infecção pelo HPV<sup>40</sup>. Além disso, existe a possibilidade das usuárias de ACO terem maior liberdade sexual, com maior número de parceiros sexuais, fato que também influenciaria na maior incidência de infecção pelo HPV por essas mulheres<sup>41</sup>. Dados da literatura relatam que uso de anticoncepcional oral por longo tempo (8 anos ou mais) está associado a um aumento de 2,2 vezes de desenvolvimento de carcinoma cervical<sup>14</sup>, pois o contraceptivo oral atuaria como cofator, juntamente com alterações genéticas e alguns tipos de HPV, na transformação de células e na progressão das lesões de baixo para alto grau<sup>42</sup>. Portanto, é necessária a avaliação de qual o melhor método anticoncepcional para cada paciente de modo individualizado, para que esse fator de risco possa ser minimizado<sup>43</sup>.

A cidade de Florianópolis está entre as três capitais brasileiras com maior incidência de mulheres tabagistas, em torno de 19%, índice um pouco mais elevado em relação à média mundial que é de 12% das mulheres<sup>12</sup>. Porém, na pesquisa, somente 8% da população analisada na clínica relatou esse hábito.

As vacinas apresentam efeito profilático sobre o HPV. As mesmas são constituídas pelo vírus recombinante monoinfeccioso, como a partícula L1 do capsídeo, induzindo a ativação do sistema imune pela fagocitose das partículas e formação de anticorpo contra o tipo específico de partícula do capsídeo viral recombinante. Assim, a vacina bivalente induz a formação de anticorpo contra HPV 16 e 18 (responsáveis por 70% dos casos de câncer cervical), enquanto que a quadrivalente leva a produção de anticorpo anti- HPV 6, 11, 16 e 18 (responsáveis por 90% dos casos de câncer cervical). Desta forma, supõe-se que a vacina quadrivalente evite lesões de colo de útero classificadas como Neoplasia Intraepitelial Cervical Grau 2 e 3, câncer de colo de útero e verrugas genitais, sendo que este último não é evitado pela vacina bivalente<sup>44</sup>. Cabe destacar, que no presente estudo, nenhuma paciente utilizou a vacina para HPV.

## CONCLUSÃO

Pode-se observar que os resultados dos exames para prevenção e rastreamento de câncer de colo do útero

realizados em clínica particular são diferentes daqueles realizados no Sistema Único de Saúde. Essa diferença pode ocorrer devido a diversos fatores, como condição socioeconômica, capacitação dos profissionais envolvidos, diferentes metodologias empregadas na análise, frequência de busca de atendimento médico e de realização do exame.

## REFERÊNCIAS

1. WHO – World Health Organization [homepage da Internet]. Information Centre on Human Papilloma Virus (HPV) and Cervical Câncer [2008 dez 10]. Disponível em: <http://www.who.int/hpvcentre/statistics/en/>.
2. Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Teppo L, Thomas DB. Cancer incidence in five continents Vol. VIII. IARC Scientific Publications No. 155. Lyon: International Agency for Research on Câncer, 2002.
3. Latz-Christensen JJ, Sundstrom E, Larsson PG. Bacterial vaginosis and cervical intraepithelial neoplasia. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1995; 74(1): 67-70.
4. Sweet R. Gynecologic Conditions and Bacterial Vaginosis: Implications for the Non-Pregnant Patient. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2000; 8(3-4): 184-90.
5. Munoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol*. 2000; 19(1-2): 1-5.
6. Schiffman M, Kjaer SK. Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003; (31): 14-9.
7. INCA – Instituto Nacional do Câncer [homepage da Internet]. Estimativa 2008: Incidência de câncer. [2008 out 20]. Disponível em: [http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/index.asp?link=conteudo\\_view.asp&ID=5](http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=5).
8. Widyce LE, Moscicki AB. Updated Guidelines for Papanicolaou Tests, Colposcopy, and Human Papillomavirus Testing in Adolescents. *J Adolesc Health*. 2008; 43(4 Suppl): S41-51.
9. Cuzick J, Arbyn M, Sankaranarayanan R, Tsu V, Ronco G, Mayrand MH et al. Overview of Human Papillomavirus-Based and Other Novel Options for Cervical Cancer Screening in Developed and Developing Countries. *Vaccine*. 2008; 26 (10 Suppl): K29-41.
10. Castellsagué X, Bosch FX, Muñoz N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res*. 2002; 89(2): 191-9.
11. Moreno V, Bosch FX, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV, Walboomers JM et al. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *Lancet*. 2002; 359(9312): 1085-92.
12. INCA – Instituto Nacional do Câncer [homepage da Internet]. Controle do tabagismo no Brasil. [2008 nov 20]. Disponível em: [http://www.inca.gov.br/tabagismo/31maio2004/tabag\\_br\\_folheto\\_04.pdf](http://www.inca.gov.br/tabagismo/31maio2004/tabag_br_folheto_04.pdf).
13. Guerra MR, Gallo CV, Mendonça GA. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. *Rev Bras Cancerol*. 2005; 51(3): 227-34.

14. Pedrosa ML. Perfil epidemiológico de mulheres portadoras de atipias escamosas de significado indeterminado atendidas pelo programa de controle do câncer de colo uterino no município do rio de janeiro. [tese] Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2003.
15. Brenna SMF, Hardy EE, Zeferino LC, Namura I. Conhecimento, atitude e prática do exame de Papanicolaou em mulheres com câncer de colo uterino. *Cad Saúde Pública* 2001; 17: 909-14.
16. Martins LFL, Thuler LCS, Valente JG. Cobertura do exame de Papanicolaou no Brasil e seus determinantes: uma revisão sistemática da literatura. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2005; 27(8): 485-92.
17. Solomon D. Role of Triage Testing in Cervical Cancer Screening. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003; (31): 97-101.
18. Leal EAS, Leal Júnior OS, Guimarães MH, Vitoriano MN, Nascimento TL, Costa OL. Lesões precursoras do câncer de colo em mulheres adolescentes e adultas jovens do município de Rio Branco AC. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2003; 25(2): 81-6.
19. INCA – Instituto Nacional do Câncer [homepage da internet]. Câncer do colo do útero [2009 jan 17]. Disponível em: [http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=326](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=326).
20. Ministério da Saúde. DATASUS [homepage da Internet]. Informações estatísticas: exame citopatológico cérvico-vaginal e microflora. [2008 out 20]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?siscolo/DEF/todos/SCCCOLO.def>.
21. Konje JC, Otolorin EO, Ogunniyi JO, Obisesan KA, Ladipo AO. The prevalence of *Gardnerella vaginalis*, *Trichomonas vaginalis* and *Candida albicans* in the cytology clinic at Ibadan, Nigeria. *Afr J Med Med Sci*. 1991; 20(1): 29-34.
22. Lara BMR, Fernandes PA, Miranda D. Diagnósticos cérvico-vaginais em laboratório de médio porte de Belo Horizonte MG. *RBAC* 1999; 31: 37-40.
23. Oyarzún EE, Poblete AL, Montiel FA, Gutierrez PH. Vaginosis bacteriana: diagnostico y prevalencia. *Rev Chil Obstet Ginecol*. 1996; 61(1): 28-33.
24. Mirza NB, Nsanze H, D'Costa LJ, Piot P. Microbiology of vaginal discharge in Nairobi, Kenya. *Br J Vener Dis*. 1983; 59(3): 186-8.
25. Silva Filho AM, Longatto Filho A. Colo uterino & vagina – processos inflamatórios. Rio de Janeiro: Revinter, 2000.
26. Murta EFC, Souza MAH, Júnior EA, Adad SJ. Incidence of *Gardnerella vaginalis*, *Candida sp* and human Papillomavirus in cytological smears. *Sao Paulo Med J*. 2000; 118(4): 105-8.
27. Chiuchetta GIR, Ruggeri LS, Piva S, Consolaro MEL. Estudo das inflamações e infecções cérvico-vaginais diagnosticadas pela citologia. *Arq. Cien. Saúde UNIPAR*, 2002; 6(2): 123-8.
28. Avilés AGP, Zaragoza CO, Barrera LT, Vásquez RM, Rosas RP. Es útil la tinción de papanicolaou como auxiliar del diagnostico de algunas infecciones de transmisión sexual? *Atenc Prim*. 2001; 27(4): 222-6.
29. Adad SJ, Lima RV, Sawan ZTE, Silva MLG, Souza MAH, Saldanha JC et al. Frequency of *Trichomonas vaginalis*, *Candida sp* and *Gardnerella vaginalis* in cervical-vaginal smears in four different decades. *Sao Paulo Med J*. 2001; 119(6): 200-5.
30. Irie MMT, Suzuki LE, Yoshida CS, Lopes DC, Consolaro MEL. Avaliação dos critérios morfológicos clássicos e não clássicos de HPV no diagnóstico colpocitológico. *Arq Cien Saúde UNIPAR*, 2001; 5(3): 259-66.
31. Murta EFC et al. Câncer do Colo Uterino: Correlação com o Início da atividade Sexual e Paridade. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 1999; 21(9): 555-9.
32. Lazcano-Ponce EC, Castro R, Allen B, Najera P, Alonso-de-Ruiz PA & Hernandez-Avila M. Barriers to early detection of cervical-uterine cancer in Mexico. *J Womens Health*. 1999; 8(3): 399-408.
33. Pinho AA, França Junior I, Schraiber LB, D'Oliveira AF. Cobertura e motivos para a realização ou não do teste de Papanicolaou no Município de São Paulo. *Cad Saúde Pública* 2003; 19(Suppl 2): 303-13.
34. IARC – International agency for research on cancer. Colposcopy and Treatment of Cervical Intraepithelial Neoplasia. A Beginner's Manual. Lyon, 2003.
35. Marchand L, Mundt, M, Klein G, Agarwal SC. Optimal collection technique and devices for a quality pap smear. *WMJ*. 2005; 104(6): 51-5.
36. Dias-da-Costa JS, Olinto MTA, Gigante DP, Menezes AMB, Macedo S, Borba AT et al. Cobertura do exame citopatológico na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. *Cad Saúde Pública* 2003; 19(1): 191-7.
37. Kaneshima EN, Suzuki LE, Irie MMT et al. Importância da aplicação de critérios morfológicos não clássicos para o diagnóstico citopatológico de Papilomavírus humano (HPV) previamente detectado por PCR. *Acta Bioquím Clín Latinoam*. 2005; 39(1): 61-8.
38. Lorincz AT, Richart RM. Human Papillomavirus DNA testing as an adjunct to cytology in cervical screening programs. *Arch Pathol Lab Med*. 2003; 127(8): 959-68.
39. Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst*. 1995; 87(11): 796-802.
40. Murta EFC, Souza MAH, Lombardi W, Borges LS. Aspectos epidemiológicos da infecção pelo papilomavírus humano. *J Bras Ginecol*, 1997; 107: 95-9.
41. Murta EFC, Souza MAH, Júnior EA, Adad SJ. Infecção pelo Papilomavírus Humano em Adolescentes: Relação com o Método Anticoncepcional, Gravidez, Fumo e Achados Citológicos. *Rev Bras Gineco Obstet*. 2001; 23(4).
42. Pater A, Bayatpour M, Pater MM. Oncogenic transformation by human papillomavirus type 16 deoxyribonucleic acid in the presence of progesterone or progestins from oral contraceptives. *Am J Obstet Gynecol*. 1990; 162(4): 1099-103.
43. Wannmacher L. Anticoncepcionais orais: o que há de novo. *Uso racional de medicamentos: Temas selecionados*. 2003; 1(1): 1-6.
44. McIntosh J, Sturpe DA, Khanna N. Human papillomavirus vaccine and cervical cancer prevention: Practice and policy implications for pharmacists. *J Am Pharm Assoc* (2003). 2008; 48(1): 1-13; quiz e14-7.

## Epidemiological surveillance and susceptibility of *Staphylococcus aureus* among healthcare workers at a reference hospital: preliminary assessment

### Vigilância epidemiológica e susceptibilidade de *Staphylococcus aureus* em profissionais de saúde de um hospital de referência: Uma avaliação inicial

RIALA6/1266

Eduardo Caetano Brandão Ferreira da SILVA<sup>1,2\*</sup>, Maria Amélia Vieira MACIEL<sup>1</sup>, Fábio Lopes de MELO<sup>2</sup>, Ana Catarina de Souza LOPES<sup>1</sup>, Ivanize da Silva ACA<sup>1</sup>

\*Mail Address: Department of Parasitology, Aggeu Magalhães Research Center, Moraes Rego Ave., s/n. CEP-50670-420, Recife-PE, Brazil. E-mail: brandaoe@cpqam.fiocruz.br

<sup>1</sup>Department of Tropical Medicine, Federal University of Pernambuco

<sup>2</sup>Department of Parasitology - Aggeu Magalhães Research Center - Fiocruz

Recebido: 14.10.2009 – Aceito para publicação: 10.03.2010

#### RESUMO

Infecção/colonização por microrganismos patogênicos em profissionais de saúde (PS) representa uma potencial fonte de transmissão para os pacientes, colegas de trabalho, familiares e comunidade. No presente estudo foi avaliada a prevalência da colonização por *Staphylococcus aureus* em PS de um hospital de referência do Recife, no período de março e julho de 2007, e o perfil de susceptibilidade das cepas isoladas às drogas antimicrobianas. Foi realizado um estudo transversal, no qual os PS de salas cirúrgicas, unidades de terapia intensiva (UTIs), hemodiálise e unidades de nefrologia foram avaliados. O isolamento e a identificação de *S. aureus* foram efetuados de acordo com as orientações do CLSI. O perfil de susceptibilidade da bactéria aos antimicrobianos meticilina e vancomicina foi determinado por meio de técnica de difusão em disco associada à técnica de concentração inibitória mínima (E-test). A prevalência de colonização por *S. aureus* entre os PS foi de 25,7%. Entre as cepas isoladas de *S. aureus*, os maiores percentuais de resistência foram observados frente à penicilina (91,4%), eritromicina (43,1%) e cefoxitina (17,2%). Todos os isolados foram sensíveis à vancomicina. Três cepas foram identificadas como resistentes à meticilina, as quais foram isoladas de auxiliares de enfermagem. Sugere-se que avaliações contínuas sejam realizadas para melhor compreensão da dinâmica de colonização/infecção e redução dos riscos de infecção por esse microrganismo.

**Palavras-chave.** *Staphylococcus aureus*, Profissionais de Saúde, Epidemiologia.

#### ABSTRACT

Healthcare professionals (HCPs) are liable to pathogenic microorganisms infection/colonization, which plays an important role as a potential source of transmission to patients, coworkers, relatives and communities. The present study evaluates the prevalence of *Staphylococcus aureus* colonization in HCPs who work at a reference hospital in Recife, PE, and the isolates profiles of susceptibility to antimicrobial drugs. A cross-sectional study was undertaken, and HCPs from operating rooms, intensive care units (ICUs), hemodialysis and nephrology units of the Clinical Hospital of Pernambuco were evaluated. *S. aureus* isolates were identified by standard methods recommended by CLSI and the susceptibility to methicillin and vancomycin was determined by the minimum inhibitory concentration technique (E-test). The prevalence of *S. aureus* observed among HCPs was 25.7%. Among *S. aureus* strains isolates, the highest percentage of antibiotic resistance was observed in penicillin (91.4%), erythromycin (43.1%) and cefoxitin (17.2%). All of the strains were sensitive to vancomycin. Three *S. aureus* methicillin-resistant (MRSA) strains were identified, which were isolated from the nursing aides staff. The prevalence of MRSA found in the present study was lower than those reported elsewhere. These findings suggest that a continuous assessment should be performed for better understanding the dynamics of *S. aureus* colonization/infection in order to reduce the risks of infection by this microorganism.

**Key words.** *Staphylococcus aureus*, Health Care Workers, Epidemiology.

## INTRODUCTION

*Staphylococcus aureus* infections are associated to considerable morbidity and mortality and represent a serious public health problem. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a ubiquitous pathogen that gives rise to community infection and hospital environment<sup>1</sup>. The glycopeptide agent vancomycin is the drug of choice for the treatment of life-threatening infections caused by multidrug-resistant MRSA strains. However, the threat of developing resistance to vancomycin, the only antimicrobial agent effective against MRSA, is alarming<sup>2</sup>.

An important factor in the context of nosocomial infections is the chain of transmission within the hospital environment. Studies point out that the transference of microorganisms among individuals who move around hospital environments (patients and professionals) represents a risk factor for the development of these infections by the patients. Health care workers (HCWs) constitute an important reservoir of *S. aureus* and some studies have reported that the rate of nasal carriage of *S. aureus* ranges from 16.8% to 56.1% among them<sup>3</sup>.

By considering the relevance of *S. aureus* as an important pathogen associated with nosocomial infections and related to the colonization of health staff, this paper aims at evaluating the prevalence of colonization by *S. aureus* in HCWs of the Clinical Hospital of the Federal University of Pernambuco (UFPE) and determining the susceptibility to antibiotics, including methicillin and vancomycin.

## METHODS

A cross-sectional study evaluating 202 HCWs from operating rooms, intensive care units (ICUs), hemodialysis and nephrology units of the Clinical Hospital of Pernambuco in the period between March and July 2007. This study was approved by the Ethics Committee on Research from the UFPE (CAAE # 0275.0.172.000-06). The data collected were stored and analyzed using version 6.04 of the Epi Info software package (Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA). Statistical comparisons were made using odds ratios, whenever appropriate. A p value of < 0.05 was considered an indicative of a statistically significant difference.

The biological samples were collected by inserting swabs into both anterior nares and wiped in both hands. They were taken to the laboratory in glass tubes containing Brain Heart Infusion (BHI) and were placed onto agar sheep blood at 5% and incubated at 35°C for 24 hours. After this period, colonies suspected of being *S. aureus* were identified using the Gram stain, catalase, mannitol, DNAase test and coagulase proof in test-tube and the reading of the latter one occurred after 4 and 24 hours. The antimicrobial susceptibility was performed according to CLSI guidelines by using the diffusion method (Kirby Bauer), with the following antimicrobial impregnated disks<sup>4,5</sup>: penicillin (10µg), oxacillin (1µg), clindamycin (2µg), sulfamethoxazole/trimethoprim (25µg), cloranphenicol (30µg), gentamicin (10µg), mupirocin (5µg), cephoxitin (30µg), linezolid (30µg), vancomycin (30µg), teicoplanin (30µg), rifampicin (5µg) and erythromycin (15µg). The minimum inhibitory concentration to methicillin and vancomycin estimated by the E-test method (Probac Brazil®) was defined as gold standard.

## RESULTS

The prevalence of colonization by *S. aureus* was 25.7% (52/202). Among the 52 colonized individuals, 13.6% presented exclusive colonization on the hands, 72.8% presented exclusive colonization in the nasal cavity, and 13.6% of the individuals presented colonization in both anatomic sites evaluated.

In this study, female individuals are more colonized as compared to male. Nevertheless, this difference is not statistically significant. In regards to the age-group, there could be observed that individuals belonging to the age-group 20-28 years old, which is the group with higher prevalence of colonization (33.9%), present approximately, 3.5 times greater probability of being colonized (IC 95% 1.25-10.20) as compared to the age-group that present lower prevalence, which is made of individuals with ages between 33 and 44 (12.7%) (Table 1).

From the health staff studied, 3.5% (3/202) were colonized by Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), two nursing aides from neonatal ICUs and one from the operating room. All *S. aureus* lineages found were sensitive to vancomycin, and 53 (91.4%) were penicillin-resistant. The rate of resistance to erythromycin was 43.1% and to cephoxitin was 17.2% (Table 2).

**Table 1.** Colonization by *Staphylococcus aureus* among Health Care Workers of Clinical Hospital of Pernambuco, from March to July of 2007

Variables	Total		Colonized		Non colonized		OR (CI)	p
	N	%	n	%	n	%		
<b>Gender</b>								
Male <sup>1</sup>	36	17.8	8	22.2	28	77.8	1	
Female	166	82.2	44	26.5	122	73.5	1.26 (0.50-3.29)	0.75
<b>Age (years)</b>								
20  - 28	62	30.7	21	33.9	41	66.1	3.51 (1.25-10.20)	0.01*
28  - 33	41	20.3	12	29.3	29	70.7	2.84 (0.90-9.13)	0.08
33  - 44 <sup>1</sup>	55	27.2	7	12.7	48	87.3	1	
> 44	44	21.8	12	27.3	32	72.7	2.57 (0.82-8.21)	0.11
<b>Professional Activity</b>								
Doctors <sup>1</sup>	39	19.3	7	17.9	32	82.1	1	
Nurses	49	24.3	13	26.5	36	73.5	1.65 (0.53-5.28)	0.48
Nursing aids	102	50.5	26	25.5	76	74.5	1.56 (0.57-4.43)	0.46
Others (Physiotherapist and Lab Technician)	12	5.9	6	50.0	6	50.0	4.57 (0.93-23.49)	0.05*
<b>Sector</b>								
IUCs <sup>1</sup>	86	42.6	21	24.4	65	75.6	1	
Surgical Clinics	84	41.6	22	26.2	62	73.8	1.10 (0.52-2.32)	0.92
Nephrology/ Hemodialysis	32	15.8	9	28.1	23	71	1.21 (0.44-3.30)	0.86

OR: Odds Ratios, IC: Confidence interval, <sup>1</sup>Reference Group, \* $p < 0.05$  was considered statistically significant

**Table 2.** Susceptibility antimicrobial observed to *S. aureus* strains HCWs of Clinical Hospital of Pernambuco, Brazil, period March – July 2007

Antimicrobial	Diffusion Method Technique						MIC	E-test			
	Susceptible		Intermediate		Resistant			Susceptible		Resistant	
	N	%	N	%	N	%		N	%	N	%
Penicillin	5	8.6	-	-	53	91.4	-	-	-	-	-
Oxacillin	49	84.5	4	6.9	5	8.6	≥ 4	2	40.0	3	60.0
Clindamycin	50	86.2	1	1.7	7	12.1	-	-	-	-	-
Sulfamethoxazole/ Trimethoprim	56	96.5	-	-	2	3.5	-	-	-	-	-
Cloranphenicol	54	93.1	-	-	4	6.9	-	-	-	-	-
Gentamicin	56	96.5	-	-	2	3.5	-	-	-	-	-
Mupirocin	55	94.8	-	-	3	5.2	-	-	-	-	-
Cephoxitin	45	77.6	3	5.2	10	17.2	-	-	-	-	-
Linezolid	57	98.3	-	-	1	1.7	-	-	-	-	-
Vancomycin	54	93.1	4	6.9	-	-	≥ 32	4	100.0	-	-
Teicoplanin	51	87.9	5	8.6	2	3.5	-	-	-	-	-
Rifampicin	42	72.4	2	3.5	14	24.1	-	-	-	-	-
Erythromycin	31	53.4	2	3.5	25	43.1	-	-	-	-	-

## DISCUSSION

In this study, biological samples from the hands and nasal cavity of HCWs were evaluated. In regards to the anatomic sites, a greater rate of *S. aureus* was observed in the nasal cavity, confirming that this ecological niche of *S. aureus* is important for nosocomial infections<sup>3</sup>.

Recent studies have shown that the prevalence of colonization by MRSA, in HCWs, changes according to

the location and to the characteristics of each hospital<sup>6</sup>. For instance, in a Slovenian institution, the prevalence was of 2.6%<sup>4</sup>. Eveillard et al<sup>7</sup> found that the percentage was of 6.2% and Wang et al<sup>8</sup> verified a rate of 8.3%. In Brazilian hospitals, a research performed by Busato et al<sup>9</sup> in a Public Hospital of Santa Catarina, described a 31,5% prevalence of colonization, meanwhile, a study conducted in the Federal University Hospital of São Paulo found a lower rate, 12.1%<sup>10</sup>. These results contrast with another study



conducted in an Iranian hospital that, has made evident a higher rate of colonization (31.1%)<sup>11</sup>.

The health staff colonized by MRSA was nursing aides. This result corroborates similar studies, which had shown that among health staff colonized by MRSA, the nursing aides are the one most attacked, with a prevalence of 61.5%<sup>12</sup>.

The prevalence of MRSA in the present study was lower than the results described in the literature. The two MRSA positive were from the ICUs and the other from the operating room department. Rahbar et al<sup>11</sup> also described a higher prevalence of MRSA carriage in HCWs in operating rooms and ICUs.

Infections occurring in Japan and United States caused by strains of *S. aureus* with reduced susceptibility to vancomycin have been described<sup>13</sup>. In Brazil, intermediately resistant vancomycin has been described in patients but there are scarce studies with HCWs colonization<sup>14</sup>. In the present study resistant vancomycin strains are not found. However, it is important to examine this microorganism as a measure to reduce the risk for employees within the hospital environment.

In this study, we could document the prevalence of *S. aureus* colonization in HCWs in a Hospital in Recife, Brazil (25.7%) and that MRSA was more prevalent in nursing aides.

## REFERÊNCIAS

1. Safdar N, Bradley E. The risk of infection after nasal colonization with *Staphylococcus aureus*. *Am J of Med*. 2008; 121: 310-15.
2. Noble WC. Transfer of vancomycin resistance to methicillin-resistant *S. aureus*. *FEMS Microbiol. Lett*. 1992. 93: 195-8.
3. Kluytmans J, Van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, understanding mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev*. 1997; 10: 505-20.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 18<sup>th</sup> Informational supplement. M100-S18 CLSI. Baltimore, MD 2008.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing. 19<sup>th</sup> Informational supplement. M100-S19 CLSI. Baltimore, MD 2009.
6. Cretnik TZ et al. Prevalence and nosocomial spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a long-term-care facility in Slovenia. *Infect Control Hosp*. 2005; 26: 184-90.
7. Eveillard M, Martin Y, Hidri N, Boussougant Y, Joly-Guillou ML. Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among hospital employees: prevalence, duration, and transmission to households. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2004; 25: 114-20.
8. Wang JT, Lin SF, Chiu HL, Wang LC, Tai HM, Jiang CF, Chang SC, Chu SH. Molecular epidemiology and control of nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in a teaching hospital. *Formos Med Assoc*. 2004; 103: 32-6.
9. Busato C, Gabardo J, Leão MT. The evolution of the resistance of *Staphylococcus aureus* found in Health Care Workers correlated with the local consumption of antibiotics. *Braz J Infec Dis*. 2006; 10: 185-90.
10. Moreira M, et al. Efficacy of a program of prevention and control for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in an Intensive Care Unit. *Braz J Infec Dis*. 2007; 11: 57-62.
11. Rabbar M, Yaghoobi M, Kia-Darbandsari B. Prevalence of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and susceptibility of isolates to Methicillin and mupirocin among Health Care Workers in an Iranian Hospital. *Infec Control Hosp Epidemiol*. 2006; 27: 323-4.
12. Hurdle J, et al. Analysis of mupirocin resistance and fitness in *Staphylococcus aureus* by molecular genetic and structural modeling techniques. *Antimicrob Agents Chemo*. 2004; 48: 4366-76.
13. Thomas RA, et al. Effectiveness of pharmacy policies designed to limit inappropriate vancomycin use: A population- based assessment. *Infec Control Hosp Epidemiol*. 2002; 23: 683-8.
14. Palazzo IC, Araujo ML, Darini AL. First report of vancomycin-resistant staphylococci isolated from healthy carriers in Brazil. *J Clin Microbiol*. 2005. 43: 179-85.

# Implantação e otimização da PCR em tempo real para o diagnóstico da influenza A (H1N1) pandêmica no Instituto Adolfo Lutz e perspectivas para 2010

## Implementation and optimization of real time PCR for diagnosis of pandemic influenza A (H1N1) at Instituto Adolfo Lutz and perspectives for 2010

RIALA6/1267

Lucila Okuyama FUKASAWA<sup>1</sup>, Daniela Bernardes SILVA<sup>2</sup>, Fabiana Cristina Pereira dos SANTOS<sup>2</sup>, Isabel Takano OBA<sup>2</sup>, Adele CATERINO-DE-ARAUJO<sup>1</sup>, Maria Gisele GONÇALVES<sup>1</sup>, Fábio HIGA<sup>1</sup>, Maristela Marques SALGADO<sup>1</sup>, Claudio Tavares SACCHI<sup>1\*</sup> e Grupo de Trabalho de Influenza A (H1N1) – Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil\*\*

\*\*Grupo de Trabalho de Influenza A (H1N1) – Instituto Adolfo Lutz

**Serviço de Virologia**, Divisão de Biologia Médica, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, Cerqueira Cesar, São Paulo, SP, Brasil, CEP 01246-907, fone: (11) 3068-2904. Adriana Luchs, Adriana Yurica, Akemi Suzuki, Ana Lucia C. Avelino, Ana Maria Sardinha, Ângela Spina, Antonio Erculiano Jr, Audrey Cilli, Bráulio C. Machado, Cecília L. Simões Santos, Cilene Proença, Claudia R. Gonçalves, Clovis Abe Constantino, Cristina A. Figueiredo, Daniela Bernardes Silva, Denise H. Russo, Edson A. Andrade, Eliana R. Souza, Elvira M.M. Nascimento, Fabiana C. P. Santos, Fabiana O. Burgos, Iray Rocco, Isabel T. Oba, Ivani B. Ferreira, João Leandro P. Ferreira, Jonas J. Kisielius, Juliana C. Pereira, Kátia O. Correa, Luiza T. Madia de Souza, Manoel N. Senna, Marcilio Figueiredo, Margarete Benega, Maria Akiko Ishida, Maria do Carmo S.T. Timenetsky, Maria Isabel Oliveira, Marli Ueda, Monica S. C. Pereira, Noemi N. Taniwaki, Norberto C. Campos, Norio A. Sasaki, Rita de C.C. Carmona, Samanta E. T. Borborema, Simone G. Morillo, Suely P. Curti, Teresa Keico N. Sugahara, Terezinha M. de Paiva

**Serviço de Microbiologia**, Divisão de Biologia Médica, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, Cerqueira Cesar, São Paulo, SP, Brasil, CEP 01246-907, fone: (11) 3068-2899. Adele Caterino-de-Araujo, Carmen A. Freitas, Claudio T. Sacchi\*, Daniela Leite, Fabio T. Higa, Lourdes R. A. Vaz Lima, Lucila O. Fukasawa, Maria Cândida de Souza, Maria Gisele Gonçalves, Maristela M. Salgado, Samanta C.G. Almeida

**Divisão de Administração**, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, Cerqueira Cesar, São Paulo, SP, Brasil, CEP 01246-907, fone: (11) 3068-2801. Claudia P. Saraceni, Eliana Gomes, Natalia N. Orico, Marta L. Salomão

**Divisão de Patologia**, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, Cerqueira Cesar, São Paulo, SP, Brasil, CEP 01246-907, fone: (11) 3068-2876. Maria Lucia Mutagama e Equipe

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Centro de Imunologia, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, Cerqueira Cesar, São Paulo, SP, Brasil, CEP 01246-907, fone: (11) 3068-2899, e-mail: ctsacchi@gmail.com

<sup>2</sup>Centro de Virologia, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, Cerqueira Cesar, São Paulo, SP, Brasil, CEP 01246-907, fone: (11) 3068-2904

Recebido: 16.03.2010 – Aceito para publicação: 30.03.2010

### RESUMO

Os autores apresentam sua experiência no diagnóstico laboratorial de Influenza A (H1N1) em 37.240 amostras clínicas obtidas de pacientes com suspeita de gripe, encaminhadas ao Instituto Adolfo Lutz para análise. Eles apresentam os algoritmos de testes moleculares empregados, comparam a eficiência dos mesmos quanto à sensibilidade, especificidade e custo e, finalmente, sugerem um novo algoritmo para ser usado em caso de nova epidemia de Influenza A (H1N1) em 2010.

**Palavras-chave.** influenza A (H1N1), diagnóstico molecular, PCR em tempo real (rRT-PCR), algoritmo de testes moleculares.

### ABSTRACT

The authors present their experience with the molecular diagnosis of Influenza A (H1N1) with 37.240 clinical samples obtained from individuals suspected of flu, sent to Instituto Adolfo Lutz for analysis. They show the used algorithms, compare their efficiency in terms of sensitivity, specificity and cost, and suggest a new algorithm to be employed in case of an outbreak of Influenza A (H1N1) in 2010.

**Key words.** influenza A (H1N1), molecular diagnosis, real time PCR (rRT-PCR), algorithms of molecular assays.

O vírus da influenza apresenta genoma de RNA de fita simples, segmentado, revestido por uma matriz proteica (M), apresenta envoltório lipídico e expressa na sua superfície duas glicoproteínas denominadas neuraminidase (NA) e hemaglutinina (HA), codificadas pelos genes da NA e HA, respectivamente. Em relação à glicoproteína de superfície HA, o vírus da influenza do tipo A se subdivide em 16 subtipos (H1 – H16) sendo os subtipos H1, H2 e H3, responsáveis pelas pandemias ocorridas no século XX; ainda neste século identificou-se infecção na espécie humana pelos subtipos H5, H7 e H9. Os genes NP e M determinam a classificação dos vírus da influenza em tipos A, B e C, sendo apenas o tipo A associado a episódios pandêmicos. De todas as combinações possíveis entre os subtipos HA e NA, apenas três foram reconhecidos como realmente adaptados à espécie humana: os subtipos H1N1, H2N2 e H3N2<sup>1</sup>.

Em abril de 2009, um novo subtipo de vírus da influenza A, H1N1 de origem suína (A/H1N1), foi identificado em dois casos de infecção humana pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC, Atlanta, EUA)<sup>2</sup>. Rapidamente, novos casos foram diagnosticados com esse subtipo nos Estados Unidos, México, Canadá e outros países do mundo, levando a Organização Mundial da Saúde (OMS) a emitir um alerta de Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional<sup>3,4,5</sup>.

No Brasil, apenas três Laboratórios de Saúde Pública, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ (RJ), Instituto Evandro Chagas – IEC (PA) e Instituto Adolfo Lutz – IAL (SP) foram autorizados pelo Ministério da Saúde a realizar a PCR em tempo-real reversa (rRT-PCR) para o diagnóstico laboratorial confirmatório do vírus da influenza A (H1N1) de origem suína. Estes laboratórios fazem parte da rede de monitoramento do vírus influenza da Organização Mundial de Saúde (OMS) e são Laboratórios de Referência do Ministério da Saúde (MS) no Brasil em vírus respiratórios. A técnica de rRT-PCR foi padronizada e disponibilizada pelo CDC em 28 de abril de 2009<sup>6</sup> e o IAL liberou seu primeiro laudo em 07 de maio de 2009.

Como laboratório de referência macrorregional, o IAL foi responsável pelo diagnóstico laboratorial da influenza dos Estados de São Paulo, Goiás, Tocantins, Piauí, Acre, Rondônia, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Distrito Federal, dos quais recebeu 37.240 amostras (32.488 de São Paulo e 4.752 dos demais Estados) para análise durante a onda epidêmica de 2009.

O diagnóstico laboratorial confirmatório da influenza A (H1N1) de origem suína foi realizado em

amostras de secreções respiratórias de casos suspeitos e de fragmentos de órgãos de óbitos, empregando-se a rRT-PCR. As amostras foram processadas para a extração dos ácidos nucleicos empregando-se o Kit QIAmp RNA Mini Prep (Qiagen) e os RNAs virais submetidos às reações de rRT-PCR.

O protocolo do CDC preconiza a realização de quatro reações separadas de rRT-PCR na mesma placa:

- (i) Reação InfA – detecta o gene M de influenza A universal
- (ii) Reação swInfA – detecta o gene NP de influenza A de origem suína
- (iii) Reação swH1 – detecta o gene HA específico para o A/H1N1 pandêmico
- (iv) Reação RNase P (RP) – detecta o gene da RNase P humana; atua como controle positivo da reação para indicar a extração adequada do ácido nucleico da amostra clínica.

Para cada uma destas quatro reações são empregados um par de iniciadores senso e antissenso e uma sonda marcada com o fluoróforo FAM. No ensaio, todas as amostras devem apresentar reação positiva para o gene da RNase P humana, indicando que o processo de coleta da amostra e extração do RNA foram adequados. Uma amostra é considerada positiva para o influenza A (H1N1) origem suína se for positiva nas quatro reações de rRT-PCR (InfA, swInfA, swH1 e RP).

Os primeiros casos de infecção humana causada pela influenza A (H1N1) origem suína no Estado de São Paulo foram confirmados na primeira semana do mês de maio de 2009<sup>7,8</sup>. No início da epidemia, entre maio e junho de 2009, o IAL processou 2.610 amostras.

Empregando-se o protocolo do CDC, pode-se analisar 20 amostras por placa de reação, mais todos os controles negativos e positivos. O tempo de corrida das reações da rRT-PCR é de aproximadamente 90 minutos. Portanto, cada jornada de trabalho de 8 horas (um dia) permite cinco corridas de rRT-PCR e, conseqüentemente, a análise de 100 amostras por equipamento. No início da epidemia, onde tínhamos menor quantidade de amostras para analisar, o protocolo do CDC foi viável.

Entretanto, durante os meses de julho e agosto, no pico da epidemia da influenza A (H1N1), a demanda diária de amostras aumentou consideravelmente e chegamos a cadastrar em um único dia (06 de agosto) 1.111 amostras. Com esta demanda, o emprego do protocolo do CDC

para o processamento de todas estas amostras seria completamente inviável, considerando-se a estrutura e os recursos humanos de nosso laboratório. Exemplificando, para processarmos 1.000 amostras, empregando-se o protocolo do CDC e uma única máquina de rRT-PCR, seriam necessários 10 dias de trabalho, considerando-se uma carga horária diária de 8 horas.

Durante a primeira metade da epidemia, nós chegamos a utilizar três máquinas ao mesmo tempo aumentando nossa capacidade de processamento diário de amostras para 300/dia, um número inferior à média diária de amostras recebidas. Porém, com o contínuo aumento da demanda, acima de nossa capacidade analítica diária, houve um acúmulo de amostras a serem processadas que chegou a atingir 3.188 em um único dia.

Desta forma, a fim de aumentar a capacidade analítica de nosso laboratório, padronizamos ensaios multiplex de rRT-PCR para a detecção do A/H1N1. Neste novo formato, mais reações poderiam ser realizadas simultaneamente, pois duas reações diferentes estariam ocorrendo ao mesmo tempo em cada poço da placa. Duas reações em formato duplex foram padronizadas: Duplex 1 (InfA + RP) e Duplex 2 (swInfA + swH1) foram então desenvolvidas. As sequências dos iniciadores senso e antissenso e das sondas foram mantidas idênticas às do CDC, sendo alterado somente o fluoróforo das sondas RP e swInfA, de FAM para HEX, mantendo-se o quencher BHQ1. Assim, os ensaios desenvolvidos foram:

Duplex 1 – InfA-FAM + RP-HEX

Duplex 2 – swH1-FAM + swInfA-HEX

As duas reações duplex foram testadas em paralelo com as reações individuais (protocolo CDC) em 100 e 120 amostras previamente positivas ou negativas, respectivamente. O Duplex 1 (InfA + RP) apresentou a mesma sensibilidade e especificidade que as 2 reações individuais (InfA e RP), sendo que os valores de Ct obtidos nas reações duplex e individuais diferiram em no máximo  $\pm 2$  unidades. O mesmo ocorreu com o Duplex 2 (swInfA + swH1), entretanto a leitura e interpretação dos resultados do Duplex 2 ficaram difíceis, acarretando um aumento significativo no número de repetições.

Estes resultados não são totalmente inesperados, pois cada reação de rRT-PCR apresenta uma cinética diferente. Analisando-se as curvas de amplificação e de emissão de fluorescência de cada uma das quatro reações no formato original CDC, observamos que as reações para InfA e RP apresentaram melhor eficiência que as outras duas

reações (swInfA e swH1), o que poderia ser um dos fatores que contribuíram para os problemas de leitura e análise dos resultados obtidos com o Duplex 2 (swInfA + swH1). Desta forma, o uso do Duplex 2 não foi mantido em nossa rotina diagnóstica e ficou para ser futuramente otimizado.

Considerando-se os resultados expostos, decidimos adotar em nossa rotina apenas o Duplex 1 (InfA + RP), sendo as duas outras reações, para swInfA e swH1, mantidas no formato individual. Assim, no começo de julho de 2009, adotamos o algoritmo para o processamento das amostras descrito na Figura 1 (Protocolo IAL 2009).

A porcentagem de amostras analisadas com resultados negativos variou durante a onda epidêmica de 2009, mas em média, aproximadamente 50% de todas as amostras processadas foram negativas. Assim, adotamos uma triagem inicial, onde as amostras eram inicialmente submetidas ao Duplex 1 (InfA + RP). Todas as amostras processadas pelo Duplex 1 deveriam apresentar reação positiva para o componente RP, indicando a boa coleta do material clínico e o sucesso na extração do RNA viral. Caso contrário, essa amostra seria novamente submetida ao processo de extração. As amostras com resultado positivo para o RP, mas negativo para o InfA eram imediatamente liberadas como negativas para o influenza A (H1N1) de origem suína. Todas as amostras positivas para os dois genes, InfA e RP, eram então submetidas às duas reações individuais (swInfA e swH1). Caso a amostra fosse positiva para estes dois genes, a amostra era considerada positiva para a influenza A (H1N1) de origem suína. Se a amostra fosse negativa para estes mesmos genes, a amostra era caracterizada como positiva para influenza A universal (sazonal).

Empregando-se este novo protocolo (Protocolo IAL 2009), cada amostra foi submetida no máximo a apenas três reações de rRT-PCR (InfA + RP, swInfA e swH1), ao invés das quatro reações como no protocolo original do CDC. Além disso, empregando-se o esquema da triagem com o Duplex 1 (InfA + RP), em cada placa de 96 poços, foi possível analisar 91 amostras, ao invés das 20 amostras/placa pelo uso do protocolo CDC.

Durante o período de 27 de julho a 21 de agosto de 2009, foram processadas 12.226 amostras pelo Protocolo IAL 2009 (Tabela 1). Para isso, foram realizadas 24.452 reações de rRT-PCR, ou seja, 12.226 reações do Duplex 1 (InfA + RP) e, como aproximadamente 50% das amostras processadas pelo Duplex 1 (InfA + RP) foram negativas, apenas 6.113 reações de swInfA e swH1 foram realizadas. Comparativamente, com o protocolo CDC (quatro reações individuais) seriam necessárias 48.904 reações,

representando um número de testes 50% maior em relação ao Protocolo IAL 2009. Utilizando-se três equipamentos de RT-PCR, o processamento dessas amostras pelo Protocolo IAL 2009 demandou 20 dias de trabalho ao invés dos 41 dias que seriam necessários com a utilização do protocolo original CDC (Tabela 1).

A adoção do Protocolo IAL 2009 também representou uma redução de 50% em custos de insumos e de tempo de processamento das amostras em relação ao protocolo original CDC (Tabela 1).

**Tabela 1.** Comparação entre o protocolo CDC e protocolo IAL no processamento de 12.226 amostras para o diagnóstico laboratorial da Influenza A (H1N1) por PCR em tempo real durante a onda epidêmica de 2009

	Protocolo CDC (4 reações)	Protocolo IAL 2009 (3 reações)	% de redução (-) com o uso do Protocolo IAL 2009
Nº Amostras	12.226	12.226	
Nº reações	12.226 (InfA) 12.226 (RP) 12.226 (swInfA) 12.226 (swH1) (Total = 48.904)	12.226 (InfA + RP) 6.113 (swInfA) 6.113 (swH1) (Total = 24.452)	- 50%
Reações/placa	80	80	
Nº placas	611	305	- 50%
Nº Placas/dia (8h) (3 máquinas)	15	15	
Tempo de trabalho	41 dias	20 dias	- 50%
Custo	R\$ 690.524,00	R\$ 345.262,00	-50 %

Esta estratégia permitiu que o nosso laboratório fosse capaz de processar uma grande quantidade de amostras, atendendo a toda a demanda diária com agilidade na liberação dos laudos, mantendo-se a estrutura física, o número de máquinas de RT-PCR, os recursos humanos e a carga horária de trabalho.

Para nos prepararmos para uma possível onda epidêmica de influenza em 2010, padronizamos um novo ensaio multiplex para a detecção simultânea da influenza A universal (InfA), da influenza B (InfB) e da Rnase P humana (RP). Este ensaio em formato triplex (InfA+InfB+RP), nada

mais é do que o Duplex 1 (InfA+RP) utilizado em 2009, adicionado dos iniciadores e sonda InfB (marcada com o fluoróforo Cy5). Adicionalmente, foi padronizado um terceiro ensaio duplex (Duplex 3 H1+H3), para a detecção dos subtipos H1 e H3 da influenza A humana na mesma reação, empregando-se a sonda para H1 marcada com FAM e a sonda para H3 com HEX. Ensaios preliminares demonstraram que os ensaios Triplex (InfA+InfB+RP) e o Duplex 3 (H1+H3) apresentaram sensibilidades e especificidades semelhantes às reações individuais.

Para o ano de 2010, nosso grupo tem a possibilidade de continuar a usar o Protocolo IAL 2009 ou uma modificação dele, onde o Duplex 1 (InfA+RP) poderá ser substituído pelo Triplex (InfA+InfB+RP) e as reações individuais para a subtipagem do influenza A sazonal substituídas pelo Duplex 3 (H1+H3) (Figura 1, Protocolo IAL 2010). Assim, todas as amostras serão, inicialmente, submetidas ao ensaio Triplex. Se a amostra for negativa para InfA e InfB e positiva para RP, a amostra será negativa. Se a amostra for apenas positiva para InfB e RP, será liberada com positiva para influenza B. As amostras positivas para InfA e RP serão submetidas às reações para swInfA e swH1 individuais. Sendo positivas nestas duas reações, serão liberadas como positivas para influenza A (H1N1) de origem suína. Se forem negativas, serão submetidas ao Duplex 3 (H1+H3), sendo liberadas como influenza A subtipo H1 ou H3. As principais vantagens do uso do Protocolo IAL 2010 em relação ao Protocolo IAL 2009 são otimização do uso da amostra extraída, redução ainda maior de custos e tempo de trabalho, pois, tanto a influenza A e B, ou os subtipos H1 e H3 de influenza A sazonal, são detectados simultaneamente.

Cabe salientar que estes novos ensaios multiplex foram desenvolvidos para a plataforma do equipamento de RT-PCR da Roche (LightCycler 480 II), a qual permite a utilização dos fluoróforos FAM, HEX e Cy5. Estes ensaios também foram testados no equipamento da Applied Biosystems (ABI) modelo 7300, mas a interpretação da reação com o fluoróforo HEX não foi satisfatória e a reação com Cy5 não é possível de ser feita no modelo ABI 7300; outros modelos devem ser avaliados. Desta forma, para a utilização destes ensaios multiplex nas máquinas ABI 7300, nós recomendamos a substituição do HEX por outro fluoróforo como o JOE.

Em 2010, o IAL está implantando o diagnóstico da influenza A (H1N1) origem suína em dois laboratórios regionais do IAL, que possibilitará maior rapidez no processamento de amostras do interior do Estado. Com

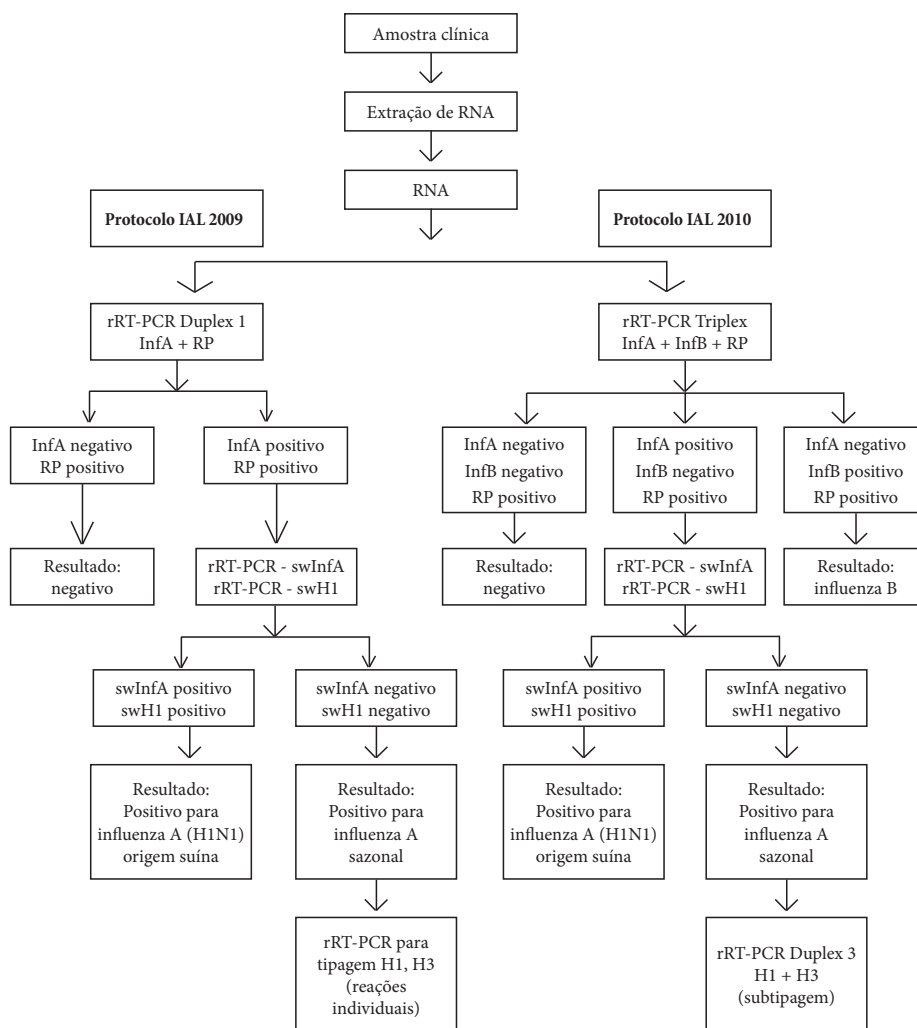


Figura 1. Algoritmo de processamento de amostras para o diagnóstico laboratorial de influenza por rRT-PCR – Protocolos IAL

a experiência adquirida durante a onda epidêmica de 2009, a descentralização do diagnóstico, a aquisição de novas máquinas, treinamento de novos profissionais e as modificações nos ensaios laboratoriais que fizemos, o IAL encontra-se em uma situação mais confortável em 2010, preparado para atender a demanda da próxima onda epidêmica de forma ainda mais eficiente.

## REFERÊNCIAS

1. Sullivan SJ, Jacobson RM, Dowdle WR, Poland GA. 2009 H1N1 Influenza. *Mayo Clin Proc*. 2010; 85(1):64-76.
2. Center for Disease Control and Prevention (CDC). Swine influenza A (H1N1) infection in two children – Southern California, March–April 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2009; 58(15):400-2.
3. Dawood FS, Jain S, Finelli L, Shaw MW, Lindstrom S, Garten RJ et al. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N Engl J Med*. 2009; 360:2605-15.
4. World Health Organization. Current WHO phase of pandemic alert. World Health Organization website. Disponível em: [http://www.who.int/csr/disease/avian\_influenza/phase/em].
5. Fred J, Albernaz RM, Pellini ACG, Ribeiro AF, Carvalhanas TRMP, Yu AL et al. Vigilância da influenza A (H1N1), novo subtipo viral, no Estado de São Paulo, 2009. *BEPA*. 2009; 6(65):4-15.
6. Center for Disease Control and Prevention – CDC. CDC Protocol for realtime RTPCR for influenza A (H1N1). [documento na internet]. Disponível em: [http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/CDCRealtimeRTPCR\_SwineH1Assay-2009\_20090430.pdf].
7. Divisão de Doenças de Transmissão Respiratória. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. Influenza A/H1N1 novo subtipo viral. *BEPA*. 2009; 6(66):17-23.
8. Divisão de Biologia Médica. Instituto Adolfo Lutz. IAL isola estirpe brasileira do vírus influenza A/H1N1. *BEPA*. 2009; 6(66):24-5.

## Provável surto de toxinfecção alimentar em funcionários de uma empresa no litoral da região sudeste do Brasil

### Presumptive outbreak of food-borne disease among employees working for a company in the southeastern coastal region of Brazil

RIALA6/1268

Estevão de Camargo PASSOS\*, Ana Ruth Pereira de MELLO, Cícero Vagner de SOUSA, Carlos Roberto da SILVA, Ana Carolina Buchalla ALONSO, Eduardo GONZALEZ, Mário TAVARES

\*Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz – Laboratório Regional de Santos - Seção de Bromatologia e Química, Rua Silva Jardim, 90, Vila Nova, Santos / SP – CEP 11015-020 – Tel/Fax 13-3232-5112, e-mail: estevaopqc@yahoo.com.br

Recebido: 25.11.2009 – Aceito para publicação: 10.03.2010

#### RESUMO

Foi descrito um provável surto de toxinfecção alimentar em 10 funcionários de uma empresa do município do Guarujá, Estado de São Paulo, em setembro de 2009. A empresa produtora das refeições encaminhou ao Setor de Microbiologia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz (IAL) - Laboratório Regional de Santos as amostras dos alimentos, suco e água servidas no almoço dos empregados de uma empresa cliente. As amostras foram analisadas seguindo-se a metodologia descrita no Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods (2001) e Standard Methods (2005); os resultados foram comparados de acordo com os padrões microbiológicos estabelecidos pela Resolução RDC nº 12/2001 da ANVISA e pela Portaria nº 518/2004 do Ministério da Saúde. Os coliformes totais foram detectados na amostra de água e os coliformes termotolerantes foram identificados na amostra de salada de alface com queijo servida no restaurante (N.M.P.  $1,1 \times 10^3$ /g). Não foram isolados *Staphylococcus* coagulase positiva, *Bacillus cereus*, *Salmonella* spp. e tampouco clostrídios sulfito-redutores. Os resultados das análises microbiológicas associados aos sintomas de gastroenterites em funcionários sugerem a ocorrência de surto de toxinfecção alimentar. O presente relato mostra a importância do trabalho do Laboratório de Saúde Pública na elucidação de doenças transmitidas por alimentos.

**Palavras-chave.** toxinfecção alimentar, vigilância sanitária e epidemiológica, boas práticas de fabricação, coliformes.

#### ABSTRACT

This paper reports a presumptive outbreak of food-borne disease occurred in September 2009 to 10 employees working for a company in Guarujá, São Paulo, Brazil. The food-supplying company was requested to send the suspected food, fruit juice and water samples in order to be investigated at Instituto Adolfo Lutz – Regional Laboratory of Santos. The collected foods samples were analyzed by means of conventional methods, following the Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods (2001) and the guidelines of the Standard Methods (2005). The results were analyzed according to the Brazilian Ministry of Health legislation ANVISA RDC 12/2001 and Decree 518/2004. The coliform group bacteria were isolated from the water samples, and fecal coliforms were isolated from lettuce and cheese salad served at the firm restaurant (N.M.P.  $1,1 \times 10^3$ /g). No coagulase-positive *Staphylococcus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella* spp. and sulfite reductor *Clostridium* were detected. By associating the results based on laboratory findings to the gastroenteritis symptoms in employees, there may be presumed that an outbreak of food-borne disease has occurred. The municipal health surveillance service has not been notified by the food company, which is mandatory according to the legislation in effect. The present report evidences the remarkable task performed by a Public Health laboratory elucidating an outbreak of food-borne diseases.

**Key words.** food-borne diseases, health surveillance, good manufacturing practice, coliforms.

As doenças transmitidas por alimentos (DTAs) estão relacionadas ao consumo de alimentos contendo bactérias patogênicas, que são preparados nas residências, restaurantes *self-service* e *à la carte* e nas cozinhas industriais<sup>1</sup>. As DTAs caracterizam-se como ocorrências pontuais na população exposta ao risco, número de indivíduos acometidos que podem apresentar diferentes quadros clínicos, períodos de incubação variáveis e os casos graves podem evoluir para óbitos nos pacientes acometidos<sup>2</sup>.

As condições higiênicas dos locais de produção e manipulação dos alimentos interferem na qualidade microbiológica dos mesmos por serem considerados pontos de contaminação, e os manipuladores são frequentemente disseminadores de agentes patogênicos.

O risco de contaminação de alimentos, a partir do ar ambiente e de superfícies de bancadas e equipamentos, foi descrito por Soares et al<sup>3</sup> em dois restaurantes institucionais que verificaram a presença de *B. cereus*, potencialmente produtores de enterotoxinas. Paula et al<sup>4</sup> encontraram coliformes fecais em amostras de alfaces em restaurantes *self-service* de Niterói e observaram que os manipuladores de alimentos também poderiam ser incriminados na disseminação das bactérias patogênicas. Rodrigues et al<sup>5</sup> identificaram *Staphylococcus aureus* em sanduíche de galinha consumido por comensais.

Os navios de cruzeiros também têm sido objeto de diversos estudos na ocorrência de surtos, como os relatados por Rooney et al<sup>6</sup>, que revisaram os surtos ocorridos associados aos passageiros de cruzeiros, entre 1970 e 2003 e identificaram a *Salmonella* spp. como o agente patogênico mais frequente, seguido pelo *E. coli*, *Shigella* spp., norovirus, *Vibrio* spp., *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, as quais afetaram aproximadamente 10.000 pessoas.

A prevenção da contaminação dos alimentos não é tarefa exclusiva dos manipuladores, os consumidores também desempenham papel importante na cadeia analisada<sup>1</sup>. As informações obtidas nos surtos de DTAs indicam a necessidade da orientação dos manipuladores quanto à higienização no preparo de hortaliças e outros alimentos, emprego das boas práticas de fabricação, análise dos pontos críticos de risco, entre outras medidas a serem adotadas.

O objetivo do presente trabalho foi relatar a ocorrência de um provável surto de toxinfecção alimentar em funcionários de uma empresa no município de Guarujá, São Paulo, em setembro de 2009.

Os fatos ocorridos com os funcionários da empresa levaram a empresa de refeição a colher amostras de águas e dos alimentos servidos durante o almoço, em 15/09/2009, que encontravam-se armazenadas no freezer a -18°C na empresa onde ocorreu o provável surto.

As amostras dos pratos prontos para consumo e águas foram colhidas em 15/09/2009 pelas nutricionistas, acondicionadas em sacos plásticos transparentes de primeiro uso, etiquetadas, mantidas em temperatura de -18°C e encaminhadas para análise no setor de Microbiologia Alimentar da Seção de Bromatologia e Química do Laboratório Regional de Santos do Instituto Adolfo Lutz, onde foram identificadas e mantidas a temperatura de -18°C até o momento da análise.

As amostras dos pratos prontos para consumo coletados no refeitório da empresa foram arroz branco, feijão cozido, strogonoff de carne, filé de frango à milanesa, mamão, sopa creme de ervilha, suco de manga, salada de alface com queijo e água para o preparo do suco.

Os alimentos foram classificados de acordo com o anexo I da Resolução RDC nº12 de 2 de janeiro de 2001 da ANVISA/MS<sup>7</sup>, os ensaios bacteriológicos, realizados segundo a metodologia da APHA<sup>8</sup>, e os resultados das análises obtidos, foram comparados com os padrões microbiológicos estabelecidos pela Resolução RDC nº12. As amostras de água foram analisadas de acordo com Standard Methods<sup>9</sup> e os resultados comparados com o padrão de potabilidade estabelecido pela Portaria 518 de 25 de março de 2004 do Ministério da Saúde<sup>10</sup>. Foram pesquisados os bioindicadores de contaminação ambiental e fecal, coliformes totais e coliformes termotolerantes, por meio da técnica do número mais provável (N.M.P.) para os alimentos e da técnica do substrato definido para *Escherichia coli* na amostra de água. Nos alimentos também foram pesquisados *Staphylococcus* coagulase positiva, clostrídios sulfito-redutores e *Bacillus cereus*, pela técnica da diluição de 25g de amostra em 225mL de diluente, seguido de plaqueamento de 0,1 ou 1ml, portanto os resultados foram referidos a 1g de amostra e expressos em UFC/g (Unidade Formadora de Colônia/grama); A *Salmonella* spp. foi analisada por meio do método de presença ou ausência em 25 gramas da amostra. Em relação ao suco de manga, foram pesquisados somente coliformes a 35°C em 50 mL do suco e o resultado expresso na ausência em 50 mL.

Os resultados das amostras de alimentos e de água encontram-se descritos nas tabelas 1 e 2 abaixo:



**Tabela 1.** Resultados das análises de alimentos obtidas pela técnica do número mais provável, unidade formadora de colônia, presença/ausência em 25 gramas e presença/ausência em 50 mL da amostra, coletados no refeitório da empresa envolvida em um provável surto de toxinfecção no município de Guarujá/SP, em 2009

Amostra de alimentos	Coliformes totais (NMP/g) <sup>a</sup>	Coliformes termotolerantes (NMP/g)	<i>Staphylococcus coagulase positiva</i> (UFC/g) <sup>b</sup>	<i>Bacillus cereus</i> (UFC/g)	Clostrídios sulfito-redutores (UFC/g)	<i>Salmonella</i> spp./25g (ausência/presença) <sup>c</sup>
Arroz branco	< 3	< 3 (10 <sup>2</sup> ) <sup>d</sup>	< 10 <sup>2</sup> (10 <sup>3</sup> )	< 10 <sup>2</sup> (10 <sup>3</sup> )	NR <sup>f</sup>	ausência (ausência)
Feijão cozido	< 3	< 3 (10 <sup>2</sup> )	< 10 <sup>2</sup> (10 <sup>3</sup> )	< 10 <sup>2</sup> (10 <sup>3</sup> )	NR	ausência (ausência)
Strogonoff de carne	< 3	< 3 (20)	< 10 <sup>2</sup> (10 <sup>3</sup> )	< 10 <sup>2</sup> (10 <sup>3</sup> )	< 10 (10 <sup>3</sup> )	ausência (ausência)
File de frango a milanesa	< 3	< 3 (20)	< 10 <sup>2</sup> (10 <sup>3</sup> )	< 10 <sup>2</sup> (10 <sup>3</sup> )	< 10 (10 <sup>3</sup> )	ausência (ausência)
Mamão	< 3	< 3 (5x10 <sup>2</sup> )	NR	NR	NR	ausência (ausência)
Sopa de creme de ervilha	< 3	< 3 (10)	< 10 <sup>2</sup> (10 <sup>3</sup> )	< 10 <sup>2</sup> (10 <sup>3</sup> )	< 10 (10 <sup>3</sup> )	ausência (ausência)
Suco de manga	ausência (ausência/50 mL) <sup>e</sup>	NR	NR	NR	NR	NR
Salada de alface com queijo	> 1,1x10 <sup>3</sup>	1,1x10 <sup>3</sup> (10 <sup>2</sup> )	NR	NR	NR	ausência (ausência)

<sup>a</sup>NMP: Número mais Provável/g.

<sup>b</sup>UFC: Unidade formadora de colônias/g.

<sup>c</sup>Metodologia para pesquisa de *Salmonella* em 25g da amostra: ausência/presença.

<sup>d</sup>Valores de tolerância para amostra indicativa segundo a Resolução RDC 12/2001 da ANVISA/MS.

<sup>e</sup>Metodologia para pesquisa de coliformes totais em 50mL da amostra: ausência/presença.

<sup>f</sup>NR: não realizado por não ser exigido na Resolução RDC 12/2001 da ANVISA/MS.

**Tabela 2.** Resultados das análises das amostras de água obtidas pela técnica do substrato definido/NMP em 100 mL, coletadas no estabelecimento envolvido durante o provável surto de toxinfecção no município de Guarujá/SP, em 2009

Origem	Amostra de águas	Coliformes totais/100mL	<i>Escherichia coli</i> /100mL
Cozinha do refeitório da empresa	Água utilizada para preparo do suco	Presença	ausência

A amostra de salada de alface com queijo coletada no refeitório da empresa cliente encontrava-se em desacordo com a legislação vigente, por apresentar a contagem dos coliformes termotolerantes calculado pelo método do N.M.P., valor igual a 1,1x10<sup>3</sup>/g, valor este

superior ao limite de 10<sup>2</sup>/g estabelecido pela Resolução RDC 12/2001 da ANVISA/Ministério da Saúde<sup>7</sup>.

Embora tenham sido pesquisados tanto coliformes totais quanto *Escherichia coli*, o resultado da amostra de água estava em desacordo com a Portaria 518/2004<sup>10</sup> por

apresentar o teor de cloro residual abaixo do mínimo permitido e coliformes totais na amostra coletada na cozinha da empresa cliente. Esta Portaria condena a presença de coliformes totais e *Escherichia coli* em águas provenientes de abastecimento público que tenham recebido qualquer tipo de tratamento, enquanto que sistemas alternativos de captação de água sem tratamento podem conter a presença de coliformes totais que deverão ser pesquisados quanto a sua origem e posterior eliminação da causa.

A presença de coliformes termotolerantes em alimentos comercializados tem sido objeto de estudo por diversos autores no Brasil, como os realizados por Silva et al<sup>11</sup> em amostras de queijos, hortaliças e linguiças. Já Santos et al<sup>12</sup> encontraram em 4,3% de polpas de frutas congeladas coliformes totais, coliformes termotolerantes e *E.coli* em valores abaixo do permitido pela legislação e discutiram que a contaminação dos produtos de frutas poderiam ser proveniente das condições da matéria-prima, lavagem, das condições higiênico-sanitárias dos manipuladores, equipamentos e ambiente industrial em geral.

Os coliformes isolados nos alimentos, além de caracterizarem produtos impróprios para o consumo podem provocar surtos de intoxicação alimentar, como os descritos por Passos et al<sup>13</sup>, que observaram a presença de coliformes totais nas amostras de água da empresa e do restaurante e coliformes termotolerantes identificados na amostra de carne assada servida no restaurante da empresa no surto de toxinfecção alimentar ocorrido no município de Cubatão em 2007.

Em relação às hortaliças contaminadas, Rooney et al<sup>6</sup> verificaram que 14% dos surtos ocorridos em navios foram provocados pelas saladas contaminadas, e Takayanagui et al<sup>14</sup>, em 2001, analisaram 172 estabelecimentos fixos ou ambulantes e constataram que 67% das hortaliças utilizadas nas saladas como alface (*Lactuca sativa*), almeirão (*Chicorium intybus*), rúcula (*Eruca sativa*), agrião (*Nasturtium officinale*) ou chicória (*Chicorium endivia*) estavam fora das especificações microbiológicas, com elevada concentração de coliformes fecais em 63%, presença de *Salmonella* em 9% e de enteroparasitas em 33%. A contaminação de hortaliças pode ocorrer na horta, resultante da utilização de água de irrigação ou adubos inadequados, no transporte ou por manipulação nos pontos de venda. As sucessivas manipulações aumentam as chances de contaminação.

Os alimentos servidos em navios de cruzeiros também podem estar associados aos surtos de DTAs,

a presença de bactérias patogênicas tem sido relatada em trabalhos, como o de Passos et al<sup>15</sup>, que detectaram a presença de coliformes termotolerantes na salada de macarrão na cozinha de um navio de cruzeiro ancorado no porto de Santos em 2007.

Embora na pesquisa de *Staphylococcus coagulase* positiva, *Bacillus cereus*, clostrídios sulfito-redutores e *Salmonella* spp. os microrganismos não tenham sido detectados nas amostras analisadas, a presença de bactérias em surtos de toxinfecção alimentar ou como fonte de contaminação tem sido descrita por diversos autores<sup>3,4,5</sup>.

A empresa produtora de alimentos informou que segue as normas de boas práticas de fabricação, tanto na empresa como nos restaurantes administrados, além de realizar o controle de qualidade das matérias primas e fornecedores, e que mantém atualizado um controle dos seus produtos por meio de análises frequentes em laboratórios bromatológicos.

A origem do surto provavelmente ocorreu durante a manipulação das hortaliças pelos funcionários. Em vista do ocorrido, algumas medidas foram sugeridas para solucionar o problema pontual encontrado, todos os empregados serão submetidos a um treinamento de boas práticas de fabricação, e o produtor de hortaliças realizará, em seus produtos vendidos à empresa de alimentação, análises mensais nos próximos seis meses.

A Vigilância Sanitária do Guarujá/SP não foi acionada pela empresa de alimentos, o que não interferiu com os resultados obtidos no laboratório. Este relato mostra a importância do Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Regional de Santos na elucidação de um surto de doenças transmitidas por alimentos.

## REFERÊNCIAS

1. Zandonadi RP, Botelho RBA, Sávio KEO, Akutsu RC, Araújo WMC. Atitudes de risco do consumidor em restaurantes de auto-serviço. *Rev Nutr*. 2007;20(1):19-26.
2. Germano PML, Germano MIS. Agentes bacterianos de toxinfecções. In: Germano PML, Germano MIS, editores. *Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos*. São Paulo: Livraria Varela; 2001. p.199-258.
3. Soares CM, Valadares GF, Azeredo RMC, Kuaye AY. Contaminação ambiental e perfil toxigênico de *Bacillus cereus* isolados em serviços de alimentação. *Ciênc Rural*. 2008;38(2):504-10.
4. Paula P, Rodrigues PSS, Tórtora JCO, Uchoa CMA, Farage S. Contaminação microbiológica e parasitológica em alfaces (*Lactuca sativa*) de restaurantes self-service, de Niterói, RJ. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003;36(4):535-7.

5. Rodrigues KL, Moreira AN, Almeida ATS, Chiochetta D, Rodrigues MJ, Brod CS et al. Intoxicação estafilocócica em restaurante institucional. *Ciênc Rural*. 2004;34(1):297-299.
6. Rooney RM, Cramer EH, Mantha S, Nichols G, Bartram JK, Farber JM et al. A Review of Outbreaks of Foodborne Disease Associated with Passenger Ships: Evidence for Risk Management. *Public Health Rep*. 2004;119:427-34.
7. Brasil. Ministério da Saúde/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, p. 45-53, 10 de jan. 2001, Seção 1.
8. Downes FP, Ito K, editors. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Washington: Edwards Brothers; 2002.
9. Eaton AE, Clesceri LS, Rice EU, Greenberg AE. *Standard Methods for the examination of water and wastewater*. Baltimore: United Book Press; 2005.
10. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 518 de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativas ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade e dão outras providências. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, p. 266-9, 26 de mar. 2004, Seção 1.
11. Silva MP, Cavalli DR, Oliveira TCRM. Avaliação do padrão coliformes a 45°C e comparação da eficiência das técnicas dos tubos múltiplos e petrifilm EC na detecção de coliformes totais e *Escherichia coli* em alimentos. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2006;26(2):352-9.
12. Santos CAA, Coelho AFS, Carreiro SC. Avaliação microbiológica de polpas de frutas congeladas. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2008;28(4):913-5.
13. Passos EC, Almeida CS, Rosa JP, Rozman LM, Mello ARP, Souza CV et al. Surto de toxinfecção alimentar em funcionários de uma empreiteira da construção civil no município de Cubatão, São Paulo/Brasil. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2008;67(3):237-40.
14. Takayanagui OM, Oliveira CD, Bergamini AMM, DM, Okino MHT, Febrônio LHP, Castro e Silva AAMC et al. Fiscalização de verduras comercializadas no município de Ribeirão Preto, SP. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2001;34(1):37-41.
15. Passos EC, Mello ARP, Souza CV, Silva CR, Paschoal RC, Tavares M. Avaliação microbiológica da alimentação servida aos tripulantes de um navio de cruzeiro ancorado no porto de Santos, São Paulo, em dezembro de 2007. *Bol Inst Adolfo Lutz*. 2008;18:47-8.

## A modified method for detecting *Cryptosporidium* oocysts using DNA templates extracted from environmental samples

### Método modificado para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* utilizando DNA extraído de amostras ambientais

RIALA6/1269

Ronalda Silva de ARAÚJO<sup>1</sup>, Therezinha TRAVASSOS DE CARVALHO<sup>2</sup>, Glavur Rogério MATTÉ<sup>1</sup>, Licia Natal FERNANDES<sup>1</sup>, Livia Carminato BALSALOBRE<sup>1</sup>, Maria Helena MATTÉ<sup>1\*</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Faculdade de Saúde Pública – Universidade de São Paulo

<sup>2</sup>Serviço de Parasitologia - Instituto Adolfo Lutz

\*Laboratório de Saúde Pública - Departamento de Prática de Saúde Pública - Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo - Avenida Doutor Arnaldo, 715 - CEP 01246-904, Cerqueira César, São Paulo – SP - email: mhmatte@usp.br

Recebido: 11.12.2009 – Aceito para publicação: 08.03.2010

#### RESUMO

O protozoário parasito *Cryptosporidium* tem emergido como um dos mais importantes contaminantes da água, causando surtos de diarreia de veiculação hídrica em todo mundo. Para avaliar o significado, para a saúde pública, da presença desse agente patogênico em amostras ambientais, vários métodos têm sido desenvolvidos para isolar e detectar oocistos de *Cryptosporidium*. No presente estudo foi padronizado um método confiável e reprodutível para detectar e identificar oocistos de *Cryptosporidium* em amostras de água no Estado de São Paulo, Brasil, como o primeiro passo para futuros estudos de genotipagem. Amostras de água foram concentradas por filtração, submetidas a ultrassom em solução de Tween 80 a 0.1%; o sedimento obtido foi transferido para microtubos contendo 1,0 ml de água destilada e conservado a -20°C. O DNA foi extraído com adição de 1% de PVP no tampão de lise; a extração foi realizada em tubo Phase Lock Gel Heavy®. Houve amplificação do fragmento esperado de 214 bp em cinco das 11 amostras de água analisadas. Os resultados deste estudo demonstraram a utilidade de aplicação do teste padronizado em estudos epidemiológicos e em programas de vigilância, em virtude da técnica ter apresentado sensibilidade para incrementar significativamente a quantidade de produto amplificado.

**Palavras-chave.** *Cryptosporidium*, reação em cadeia da polimerase, poluição da água, saúde pública.

#### ABSTRACT

The protozoan parasite *Cryptosporidium* has emerged as one of the most important water contaminants, causing outbreaks of waterborne diarrhea worldwide. In order to assess the importance for public health of this pathogen's presence in environmental samples, several methods have been developed to isolate and detect *Cryptosporidium* oocysts. In the present study, a reliable and reproducible method has been standardized for detecting and identifying *Cryptosporidium* oocysts in water samples in the State of São Paulo, Brazil as the first step for future genotyping studies. Water samples were concentrated by filtration, and then subjected to ultrasound in Tween 80 0.1%, the obtained sediment was transferred into micro tubes containing 1.0 ml of distilled water and stored at -20°C. DNA was extracted with the addition of 1% PVP in lysis buffer, the organic extraction was performed in Phase Lock Gel Heavy®. There was a 214 bp amplification on the expected fragment in five out of the 11 water samples analyzed. The results of this study demonstrated the application usefulness of the standardized test in epidemiological studies and surveillance programs because the technology allowed to increase significantly the amount of amplified product.

**Key words.** *Cryptosporidium*, polymerase chain reaction, water pollution, public health.

The coccidian protozoan *Cryptosporidium* is responsible for many outbreaks of human disease worldwide. Epidemiological studies have indicated that the main routes of transmission for human cryptosporidiosis are human-animal, person-to-person spread and the waterborne infection. In São Paulo State, Brazil, studies have described the presence of *Cryptosporidium* oocysts in water sources<sup>1,2</sup>, sewage<sup>3-5</sup>, mineral water<sup>6</sup> and outbreaks of cryptosporidiosis in day-care-centers<sup>7,8</sup>, but no waterborne infection had been reported. The oocyst is the environmentally stable stage and is resistant to inactivation by commonly used drinking water disinfectants.

Currently, there are several methods in the literature for detection, identification and enumeration of *Cryptosporidium* oocysts in water and fecal samples. Therefore, the data obtained using the conventional immunofluorescent assay (IFA) for environmental samples and optical microscopy for clinical samples, do not provide information on the *Cryptosporidium* species, genotypes and specific hosts. Nevertheless, in Brazil, as far as we know, to date, there is only one study of molecular method applied to detect *Cryptosporidium* oocysts in fecal samples adapted to our conditions<sup>9</sup>.

The present study was designed to achieve a methodology to extract genomic DNA and detect *Cryptosporidium* oocysts from water samples.

Raw water samples were harvested from the same site in Ribeirão da Fazenda River which belongs to Ribeirão da Fazenda Basin, at the North coast of the city of São Sebastião, São Paulo State, Brazil.

The samples were collected in sterilized plastic containers and treated as described by Franco et al 2001<sup>1</sup> with modifications. Briefly, 10L of water were passed through membrane filters (145 mm diameter, 0.45 µm, Millipore®, Brazil), which were transferred to a plastic bag containing 200 ml of the water sample and 300 µl of 0.1% Tween 80 solution, and submitted to ultrasonic irradiation (Thornton T50) for 15 minutes. Afterwards, the content was transferred to a 50 ml centrifuge tube and centrifuged at 5.000 rpm for 15 minutes at 4°C. Pellets were transferred to a unique 2.0 ml microcentrifuge tube with 1.0 ml of distilled water and stored at -20°C.

DNA extraction was performed according to Carvalho-Almeida et al 2005<sup>9</sup> with minor modifications. In brief, 200 µl of the filtrated sediment were mixed to 500 µl of lysis buffer [50 µl of 100 mM Tris - HCl (pH = 8.0) + 50 µl of 50 mM EDTA (pH = 8.0) + 50 µl of SDS 10% + 3.5 µl de 70 mM β-mercaptoetanol + 1 µl of polyvinilpyrrolidone

(PVP) 1% + 345.5 µl de Milli-Q water]. The second incubation time was reduced to two hours. DNA was extracted with 500 µl phenol-chloroform-isoamyl (25:24:1) using tubes Phase Lock Gel Heavy (Eppendorf, Germany) following the manufacturer's instructions. The resulting DNA was eluted in 50 µl of TE buffer and stored at 4°C until used for amplification.

PCR assays were performed targeting a polymorphous region of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium* using primers previously described by Coupe et al 2005<sup>10</sup>. Primary PCR amplifies a fragment of 1035 bp, and was performed with forward primer SCL1 (5' - CTGGTTGATCCTGCCAGTAG - 3') and reverse primer CPB-DIAGR (5' - TAAGGTGCTGAAGGAGTAAGG-3') in five replicas for each sample. PCR reaction had a final volume of 25 µl in each tube containing 5.0 µl of DNA, 14.2 µl MilliQ water, 2.5 µl of 1X PCR reaction buffer, 1 µl of PVP 1%, 1.25 µl MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 0.2 µl of 25 mM dNTP, 0.3 µl of each primer and 1.25 U of TaqDNA polymerase (Taq Gen Biosystem). The PCR program included 5 min of initial denaturation at 94°C followed by 39 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 60°C for 45 s and extension at 72°C for 90 s and a final extension at 72°C for 5 min. To clean the products of PCR amplification, all five replicas of each sample were transferred to one fresh tube and purification was performed using the Perfectprep® PCR Cleanup Kit (Eppendorf, Germany) according to manufacturer's instructions. The second round PCR amplifies a 214-bp fragment using the forward primer SCL2 (5' - CAGTTATAGTTTACTTGATAATC-3') and the reverse primer SCR2 (5' - CAATACCCTACCGTCTAAAG-3'). To perform the second round of PCR, again five replicas of each purified amplicon were made, in a final volume of 25 µl using 5.0 µl of the product of the first round amplification. The conditions were the same as those for the first round PCR, except that no PVP was added and annealing was at 58°C temperature, extension lasted 30 seconds and final extension lasted 10 minutes. To achieve optimal detection limits the products of nested-PCR were purified with Perfectprep® PCR Cleanup Kit (Eppendorf, Germany) and analyzed by electrophoresis in 2.0% agarose gel stained with ethidium bromide.

In this study, the procedure could amplify the expected fragment of 214 bp from five out of eleven water samples. This result is similar to one study in which authors found six positive out of 15 water samples examined after incubating the DNA in 4% PVP solution and performing

two step of column purification<sup>11</sup>. To the best of our knowledge, it is the first report of *Cryptosporidium* oocysts detected by PCR from river water in Brazil.

Failure to obtain positive PCR results from several types of water samples containing *Cryptosporidium* oocysts has also been reported by others. One of the main challenges for PCR assays of coccidian parasites is to provide sufficient DNA free from PCR inhibitors. To overcome this problem we added, 1% PVP to the PCR reaction mixture to each replica tube containing the DNA template, and cleaned the product of the first round PCR in a spin column (Perfectprep<sup>®</sup> PCR Cleanup Kit Eppendorf, Germany). From this purified PCR product, we used 5 µl as the template for the second round PCR, made five replicas and again, performed a new purification before running the electrophoresis.

The epidemiology of *Cryptosporidium* is complex, with hundreds hosts and 15 recognized species, being *C. hominis* and *C. parvum* the cause of the majority of human disease. Besides these two main species, another species have been detected in human stools and can be found in the aquatic environment: *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. muris* and *C. canis*<sup>12</sup>.

Results of this study suggest that the modifications made here in the DNA extraction protocol and the concentration of the amplicon would improve the sensitivity and specificity for detecting *Cryptosporidium* spp. oocysts in water samples, using nested-PCR. This molecular tool can be very useful in assessing the human-infective potential of *Cryptosporidium* oocysts in water and the source of *Cryptosporidium* contamination. Despite the fact that this procedure is time consuming to be employed for diagnostic purposes, it may be valuable in directing operational management and surveillance in potential outbreaks situation. This procedure can be useful in epidemiological studies and surveillance programs since it significantly increased the amount of amplicon obtained, even with very low counts of oocysts in the water sample.

#### ACKNOWLEDGMENT

Authors wish to thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for financial support (Process # 2005/03783-0 and 2006/01532-2).

#### REFERENCES

1. Franco RM, Rocha-Eberhardt R, Cantusio Neto R. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw water from the Atibaia River, Campinas, Brazil. *Rev Inst Med Trop S. Paulo*. 2001;43:109-11.
2. Hachich EM, Sato MI, Galvani AT, Menegon JR, Mucci JL. *Giardia* and *Cryptosporidium* in source waters of São Paulo State, Brazil. *Water Sci Technol*. 2004;50:239-45.
3. Cantusio Neto R, Santos JU, Franco RM. Evaluation of activated sludge treatment and the efficiency of the disinfection of *Giardia* species cysts and *Cryptosporidium* oocysts by UV at a sludge treatment plant in Campinas, South-east Brazil. *Water Sci Technol*. 2006;54:89 - 94.
4. Santos LU, Bonatti TR, Cantusio Neto R, Franco RM. Occurrence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in activated sludge samples in Campinas (SP), Brazil. *Rev Inst Med Trop S. Paulo*. 2004;46:309-13.
5. Farias E, Coutinho W, Gamba RC, Pellizari VH. Detection of *Cryptosporidium* spp. Oocysts in raw sewage and creek water in the city of Sao Paulo, Brazil. *Braz J Microbiol*. 2002;33:41-3.
6. Franco RM, Cantusio Neto R. Occurrence of cryptosporidial oocysts and *giardia* cysts in bottled mineral water commercialized in the city of Campinas, State of São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002;97:205-7.
7. Gonçalves EM, da Silva AJ, Eduardo MB, Uemura IH, Moura IN, Castilho VL, et al. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium hominis* associated with diarrhea outbreak in a day care unit in São Paulo. *Clinics*. 2006;61:119-26.
8. Carvalho-Almeida TT, Pinto PLS, Quadros CMS, Torres DMAGV, Kanamura HY, Casimiro AM. Detection of *Cryptosporidium* sp in non diarrheal faeces from children, in a day care center in the city of Sao Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop S. Paulo*. 2006;48:27- 32.
9. Carvalho-Almeida TT, Casimiro AM, Matté GR, Matté MH. An improved method for extracting *Cryptosporidium* sp. DNA from preserved faeces and potential application for cryptosporidiosis surveillance. *REVISA*. 2005;1:208-14.
10. Coupe S, Sarfati C, Hamane S, Derouin F. Detection of *Cryptosporidium* and identification to the species level by Nested PCR and restriction fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol*. 2005;43:1017-23.
11. Coupe S, Delabre K, Pouillot R, Houdart S, Santillana-Hayat M, Derouin F. Detection of *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Enterocytozoon bienersi* in surface water, including recreational areas: a one year prospective study. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2006; 47:351-9.
12. Nichols RAB, Campbell BM, Smith HV. Molecular fingerprint of *Cryptosporidium* oocysts isolated during water monitoring. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72:5428-35.

## Characterization of oils extracted from fruit seeds: fatty acid composition, tocopherols and carotenoids

---

Malacrida, CR. **Caracterização de óleos extraídos de sementes de frutas: composição de ácidos graxos, tocoferóis e carotenoides.** São José do Rio Preto, SP 2009 [Tese de Doutorado – Área de concentração: Ciências e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto – UNESP]. Orientadora: Neuza Jorge.

---

In Brazil, many edible fruits are processed to produce juice, candy, jam, concentrate and puree, originating a vast quantity of waste such as seeds, peels and pulps. The present study aims at investigating the possible use of fruit seeds, allowing to add economic value to these byproducts. Thus, the main goals of this work were: characterizing seeds of commonly cultivated fruits species in Brazil (orange, lemon, tangerine, melon, watermelon, papaya, passion fruit and guava) as for their proximal composition; determining the physico-chemical characteristics, fatty acid composition, tocopherols, carotenoids, total phenolic compounds and unsaponifiable matter in the oils extracted from these fruit seeds; and evaluating the oxidative stability and the antioxidant activity of the seed oils. The seeds were removed from the fruits, washed, dried at room temperature and the oils were extracted by using a Soxhlet extractor. All seeds showed considerable lipid contents (14.01-41.66%) and the oils revealed high unsaturated fatty acids percentage (67.55-88.14%) with prominent oleic and linoleic fatty acids. Regarding physico-chemical properties, the seed oils compared favorably to conventional vegetable oils and the unsaponifiable matter percentages were 0.70-1.51%. The total tocopherol concentrations ranged between 74.71 mg.Kg<sup>-1</sup> for papaya seed oil and 748.11 mg.Kg<sup>-1</sup> for watermelon seed oil, being the  $\delta$ -tocopherol quantified in all oils. The major carotenoids quantified in the analyzed oils were lutein,  $\beta$ -criptoxantina and  $\beta$ -carotene. The papaya seed oil showed the highest total carotenoid concentration (7.05 mg.Kg<sup>-1</sup>) while no carotenoid was quantified in the passion fruit seed oil. The total phenolic contents obtained in the analyzed oils (922.92-1,428.97 mg Gallic acid equivalents per kilogram of oil) were higher than the ones referenced within the soybean, sunflower, corn and rapeseed oils literature. The oxidative stability values ranged between 4.87 and 77.97 hours, showing that fatty acid and carotenoid compositions influence in the oils resistance to oxidation. All oils scavenged DPPH following the sequence: watermelon > melon > passion fruit > orange > guava > lemon > tangerine > papaya. A significant correlation could also be observed between antioxidant activity and the total tocopherol and  $\gamma$ -tocopherol contents. The results acquired by this study showed that it is possible to use these fruit seeds for oil extraction and to be transformed into economically valuable ingredients for the food, pharmaceutical and chemical industries.

**Key words.** seed oils, agroindustrial waste, fatty acids, tocopherols, carotenoids, antioxidant activity.

Tese disponível na Biblioteca do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.  
E-mail: cmalacrida@terra.com.br

---

## Errata - RIAL 68(3), 2009

### ▪ **Página 492**

**Onde se lê:** Rev. Inst. Lutz 68(1), 2009

**Leia-se:** Rev. Inst. Lutz 68(3), 2009

### ▪ **Página 498**

**Onde se lê:** Francisca Martins Bon

**Leia-se:** Francisca Martins Bion

### ▪ **Página 498**

**Onde se lê:** Fabiano Cleber Bertoldi Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Florianópolis - SC

**Leia-se:** Fabiano Cleber Bertoldi, Estação Experimental de Itajaí, Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina, Itajaí, SC

### ▪ **Página 499**

**Onde se lê:** Jéfferson Malveira Cavalcante Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia. Limoeiro do Norte, CE

**Leia-se:** Jéfferson Malveira Cavalcante, Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE

### ▪ **Página 501**

**Onde se lê:** Nelma de Mello Silva Oliveira Universidade Federal de Lavras, Laboratório de Biologia e Fisiologia de Microrganismo. Lavras, MG

**Leia-se:** Nelma de Mello Silva Oliveira, Universidade José do Rosário Vellano, UNIFENAS, Laboratório de Biologia e Fisiologia de Microrganismos, Universidade José do Rosário Vellano, UNIFENAS, Alfenas, MG



### 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](mailto: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 para a 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 os nomes 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 de todos os autores. 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 996.06<sup>1</sup>, de extração e determinação da GT por cálculo a partir dos AG obtidos por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (GC/DIC)<sup>2,3</sup>.

Segundo Chang et al<sup>31</sup>, 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 eletrophysiology of the heart*. US patent 5,529,067. 1995 Jun 25.

Casos não contemplados nesta instrução devem ser citados conforme indicação do *Committee of Medical Journals Editors (Grupo Vancouver)*, disponível em: <http://www.cmje.org>.

Referências a documentos não indexados na literatura científica mundial, em geral de divulgação circunscrita a uma instituição ou a um evento (teses, relatórios de pesquisa, comunicações em eventos, dentre outros) e informações extraídas de documentos eletrônicos, não mantidas permanentemente em sites, se relevantes, devem figurar no rodapé das páginas do texto onde foram citadas.

**2.5 NÚMEROS DE FIGURAS E TABELAS:** A quantidade de figuras e tabelas de cada manuscrito deve respeitar a quantidade definida para cada categoria de artigos aceitos pela RIAL. Todos os elementos gráficos ou tabulares apresentados serão identificados como *figura* ou *tabela*, e numerados sequencialmente a partir de um, e não como *quadros*, *gráficos*, etc.

**A) Tabelas:** Devem ser apresentadas em arquivos separados, numeradas consecutivamente com algarismos arábicos, na ordem em que foram citadas no texto. A cada uma deve-se atribuir um título breve, não se utilizando traços internos horizontais ou verticais. As notas explicativas devem ser limitadas ao menor número possível e colocadas no rodapé das tabelas e não no cabeçalho ou título. Se houver tabela extraída de outro trabalho, previamente publicado, os autores devem solicitar formalmente autorização da revista que a publicou, para sua reprodução.

**B) Figuras:** As ilustrações (fotografias, desenhos, gráficos, etc.) devem ser citadas como Figuras apresentadas em arquivos separados e numeradas consecutivamente com algarismos arábicos, na ordem em que foram citadas no texto. Devem conter título e legenda apresentados na parte inferior da figura. Só serão admitidas para publicação figuras suficientemente claras e com qualidade digital que permitam sua impressão, preferentemente 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.
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