

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

ISSN 0073-9855
RIALA6



Volume 68 número 3, 2009



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE

ISSN 0073-9855



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

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Volume 68 número 3, 2009
Setembro-Dezembro 2009

Publicação quadrimestral/Quadri-annual publication
Solicita-se permuta/Exchange desired

Diretor Geral do Instituto Adolfo Lutz

Marta Lopes Salomão

Editor Chefe

Cecília Cristina Marques dos Santos

Editor Adjunto

André Gustavo Tempone Cardoso

Editores Assistentes

Adriana Bugno

Cristina Takami Kanamura

Janete Alaburda

Luzia Setuko Umeda Yamamoto

Márcia Bittar Atuí

Raquel dos Anjos Fazioli

Sônia França Correia Barbosa

Setor de Publicações

Rocely Aparecida Bueno Moita

Conselho Editorial / Editorial Board

Adele Caterino de Araújo, São Paulo, Brasil.

Alexandre Januário da Silva, Atlanta, EUA

Antonio Ruffino Netto, Ribeirão Preto, Brasil.

Bernadette Dora G. de Melo Franco, São Paulo, Brasil.

Delia Rodrigues Amaya, Campinas, Brasil.

Elizabeth de Souza Nascimento, São Paulo, Brasil.

Elizabeth Castañeda, Bogotá, Colômbia.

Eliseu Alves Waldman, São Paulo, Brasil.

Fernando C. Schmitt, Porto, Portugal.

Gordon S. Shephard, Cape Town, África do Sul.

Guilherme Prado, Belo Horizonte, Brasil.

Hans P. van Egmond, Bilthoven, Holanda.

Heitor Franco de Andrade Junior, São Paulo, Brasil.

John Gilbert, York, UK.

Juan Carlos Palomino, Antuérpia, Bélgica.

Lígia Bicudo de Almeida Muradian, São Paulo, Brasil.

Luz Elena Cano Restrepo, Medellín, Colômbia.

Maria José Mendes Gianini, Araraquara, Brasil.

Marluce Bibbo, Pennsylvania, EUA.

Martin Emilio Munk, Copenhagen, Dinamarca.

Myrna Sabino, São Paulo, Brasil.

Paul W. Flinn, Kansas, EUA.

Pedro Paulo Chieff, 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

2009, 68(3)

ISSN 0073-9855

CDD₁₈ 614.07205

RIALA 6

ISSN 1983-3814 versão *on-line*

ISSN 2176-3844 versão 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>

Cartas ao editor:

Endereço / Address

Biblioteca do Instituto Adolfo Lutz

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

Tel./Fax (11) 3068-2869

Email: rial@saude.sp.gov.br

■ ARTIGO DE REVISÃO/ REVIEW ARTICLES

- 1226 **Metodologias para identificação de adulteração de queijo com leite de diferentes espécies**
Methodologies for identification of adulterations of cheese with milk of different species
SABRINA DA SILVA DIAS, VERÔNICA LOBATO, MARTA REGINA VERRUMA-BERNARDI 327-33

■ ARTIGOS ORIGINAIS/ ORIGINAL ARTICLES

- 1227 **Avaliação de indicadores higiênico-sanitários e das características físico-químicas em águas utilizadas em escolas públicas de nível fundamental**
Assessment of physical-chemical characteristics and hygienic and sanitary conditions indicators in water supplied at public primary schools
VANESSA FERNANDES DA SILVA ALMEIDA, SIBELE RIBEIRO DE OLIVEIRA, PAULA REGINA LUNA DE ARAÚJO JÁCOME, AGENOR TAVARES JÁCOME-JÚNIOR 334-40
- 1228 **Nutritional value and antinutritional factors of foliaceous vegetable *Talinum fruticosum***
Valor nutricional e fatores antinutricionais da folha vegetal *Talinum fruticosum*
JOANA FILOMENA MAGALHÃES LEITE, JOÃO ANDRADE DA SILVA, TATIANE SANTI GADELHA, CARLOS ALBERTO GADELHA, JOSÉ PINTO DE SIQUEIA JÚNIOR 341-5
- 1229 **Relação entre a composição nutricional e a origem floral de pólen apícola desidratado**
Correlation between nutritional composition and floral origin of dried bee pollen
ILLANA LOUISE PEREIRA DE MELO, ALEX SILVA DE FREITAS, ORTRUD MONIKA BARTH, LIGIA BICUDO DE ALMEIDA-MURADIAN 346-53
- 1230 **Avaliação da concentração de flúor em águas minerais engarrafadas disponíveis no comércio**
Assessment of fluoride concentration in bottled mineral waters commercially available
ANDRÉ LUIZ MARÇAL TERRERI, CECÍLIA CRISTINA MARQUES DOS SANTOS, MARIA DO ROSÁRIO VIGETA LOPES, RENATA FLAVIA MILANI SILVA, JÚLIO CÉSAR DA SILVA RODRIGUES 354-8
- 1231 **Determination and characterization of pathogens found in dairy products**
Determinação e caracterização de agentes patogênicos encontrados em produtos lácteos
ISABELA MATEUS MARTINS, DIRCE YORIKI KABUKI ARNALDO YOSHITERU KUAYE 359-65
- 1232 **Avaliação físico-química e sensorial de pães de forma enriquecidos com soro de leite em pó**
Physical-chemical and sensory evaluation of sandwich-loaf breads enriched with powdered whey
ADRIANA DE SOUSA LIMA, JANEYRE FERREIRA MACIEL, RITA DE CÁSSIA RAMOS DO EGYPTO QUEIROGA, EUFRÁSIO DE ANDRADE LIMA NETO, ULISSES UMBELINO DOS ANJOS, LARISSA RAPHAELA GONÇALVES DE FARIAS 366-72

- 1233 **Estudo da composição físico-química e aceitação de bananas comerciais por meio de análise multivariada**
Study on physical-chemical composition and acceptance of marketed banana jams by means of multivariate analysis
ROSSANA CATIE BUENO DE GODOY, EDNEIDE LUCIANA SANTIAGO MATOS, DANIELE DE VASCONCELLOS SANTOS, TATIANE DA SILVA AMORIM, NINA WASZCZYNSKYJ, MANOEL ALVES DE SOUSA NETO 373-80
- 1234 **Influência do transporte a granel na qualidade do leite cru refrigerado**
Influence of the bulk milk shipping on the quality of cooled raw milk
MARCO ANTÔNIO PEREIRA DA SILVA, PRISCILA ALONSO DOS SANTOS, JACIRA DOS SANTOS ISEPON, CÍNTIA SILVA MINAFRA E REZENDE, MOACIR EVANDRO LAGE, EDMAR SOARES NICOLAU 381-7
- 1235 **Influência da densidade de estocagem na composição química, no teor de colesterol e no perfil de ácidos graxos em Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* LINNAEUS, 1857)**
Influence of stocking density on chemical composition, cholesterol contents and fatty acids profile in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* LINNAEUS, 1857)
MARIA EMÍLIA DA SILVA MENEZES, EDMA CARVALHO DE MIRANDA, DENISE MARIA PINHEIRO, FELIPE TENÓRIO CINTRA, MOACELI DE MAGALHÃES FREIRE, CYRO REGO CABRAL JÚNIOR, ANTÔNIO EUZÉBIO GOULART SANT'ANA 388-98
- 1236 **Avaliação das condições higiênico-sanitárias em serviços de alimentação**
Evaluation of the hygienic-sanitary conditions in food services
NAIRA POERNER, ELISEU RODRIGUES, ANTÔNIO LAURI PALHANO, ÂNGELA MARIA FIORENTINI 399-405
- 1237 **Parâmetros físico-químicos de qualidade de peixe salgado e seco (bacalhau) comercializado em mercados varejistas**
Physical-chemical quality parameters of salted and dried fish (codfish) traded by retail markets
ELIANE TEIXEIRA MÁRSICO, ISMAR ARAUJO DE MORAES, CARLA DA SILVA, VIVIANE BRANDÃO BARREIRA, SAMIRA PIROLA SANTOS MANTILLA 406-10
- 1238 **Características físico-químicas, microbiológicas e perfil de ácidos graxos de queijos de leite de cabra comercializados**
Goat milk cheese analysis on physical-chemical characteristics, fatty acids microbiological quality and profile aspects
RITA DE CÁSSIA RAMOS DO EGYPTO QUEIROGA, SUÉLLEN MARIA GONÇALVES MATIAS, MARCELA MARREIRO DOS SANTOS, ILSA CUNHA BARBOSA, ESTEFÂNIA FERNANDES GARCIA, EVANDRO LEITE DE SOUZA, CARLOS EDUARDO VASCONCELOS DE OLIVEIRA, HELOISA MARIA HOLTZ SOUSA 411-8
- 1239 **Composição nutricional da carne da tartaruga-da-Amazônia (*Podocnemis expansa*) criada em cativeiro e em idade de abate**
Nutritional composition of meat from tartaruga-da-Amazônia (Amazonian turtle) *Podocnemis expansa* bred in captivity and at slaughter age
ARLENE GASPARGAR, TEÓFILO JOSÉ PIMENTEL SILVA 419-25
- 1240 **Qualidade nutricional e aceitabilidade de barras de cereais adicionadas de frutos de murici-passa**
Nutritional quality and acceptability of cereal bars added of murici dried fruits
MARÍLIA MENDONÇA GUIMARÃES, MARIA SEBASTIANA SILVA 426-33
- 1241 **Atividade antifúngica do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* frente a cepas de *Candida albicans* e *Candida tropicalis* isoladas de infecções nosocomiais**
Antifungal activity of *Cymbopogon citratus* essential oil on *Candida albicans* and *Candida tropicalis* strains isolated from nosocomial infections
FERNANDO DE SÁ SILVA, TATIANE MORAIS FERREIRA, GUILHERME RODRIGUES TEODORO, ANNA CAROLINA BORGES PEREIRA DA COSTA, AGUIDA MARIA, MILTON BELTRAME JUNIOR, MARCOS JOSÉ SALVADOR, CLAUDETE RODRIGUES DE PAULA, SÔNIA KHOURI 434-41

- 1242 **Mercury and methylmercury contents, fatty acids profile, and proximate composition of fish consumed in Cananéia, São Paulo, Brazil**
 Avaliação da concentração de mercúrio total e metilmercúrio e composição de ácidos graxos em pescado consumido em Cananéia, São Paulo, Brasil
 MICHEL RODRIGUES DA SILVA MORALES CURCHO, LUCIANA APARECIDA FARIAS, SUELI REGINA BAGGIO, BARBARA CORTOPASSI FONSECA, SORAIA MARIA DO NASCIMENTO, MARITSA CARLA DE BORTOLI, ELISABETE DE SANTIS BRAGA, DÉBORAH INÊS TEIXEIRA FÁVARO 442-50
- 1243 **Determinação de mercúrio e metilmercúrio em amostras de cabelo e de peixes**
 Mercury and methylmercury determination in fish and hair samples
 LUCIANA APARECIDA FARIAS, DÉBORAH INÊS TEIXEIRA FÁVARO, MARINA BEATRIZ AGOSTINI VASCONCELLOS..... 451-60
- 1244 **Avaliação de requisitos referentes à implantação do sistema de gestão da qualidade nos Laboratórios Centrais de Saúde Pública**
 Evaluation of requirements for implementing quality management system at the Central Public Health Laboratories
 ANA CAMILA TEIXEIRA DE CAMPOS, SILVÂNIA VAZ DE MELO MATTOS 471-5
- 1245 **Investigação da atividade antimicrobiana do veneno de *Rhinella icterica* (Amphibia, Anura)**
 Research of the antimicrobial activity of the poison from *Rhinella icterica* (Amphibia, Anura)
 ÉRIKA GRACIELLE PINTO, ANDREA CARDADOR FELIPE, DANIEL NADALETTO, VERA LÚCIA MORES RALL, ROSÂNGELA MARQUES MARTINEZ 476-81
- 1246 **Epidemiologia do câncer de mama em homens**
 Epidemiology of breast cancer in men
 PATRÍCIA HAAS, ALESSANDRA BORTOLUZZI COSTA, ALYNE PROENÇA DE SOUZA..... 482-7
- **COMUNICAÇÃO BREVE / BRIEF COMMUNICATION**
- 1247 **Proteção solar, uma questão de saúde pública: avaliação das informações contidas nos rótulos dos protetores solares mais comercializados no Brasil**
 Sunscreen, a public health issue: assessment of information on the labels of most solar protectors marketed in Brazil
 SÔNIA RIBEIRO DORIA, ELOISA NUNES ALVES, KÁTIA MIRIAN PEIXOTO MENEZES, THEREZINHA COELHO BARBOSA TOMASSINI..... 488-91
- 1248 **Activity of nematophagous fungi *Pochonia chlamydosporia* and *Paecilomyces lilacinus* on *Dipylidium caninum* egg capsule**
 Atividade dos fungos nematófagos *Pochonia chlamydosporia* e *Paecilomyces lilacinus* sobre cápsulas de ovos de *Dipylidium caninum*
 JULIANA MILANI ARAUJO, FABIO RIBEIRO BRAGA, JACKSON VICTOR DE ARAÚJO, ROGÉRIO OLIVA CARVALHO..... 492
- **RESUMOS DE TESES E DISSERTAÇÕES**
- Investigação da genotoxicidade de larvicidas biológicos e sintéticos utilizados para o controle de *Aedes aegypti***
 Genotoxicity investigation of biologic and synthetic larvicide utilized for the control of *Aedes aegypti*.
 MELO, MEB 492

Metodologias para identificar adulteração em queijos produzidos com leite de diferentes espécies de animais

Methodologies for identifying the adulterants in cheese manufactured with milk from different animal species

RIALA6/1226

Sabrina da Silva DIAS^{1*}, Verônica LOBATO², Marta Regina VERRUMA-BERNARDI³

*Endereço para correspondência: Rua Geraldo Matos Moreira, 50 - Campo Grande, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, CEP: 23087-170

¹UFRRJ, Seropédica, RJ, Brasil

²Departamento de Tecnologia de Alimentos, UFRRJ, Seropédica, RJ, Brasil.

³Departamento de Tecnologia Agroindustrial e Sócio-Economia Rural, DTAiSER/CCA/UFSCar, Araras, SP, Brasil.

Recebido: 27.05.2009 – Aceito para publicação: 08.11.2009

RESUMO

A adulteração de produtos lácteos pode ocorrer de diferentes formas. A diversidade de produtos e os seus valores agregados estimulam a fraude, que lesam os consumidores em relação as características sensoriais, nutricionais e preço. Diversos métodos podem ser utilizados para identificar as fraudes, pela avaliação dos distintos componentes do leite. O objetivo da presente revisão é de apresentar e discutir os métodos de referência utilizados na análise de adulteração de queijos baseados na avaliação de diferentes proteínas do leite e de suas respectivas espécies de animais dos quais originam o leite.

Palavras-chave. vigilância sanitária de produtos, controle e fiscalização de alimentos e bebidas, alimento, laticínios, queijo.

ABSTRACT

Dairy products adulteration may be done by different ways. The diversity of products and their compound values favor to be deceived, and consequently cheat the consumers as for their sensory and nutritional characteristics and price. Several methodologies can be used for identifying adulterants in cheeses based on varied milk components. This review aimed to comment upon and discuss the reference methodologies employed for analyzing adulterated cheese based on the different milk proteins and the respective animal species from which the milk was originated.

Key words. sanitary surveillance of products, control and surveillance of foods and drinks, food, dairy products, cheese.

INTRODUÇÃO

Estudos têm demonstrado que produtos lácteos durante décadas vêm sofrendo adulterações de diferentes formas: adição de água, soro, retirada de componentes, mistura de leite de diferentes espécies, adição de espessantes e etc. O mercado oferece uma infinidade de produtos atendendo aos interesses específicos de cada consumidor, com preços variados. Esses consumidores buscam qualidade e produtos mais saudáveis e prezam pela confiança de que estão levando o que é especificado no rótulo. Nas embalagens, a origem dos ingredientes utilizados para a fabricação deve ser relatada, pois a adição não mencionada de ingredientes fere o direito do consumidor e a legislação vigente.

São considerados matérias-primas ou produtos fraudados aqueles que apresentem “modificações espontâneas ou propositais de natureza física, química ou biológica que alterem características sensoriais, ou sua composição

intrínseca, comprometendo seu valor nutritivo. Assim, o produto pode ser considerado adulterado quanto tenha sido empregada substância de qualquer qualidade, tipo ou espécie diferente das expressas na formulação original”¹.

O Código Penal Brasileiro especifica a definição de adulteração no capítulo III “Dos crimes contra a saúde pública”, no artigo 272, “Corromper, adulterar, falsificar ou alterar substâncias de produtos alimentícios destinados ao consumo, tornando-o nocivo à saúde ou reduzindo-lhe o valor nutritivo”, com pena de reclusão, de 4 a 8 anos e multa².

O Ministério da Agricultura (MAPA), Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Código de Defesa do Consumidor respaldam o consumidor na hora de exigir as características dos produtos oferecidos no comércio do país. A RDC (Resolução da Diretoria Colegiada) n° 259, de 20 de setembro de 2002³, o Decreto-lei n° 986, de 21 de outubro de 1969⁴, e Portaria n° 157, de 19 de agosto de 2002⁵, discriminam os componentes presentes nos rótulos das embalagens de produtos de origem animal e lácteos. A rotulagem deve estar de acordo com a elaboração do produto, sua origem, peso, marca, denominação de venda, sendo obrigatórios a lista de ingredientes, a validade e o lote. Dessa forma a lei n° 8078, de 11 de setembro de 1990⁶, que se refere ao código de defesa do consumidor, ampara o consumidor de possíveis alterações provocadas pelo produtor na rotulagem, levando a interpretações duvidosas quanto aos componentes originais, sendo um direito básico do consumidor, a informação clara, adequada, com especificações corretas da quantidade

e qualidade do produto, além da proteção contra a publicidade enganosa no produto final.

Os produtos lácteos de caprinos, ovinos e bubalinos, além de representarem iguarias especiais, em relação às características sensoriais, como aroma e sabor, apresentam relação com razões nutricionais, econômicas e religiosas⁷.

As flutuações na disponibilidade do leite de outras espécies e o preço mais elevado em comparação ao bovino incentivam os produtores a fraudarem produtos como queijos⁸.

Para detectar as possíveis fraudes, métodos de referência podem ser utilizados se baseando na análise das diferentes proteínas do leite, caseínas e proteínas do soro. São mencionados na literatura métodos de eletroforese, imunologia, cromatografia e espectroscopia de infravermelho, que muitas vezes, além de identificarem a diferença entre os produtos, quantificam a mistura de forma confiável e sensível.

A caseína, principal proteína do leite, pode ser separada em quatro grupos: caseínas α , β , κ e γ , apresentando diferenças simples na sua cadeia base de ácidos nucleicos⁹, segundo a espécie de origem, como pode ser exemplificado na Figura 1.

Esta revisão teve como objetivo abordar os métodos para identificação de adulteração por adição de leite de diferentes espécies em queijos, baseados nas diferenças das caseínas entre as espécies, como representado na Tabela 1, visando garantir a qualidade e segurança dos produtos adquiridos pelos consumidores.

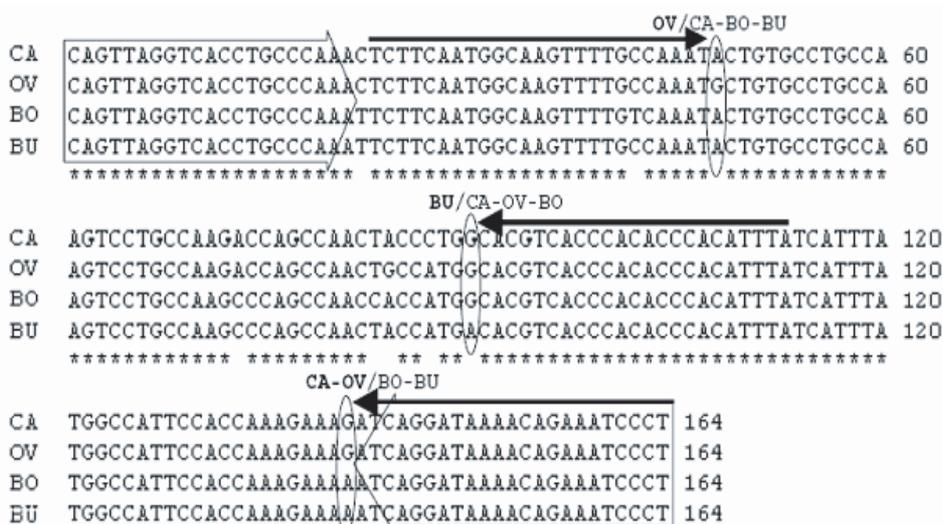


Figura 1. Diferenças na seqüência multiplex da κ caseína no leite segundo a espécie de origem. Fonte: REALE *et al*, 2008¹⁹

Tabela 1. Métodos aplicados à análise de adulteração por técnicas protéicas

Métodos de identificação		Proteína analisada	Referência	
Eletroforéticos	Gel de Poliacrilamida com sódio dodecil sulfato (SDS - PAGE)	β - caseína	47, 45,32	
	Gel de Poliacrilamida com Uréia (Uréia - PAGE)	α_{σ_1} - caseína		
	Bidimensional (2D-PAGE)	α_{σ_2} - caseína		
	Focagem isoelétrica (IEF)	γ - caseína Para- κ - caseína		
Imunoenzimático ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	Elisa Indireto	Anticorpos Monoclonais	10, 12, 17, 18, 48	
	Elisa Sanduíche	Anticorpos Policlonais		
				β - caseína γ - caseína
				α_{σ_2} - caseína κ - caseína IgG
Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	Multiplex Simplex	DNA mitocondrial	24, 28, 19, 26, 23, 21, 22, 27, 25	
	Duplex	Células Somáticas Leucócitos		
	SYBR Green Real -Time (restrição enzimática)	Epitéliomamário		
	SSCP (Single- Stranded Conformation Polymorphism)	β - caseína		
	RFLP (Restricion Fragment Length Polymorphism)			
Espectroscopia Infravermelho	Near Infrared spectroscopy		44, 39, 40, 38	
HPLC (High-performance Liquid Chromatography)	IE-HPLC (Íon Exchange HPLC)	β - caseína	45, 47, 46	
	RP-HPLC (Reverse -phase HPLC)	α_{σ_1} - caseína α_{σ_2} - caseína γ - caseína κ - caseína		

MÉTODOS IMUNOLÓGICOS

Diversos métodos imunológicos, para detecção de caseína bovina, podem ser encontrados na literatura¹⁰. No início dos anos 70, o desenvolvimento de técnicas imunológicas que utilizavam a enzima como marcador tornou esses testes aplicáveis a alimentos⁸.

A técnica imunológica está baseada na presença de antígenos e anticorpos em uma amostra, no caso, frações específicas de proteínas do leite bovino. Como anticorpos, são utilizados os monoclonais, (células homogêneas derivadas de uma célula produtora de anticorpos, onde todos os anticorpos possuem a mesma especificidade necessária para um antígeno), ou policlonais (clones de células únicas propagadas em meio de cultura com uma única especificidade), altamente específicos, que ao reagirem formam um complexo antígeno-anticorpo precipitado¹¹. Segundo Hurley (2004)¹² o tipo de anticorpo

utilizado pode alterar a eficiência do ELISA: os anticorpos policlonais podem ser menos específicos que os anticorpos monoclonais. Segundo Benjamini (2002)¹¹, esse fato pode ser devido à reação cruzada de anticorpos policlonais, onde essas células, tendo especificidade um pouco menor, reagem com duas moléculas que apresentam o mesmo antígeno, mas que são diferentes em outros aspectos.

Embora haja outras técnicas para análise de adulteração baseada na determinação de proteínas, o método imunológico ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent assay ou Ensaio de Imunoabsorção ligado à enzima) mantém-se como alternativa viável devido a sua simplicidade, baixo tempo de elaboração, especificidade e sensibilidade¹³, além de não requerer equipamentos especializados¹⁴. Para Richter (1997)¹⁰, o ELISA indireto apresenta sensibilidade de 1 – 10% em leite ou queijo, e o ELISA sanduíche apresenta limite de detecção de 0,5% na mistura desses mesmos produtos.

O teste ELISA está caracterizado como imunoen-saio de fase sólida e aproveita a propriedade dos plásticos de adsorver proteínas na superfície em forma de camada única, permitindo que a maioria do antígeno possa reagir com anticorpos correspondentes, marcados com uma enzima que poderá ser detectada por colorimetria quando adicionado substrato¹¹.

Existem duas variações para o teste ELISA, segundo Asensio *et al.* (2008)¹⁴: o ELISA indireto, utilizando dois anticorpos, um específico ao antígeno e outro conjugado à enzima. Neste, o segundo anticorpo dará a reação enzimática, que quando presente poderá ser observada e quantificada por diferentes técnicas. Na segunda forma mais utilizada, o ELISA sanduíche, o antígeno é colocado entre dois anticorpos, para detecção e captura do anticorpo e um dos anticorpos estará conjugado com a enzima para que possa ser analisada a formação do complexo, por técnicas como cromatografia, fluorescência e densitometria. Dessa forma, os testes ELISA podem apresentar resultados de forma qualitativa e quantitativa.

Os testes imunológicos são baseados, principalmente, na caseína como antígeno, devido a sua estabilidade a tratamentos térmicos^{15,16}, o que possibilita a utilização destes em análises de produtos lácteos pasteurizados¹². As principais frações da caseína analisadas são as β -caseína, α_2 -caseína, κ -caseína e a imunoglobulina IgG^{10,12,17,18}. O limite de detecção desses marcadores pode detectar até 0,1% de antígeno bovino em leite de outras espécies¹².

MÉTODOS BASEADOS EM DNA

A técnica de PCR (Polymerase chain Reaction ou Reação em cadeia da polimerase) baseia-se na análise de DNA, amplificando fragmentos de DNA mitocondrial de células somáticas, leucócitos, células mamárias e β -caseína¹⁹.

É possível extrair DNA de produtos lácteos processados utilizando *primers* (Oligonucleicos específicos), codificando a sequência do gene desejado, amplificando e identificando por eletroforese⁸.

Essa técnica possibilita que sequências de DNA sejam multiplicadas em milhões de cópias, facilitando sua análise genética, aumentando a sensibilidade, especificidade e analisando um grande número de amostras simultaneamente. Esse processo se assemelha ao processo de replicação de células vivas²⁰.

Os *primers* padrões, para análise da sequência amplificada podem ser produzidos através de análise do sangue dos animais alvos ou consultando bibliotecas virtuais como GenBank Database, no site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)^{21,19,22} e “HUSAR” (<http://genome.dkfz-heidelberg.de/menu/husar>)²³.

Essa técnica apresenta sensibilidade alta, de acordo com Feligini *et al.* (2005)²¹, no nível de 0,5% de mistura de espécies, podendo chegar a 0,1% de limite de detecção²², para Masková & Paulicková (2006)⁷ essa sensibilidade não ultrapassa o limite de 1% de mistura. Sua alta sensibilidade e especificidade na análise de adulterações compensam o preço alto da técnica, sendo amplamente utilizada na Europa.

Diferentes técnicas podem ser utilizadas na ampliação desses fragmentos de DNA como: Multiplex-PCR^{24,22,21,19}, Simplex-PCR²⁴, SSCP-PCR (Single-Stranded Conformation Polymorphism, analysis)^{23,25}, Duplex-PCR^{26,27}, SYBR-Green Real-Time-PCR²¹ e RFLP-PCR (Restriction Fragment Length Polymorphism)^{24,25}.

A identificação dessas espécies utiliza a técnica de eletroforese, mas comumente, com gel de agarose^{24,22,21,19,26,28} e em alguns casos gel de poliacrilamina²³.

Técnicas como SSCP e RFLP-PCR, possibilitam analisar sequência de DNA que podem sofrer polimorfismo genético como no caso da β -caseína e κ -caseína, que apresentam formas distintas, a β -caseína A e B e κ -caseína K2 e KY, que apresentam corrida diferente na análise por eletroforese. No leite de búfala esta variação é rara, porém abundante no leite bovino^{29,30}.

MÉTODOS ELETROFORÉTICOS

A eletroforese vem do grego “transporte por eletricidade”, onde as proteínas migram submetidas a um campo elétrico, as cargas positivas e negativas são atraídas para seus pólos contrários correspondentes e assim sendo possível sua separação e identificação. Além de sua carga, sua forma, tamanho e associação com outros íons, podem alterar sua mobilidade³¹.

Essa técnica apresenta alta sensibilidade, porém com percentuais distintos conforme o tipo, segundo Egito *et al.* (2006)³², o método Ureia-PAGE (Gel de poliacrilamina contendo ureia) pode detectar em torno de 2,5% de adição de leite bovino em outras espécies e 1% de leite misturado através do método de IEF (Isoelectric Focusing ou Focalização Isoelétrica). Dennis (1998)³³, utilizando EC (Eletroforese Capilar) relata limite de

detecção de fraude ao redor de 2,5%, empregando o modo de separação Ureia-PAGE e Borková & Snaselová (2005)¹³, através de IEF, relataram a possibilidade de detecção de 0,5% e 1% de adição de leite por fraude. Esta diferença de sensibilidade está no tipo de separação das proteínas nos diferentes meios, dessa forma o objetivo da separação indicará o tipo de eletroforese selecionado.

O método de Ureia-PAGE separa por diferença na carga elétrica e o SDS-PAGE (Gel de Poliacrilamida com sódio dodecil sulfato) por tamanho da molécula, esses dois tipos podem separar por grupos de proteínas e variações genéticas^{32,34}. Na IEF, os diferentes pontos isoelétricos, onde a carga dos compostos é nula, determinam a individualidade das caseínas em gradiente de pH desejado. Sendo este um método oficial para a União Europeia, onde a EC 213/2001³⁵, anexo XV, especifica a metodologia para identificação de adulteração analisando - caseína, podendo ser utilizada em produtos lácteos processados e crus¹³.

Na eletroforese capilar, a separação é feita por diferença na carga das proteínas analisadas, técnica também conhecida como Eletroforese Capilar em Zona (CZE)^{36,37}. Na eletroforese bidimensional, há separação das proteínas de idêntico massa molar, porém com diferentes pontos isoelétricos, e vice-versa, pois soma a separação pelo método SDS-PAGE com a IEF³¹.

MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

Nos últimos anos, uma nova técnica para determinação de proteínas se apresentou como alternativa para análise na indústria de alimentos. A espectroscopia de infravermelho pode ser utilizada para identificação de componentes do alimento, assim como sua quantificação, tendo a vantagem de ser um método rápido, podendo chegar a 400 amostras/h, com custo moderado de equipamentos, facilidade de preparação da amostra, podendo ser realizada muitas vezes no alimento íntegro^{38,39}.

Este método analisa vários parâmetros ao mesmo tempo, podendo separar proteína, caseína e proteína do soro⁴⁰, lipídios, lactose, cinzas, entre outros⁴¹, além de verificar vários tipos de adulteração, como no relato de Sato et al (1990)⁴² onde a mistura de gordura animal e vegetal puderam ser analisadas em manteiga, Frankheizen (1992)⁴³ analisou o tempo de maturação de queijo Edam e Gouda com até sete meses, já que estes são vendidos com preço decorrente do seu tempo de maturação. González-Martin et al. (2007)⁴⁴ analisaram o percentual de adição

de leite de diferentes espécies ao longo de seis meses de maturação, sendo possível detectá-los com segurança, após este período, se mostrando uma alternativa no combate a adulteração de queijos maturados em comparação com HPLC que analisa com limite de 4 a 8 semanas de maturação.

A técnica para análise das matérias-primas de diferentes espécies se baseia nos diferentes picos espectrais apresentados pelas proteínas das distintas espécies após sofrerem isolamento, com alteração de pH, dessa forma uma análise estrutural dos grupos funcionais presentes em determinadas regiões do espectro, a partir de seus perfis característicos, podem ser quantificados através de curvas analíticas³⁸.

MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Técnicas de cromatografia líquida (HPLC) estão entre as técnicas para separação de proteínas, as mais utilizadas são RP-HPLC (Reverse-phase High Pressure Liquid Chromatography ou cromatografia de fase reversa), onde as substâncias são separadas devido a diferença de hidrofobicidade, e IE-HPLC (Íon Exchange HPLC ou Cromatografia de troca iônica), onde a separação se baseia na diferença de afinidade dos íons com a coluna, ou outro componente, como pH, força iônica da coluna, que podem variar dependendo das proteínas analisadas^{45,13}.

Borvoká & Snaselová (2005)¹³ em sua revisão apresentaram as duas técnicas com finalidade de identificar e quantificar a presença de proteínas do soro, β -lactoglobulina e α -lactoglobulina, com detecção da origem do leite adicionado na quantidade mínima de 2%¹³, ou 1%⁴⁶.

Mayer (2005)⁴⁵ utilizou a IE-HPLC para separar proteínas do leite, como a α_{s1} -caseína e para-k-caseína, em leites e queijos frescos. Haza *et al* (2005)⁴⁷ relatou as duas técnicas de HPLC para separação das proteínas e posterior caracterização por ELISA.

Desta forma podemos concluir, que as técnicas de detecção de adulteração de queijos com leite de diferentes espécies são muito pertinentes e sensíveis, na função de garantir a segurança do consumidor em relação aos produtos adquiridos no comércio varejista.

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952. Aprova o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Diário Oficial [da] União, Brasília, DF, 2007; p.10785, 07 de jul de 1952 Seção 1.
2. Constituição Federal. Lei 11.101, de 9 fevereiro de 2005. Capítulo III Dos crimes contra saúde pública, art. 272. Código Penal. Código de Processo Penal Organização Luiz Flávio Gomes, 9 Ed. Ver., ampl., e atual. SP. Editora Revista dos Tribunais, RT minicódigos; 2007: 310.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC n 259 de 20 de setembro de 2002. Aprova o Regulamento técnico sobre rotulagem de alimentos embalados. Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil. Brasília, DF, 23 de set. de 2002, Seção 1.
4. Brasil. Ministério da Marinha de Guerra, Ministério do Exército, Ministério da Aeronáutica Militar. Decreto-lei n 986 de 21 de outubro de 1969. Institui normas básicas sobre alimentos. Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil. Brasília, DF, p. 8935 de 21 out. de 1969.
5. Brasil. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comercio Exterior. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). Portaria n 157, de 19 de agosto de 2002. Aprova o Regulamento técnico metroológico estabelecendo a forma de expressar o conteúdo líquido a ser utilizado nos produtos pré-medidos. Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil. Brasília, DF, 20 de ago 2002, Seção 1.
6. Brasil. Congresso Nacional. Lei nº 8078 de 11 de setembro de 19990 (Código de Defesa do Consumidor). Dispõe sobre a proteção do consumidor e dá outras providencias. Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil. Brasília, DF, 12 de set de 1990, Suplemento.
7. Mosková E, Paulicková I. PCR-Based detection of cow's milk in goat and sheep cheeses marketed in the Czech Republic. *Czech Journal Food Science* 2006; 24(3): 127-32.
8. Veloso ACA. Detecção de Adulteração em produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas. *Química Nova* 2002; 25(4): 609-15.
9. Sgarbieri VC. Revisão: Propriedades Estruturais e Físico-Químicas das Proteínas do Leite. *Brazilian Journal of Food Technology* 2005; 8(1): 43-56.
10. Richter W, Krause I., Graf C, Sperrer I., Schwarzer C, Klostermeyer H. An indirect competitive ELISA for the detection of cow's milk and caseinate in goat's and ewes' milk and cheese using polyclonal antibodies against bovine γ - caseins. *Z Lebensm Unters Forsch A* 1997; 204 : 21-6.
11. Benjamini E, Coico R, Sunshine G. Interações Antígeno-Anticorpo, Imunoensaios e Sistemas Experimentais. In: *Imunologia*. 4ª ed. São Paulo: Ed Guanabara Koogan S.A; 2002. p. 51-68
12. Hurley IP, Coleman RC, Ireland HE, Williams HH. Measurement of bovine IgG by indirect Competitive ELISA as a means of detection milk adulteration. *Journal Dairy Science* 2004; 87: 543-9.
13. Borková M, Snáselová J. Possibilities of different animal milk detection in milk and dairy products – a review. *Czech Journal Food Science* 2005; 23(2): 41-50.
14. Asensio L., González I., García T, Martín R. Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Food Control* 2008; 19(1): 1-8.
15. Douglas FW, Greenberg R, Farrell Jr HM, Edmondson LF. Effects of ultra-high-temperature pasteurization on milk proteins. *Food Agriculture Food Chemistry* 1981; 29(1):11-5.
16. Pintado ME, Malcata FX. Effect of thermal treatment on the protein profile of whey from ovine and caprine milk throughout lactation. *International Dairy Journal* 1996; 6: 497-518.
17. Haza AI, Morales P, Martín R, García T, Anguita G, Sanz B, Hernández PE. Detection and Quantification of goat's cheese in ewe's cheese using a monoclonal antibody and two ELISA formats. *Journal of the Science of food and agriculture* 1999; 79: 1043-7.
18. Haasnoot W, Smits NGE, Kemmers-Voncken AEM, Bremer MGEG. Fast Biosensor immunoassays for the detection of cow's milk in the milk of ewes and goats. *Journal of Dairy Research* 2004; 71: 322-9.
19. Reale S, Campanella A, Mergiolli A, Pilla F. A novel method for species identification in milk and milk-based products. *Journal of dairy Research* 2008; 75:107-12.
20. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária [EMBRAPA]. Fundamentos teórico-prático e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio de reação em cadeia de polimerase [Recurso Eletrônico]. São Carlos: EMBRAPA Pecuária Sudeste. Disponível em: <http://www.cppse.embrapa.br/publicacaogratis/e-books/LVFundDNA.pdf>. 2007.
21. Felligini M, Bonizzi I., Curik VC, Parma P, Greppi GF, Enne G. Detection of Adulteration in Italian Mozzarella Cheese Using Mitochondrial DNA Templates as Biomarkers. *Food Technology Biotechnology* 2005; 43(1): 91-5.
22. López-Calleja I, González -Alonzo I, Fajardo V, Rodríguez, MA, Hernández PE., García T, Martín R. PCR detection of cow's milk in water buffalo milk and Mozzarella cheese. *International Dairy Journal* 2005; 15: 1122-9.
23. Plath A, Krause, I., Einspanier, R. Species Identification in dairy products by three different DNA-based techniques. *Z Lebensm Unters Forsch A* 1997; 205: 437-41.
24. Bottero, M.T., Civera, T., Nucera, D., Rosati, S., Sacchi, P., Turi, R.M. A multiplex polymerase chain reaction for the identification of cow's, goat's and sheep's milk in dairy products. *International Dairy Journal* 2003; 13: 277-82,.
25. Bania, J.; Ugorski, M.; Polanowski, A.; Adamczyk, E. Application of polymerase chain reaction for detection of goat's milk adulteration by milk of cow. *Journal of Dairy Research* 2001; 68: 333-6.
26. Rea, S., Chikuni, K., Branciarri, R., Sangamayya, R.S., Ranucci, D., Avellini, P. Use of duplex polymerase chain reaction (duplex – PCR) technique to identify bovine and water buffalo milk used in making mozzarella cheese. *Journal of Dairy Research* 2001; 68: 689-98.
27. Mafra, I.; Ferreira, I.M.P.L.V.O.; Faria, M.A.; Oliveira, B.P.P. A novel approach to the quantification of bovine milk in ovine cheeses using a duplex polymerase chain reaction method. *Journal of agricultural and food chemistry* 2004; 52: 4943-7.
28. Feligini, M., Alim, N., Bonizzi, I., Enne, G., Aleandri, R. Detection of cow milk in water buffalo cheese by SYBR Green Real-Time PCR: Sensitivity Test on Governing Liquid Samples. *Pakistan Journal of Nutrition* 2007; 6(1): 94-8.
29. Aschaffenburg, R.; Sen, A.; Thompson, P. The Casein of Buffalo Milk. *Comp. Biochem. Physiol.* 1968; 27: 621 – 3.
30. Otaviano, A.R.; Tonhati, H.; Sena, J.A.D.; Muñoz, M.F.C. Kappa –casein gene study with molecular markers in female buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Genetics and Molecular Biology* 2005; 28(2): 237-41.

31. Silva, C.L.S.P. Eletroforese Bidimensional: Princípios e Aplicações. *Ciências Agrárias e Saúde* 2002; 2(1): 74-8.
32. Egito, A.S., Rosinha, G.M.S., Laguna, L.E., Miclo, L., Girarder, J.M., Gaillard, J.L. Método eletroforético rápido para detecção da adulteração do leite caprino com leite bovino. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 2006; 58(5): 932-9.
33. Dennis, M.J. Recent developments in food authentication. *Analyst* 1998; 123: 151R-156R.
34. Amigo, L.; Ramos, M.; Martin-Alvarez, P.J. Effect of technology parameters on electrophoretic detection of cow's milk in ewe's milk cheeses. *Journal Dairy Science* 1991; 74: 1482-90.
35. European Commission. EC 213/2001 Methods for the analysis and quality evaluation of milk and milk products. *Official Journal of the European Communities* 2001; 44:L.37/1 –L37/99.
36. Silva, J.A.F Da. Terminologia para técnicas analíticas de eletromigração em capilares. *Química Nova* 2007; 30(3): 740-4.
37. Molina, E.; Frutos, M. De; Ramos, M. Capillary electrophoresis characterization of the casein fraction of cheeses made from cow's, ewes' and goats' milks. *Journal of Dairy Research* 2000; 67: 209-16.
38. Rodriguez-Otero, J.L.; Hermida, M.; Centeno, J. Análisis of dairy products by near infrared spectroscopy: A review. *Journal Agriculture Food Chemistry* 1997; 45(8): 2815-9.
39. Pappas, C.S.; Tarantiles, P.A.; Moschopoulou, E.; Moatsou, G.; Kandarakis, I. Identification and differentiation of goat and sheep milk based on diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy (DRIFTS) using cluster analysis. *Food Chemistry* 2008; 106: 1271-7.
40. Qiaoqian, L.; Puhan, Z. Determination of protein and casein in milk by fourth derivative UV spectrophotometry. *Analytica Acta* 1999; 393: 227-34.
41. Barbano, D.M.; Dellavalle, E. Rapid method for determination of milk casein content by infrared analysis. *Journal of Dairy Science* 1987; 70:1524-8.
42. Sato, T.; Kawano, S. Detection of Foreign fat adulteration of milk fat by near infrared spectroscopic method. *Journal of Dairy Science* 1990; 73: 3408-13.
43. Frankhuizen, R. Near infrared analysis of dairy products. In: Burns, D.A, Churczak, E.W. *Handbook of near infrared analysis*. EUA: Ed Marcel Dekker; 1992.
44. González- Martín, I., Hernández-Hierro, J.M., Morón - Sancho, R., Salvador- Esteban, J., Vivar- Quintana, A., Revilla, I. Determination of the percentage of milk (cow's, ewe's and goat's) in cheese with different ripening times using near infrared spectroscopy technology and a remote reflectance fibre-optic probe. *Analytica Chimica Acta* 2007; 604:191-6.
45. Mayer, H.K. Milk species identification in cheese varieties using electrophoretic, chromatographic and PCR techniques. *International Dairy Journal* 2005;15: 595-604.
46. Romero, C.; Perez-Andújar, O.; Olmedo, A.; Jiménez, S. Detection of cow's milk in ewe's or goat's milk by HPLC. *Chromatographia* 1996; 42(3/4): 181-04.
47. Haza, A. I., Morales, P., Martín, R., García, T., Anguita, G., Gonzalez, I., Sanz, B.; Hernandez, P.E. Immunoreactivity of Goat's Milk Casein Fractionated by Ion-Exchange Chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 43: 2025-9.
47. Basch, J.J., Douglas, Jr, F.W., Procino, L.G., Holsinger, V.H., Farrell, Jr, H.M. Quantitation of caseins and whey proteins of processed milks and whey protein concentrates, application of gel electrophoresis, and comparison with Harland-Ashorth Procedure. *Journal Dairy Science* 1985; 68(1): 23-31.
48. Anguita, G., Martín, R., García, T., Morales, P., Haza, A.I., González, I., et al. Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Bovine Milk in Ovine and Caprine Milk and Cheese Using a Monoclonal Antibody against Bovine -Casein. *Journal of Food Protection* 1997; 60(1): 64-6.

Avaliação de indicadores higiênico-sanitários e das características físico-químicas em águas utilizadas em escolas públicas de nível fundamental

Assessment of physical-chemical characteristics and hygienic and sanitary conditions indicators in water supplied at public primary schools

RIALA6/1227

Vanessa Fernandes da Silva ALMEIDA¹, Sibele Ribeiro de OLIVEIRA¹, Paula Regina Luna de Araújo JÁCOME², Agenor Tavares JÁCOME-JÚNIOR^{1*}

*Endereço para correspondência: Associação Caruaruense de Ensino Superior (ASCES), Faculdade do Agreste de Pernambuco (FAAPE), Av. Portugal, 584, CEP 55.016-901, Santa Maria, Caruaru, PE, Brasil.

e-mail:agenorjacome@asc.es.edu.br; agenorjacome@yahoo.com.br

¹Associação Caruaruense de Ensino Superior (ASCES), Faculdade do Agreste de Pernambuco (FAAPE) Caruaru, PE, Brasil.

²Departamento de Medicina Tropical, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

Recebido: 13.07.2009 - Aceito para publicação: 27.10.2009

RESUMO

O objetivo deste estudo foi de avaliar as condições higiênicas e sanitárias das amostras da água utilizadas para o consumo e no preparo da merenda escolar de alunos de escolas públicas localizadas na cidade de Caruaru, Pernambuco, Brasil, por meio de procedimentos de detecção de presença de *Pseudomonas aeruginosa* e da bactéria do grupo coliforme. Foram analisadas 36 amostras de água da torneira da cozinha coletadas de 36 escolas públicas localizadas no Município de Caruaru com frequência superior a 100 pessoas, incluindo professores, funcionários e alunos na faixa etária de 0 a 5 anos. As amostras analisadas a temperatura ambiente apresentaram pH no valor médio de $7,04 \pm 0,53$. *Pseudomonas aeruginosa* foi detectada em 83,3% das amostras e 69,4% apresentaram-se contaminadas por bactéria do grupo coliforme; 13,9% das amostras demonstraram ausência de ambas bactérias. Entre as amostras positivas para *Pseudomonas aeruginosa*, 20% apresentaram ausência do grupo coliforme. Verificou-se que 61,1% das amostras positivas para *Pseudomonas aeruginosa* estavam diretamente associadas à ausência de limpeza do reservatório de água. Em função desses achados, sugere-se efetuar a implantação de procedimentos de detecção de *Pseudomonas aeruginosa* como metodologia de avaliação de potabilidade de água, em vista da Portaria 518 de 25 de março de 2004 não reprovar a amostra de água com a presença desta espécie bacteriana. Tal medida é de extrema importância não só pelo fato de *Pseudomonas aeruginosa* ser considerada como agente patogênico oportunista, mas também pela sua propriedade de atuar com indicador de poluição da amostra por material orgânico nos reservatórios de água, que pode ser potencial fonte de infecção por agentes patogênicos.

Palavras-chave. *Pseudomonas aeruginosa*; escolas; água potável; abastecimento de água.

ABSTRACT

This study analyzed the hygienic and sanitary conditions of the water samples used for drinking and for preparing scholar foods at public schools located in Caruaru city, Pernambuco, Brazil, by searching the occurrence of *Pseudomonas aeruginosa* and coliform group. Tap water samples were collected from the kitchens of 36 public schools located in Caruaru city, in which the people rates including students, teachers and school staff were more than 100, and teaching children aged from 0 to 5 years. The analyzed samples showed pH on average of 7.04 ± 0.53 at room temperature. *Pseudomonas aeruginosa* was detected in 83.3% of samples and coliforms were found in 69.4%; and 13.9% of water samples were negative for both bacteria. Among 20% of *Pseudomonas aeruginosa* positive samples, no coliform was found; 61.1% of *Pseudomonas aeruginosa* positive samples were directly related to the lack of adequate water reservoir cleansing. These findings showed that *Pseudomonas aeruginosa* investigation should be performed as a standard sanitary indicator for assessing drinking water condition, as according to the decree 518 of March 25, 2004 the water sample contaminated with *Pseudomonas aeruginosa* has not been the reason for disapproving it. This procedure is crucial because adding to the fact of *Pseudomonas aeruginosa* being an opportunistic pathogen, it is considered an indicator of pollution with organic material in water stored in reservoirs, which could be potential source of pathogens proliferation.

Key words. *Pseudomonas aeruginosa*, schools, potable water, water supply.

INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos, a água tem sido fator primordial para o desenvolvimento do homem, e sua função é indiscutível para a evolução biológica e cultural de toda a espécie humana¹. Devido à degradação ambiental ocasionada pela alta taxa de poluição, resultante do desequilíbrio ecológico do planeta causado pela ação humana, é requerido uma administração ambiental ativa e um maior controle da qualidade desse recurso natural².

Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) demonstram que as doenças causadas por veiculação hídrica, especialmente as gastroenterites, chegam a matar milhões de pessoas por ano. A falta de saneamento básico é responsável pelo óbito de mais de 15 milhões de crianças anualmente na faixa etária de 0 a 5 anos³. As crianças são especialmente vulneráveis e respondem diferentemente dos adultos quando expostas a fatores ambientais, e essa resposta pode diferir de acordo com os períodos de desenvolvimento pelos quais estão passando, uma vez que o sistema imune se encontra imaturo. Sabendo-se que o ambiente escolar representa a segunda casa da criança, ocupando cerca de um terço do seu dia, faz-se necessário um acompanhamento e monitoramento da qualidade da água nas escolas, visto que uma baixa disponibilidade de água tratada está ligada à altas taxas de mortalidade infantil⁴.

Surtos veiculados por patógenos de origem alimentar são comuns em ambientes escolares. Nos Estados Unidos, entre 1973 e 1997 foram registrados 604 surtos, sendo a salmonela o principal patógeno identificado⁵. Já na China, um surto por *Proteus mirabilis* em carne de porco cozida ocorreu em agosto de 2008⁶. De acordo com estudo realizado por Gould e colaboradores⁷ os micro-organismos mais comuns em casos de surtos de origem alimentar são espécies de salmonela, cepas enteropatogênicas de *Escherichia coli* e esporos de *Clostridium botulinum* e *Clostridium perfringens* os quais são eliminados pelas fezes de pacientes doentes.

A qualidade da água é frequentemente relacionada à presença de micro-organismos indicadores de contaminação como o grupo coliforme (contaminação fecal) e a *Pseudomonas aeruginosa* (presença de matéria orgânica biodegradável)³. *P. aeruginosa* é classificada como um dos micro-organismos mais versáteis e oportunistas, sendo a bactéria mais encontrada em ambientes hospitalares acometendo principalmente pacientes imunocomprometidos, sendo a água de torneira um dos principais contribuintes

para a colonização⁸⁻¹⁰. No Brasil, este micro-organismo é considerado padrão de potabilidade apenas para águas minerais¹¹, no entanto uma elevada quantidade de *Pseudomonas spp.* também pode ser utilizada como uma ferramenta de avaliação no manejo higiênico na ordenha de vacas leiteiras¹². A presença de *P. aeruginosa* já é por si só um agravante no que diz respeito à qualidade da água por ser um patógeno oportunista, podendo oferecer risco à saúde de indivíduos saudáveis e imunocomprometidos, uma vez que possui poder de adaptação e resistência a antibióticos^{13,14}.

O Programa de Alimentação Escolar do Brasil vem sendo desenvolvido desde 1954 tendo como objetivo inicial atender aos estudantes do nordeste brasileiro por meio da distribuição de leite em pó, passando a uma abrangência efetivamente nacional em 1955. A partir de 1994 foi instituída a descentralização dos recursos, por meio de convênios firmados com os Estados, Distrito Federal e Municípios, que passaram a comprar e distribuir os alimentos da merenda¹⁵⁻¹⁸. A problemática fundamental dos programas de alimentação escolar consiste na dificuldade encontrada para formular com clareza seus objetivos. Essencialmente assistenciais e nutricionais, como nos países pobres, o resultado de matar ou evitar a fome do dia constitui-se como um objetivo paliativo uma vez que a merenda escolar é a única ou a principal refeição do dia para muitos estudantes^{19,20}. Quanto mais grave as carências socioeconômicas, maior o valor da merenda como atenuante das carências alimentares²¹.

Este estudo é parte integrante do Projeto Águas do Agreste, projeto extensionista sócio-educacional de promoção da saúde desenvolvido pela Associação Caruaruense de Ensino Superior (ASCES) em escolas de nível fundamental do Agreste Pernambucano, que tem como objetivos a análise bacteriológica da água, de alimentos e ações lúdicas de educação, saúde e higiene. O estudo aqui apresentado teve por objetivo avaliar a presença de *P. aeruginosa* e do grupo coliforme, bem como indicadores físico-químicos, em amostras da água utilizada para consumo e no preparo da merenda escolar de alunos de escolas públicas localizadas na cidade de Caruaru, Pernambuco, Brasil, o qual poderá ser empregado como uma ferramenta de avaliação no município para redimensionar a merenda, deslocando-a de programa paliativo para proposta de atenção a direitos da criança.

MATERIAL E MÉTODOS

Tipologia do Estudo, Coleta e Amostragem

O estudo proposto possui um desenho descritivo do tipo transversal com uma abordagem quantitativa.

O universo dessa pesquisa foi composto por escolas públicas municipais situadas em Caruaru-PE, tendo como critérios de inclusão as escolas com número de usuários (alunos, professores e funcionários) superior a 100 e que trabalhassem com alunos numa faixa etária entre 0 e 5 anos.

Foram analisadas todas as escolas que atendiam aos critérios de elegibilidade descritos no parágrafo anterior totalizando 36 amostras de água da torneira da cozinha de 36 escolas públicas localizadas em Caruaru, que correspondem a 29,75% das 121 escolas públicas do município²². A coleta e análise das amostras de água utilizadas para o preparo da merenda escolar e consumo foram realizadas no período de agosto de 2008 a março de 2009. Foi recolhido aproximadamente 100ml de cada amostra em frascos apropriados esterilizados, onde foi anotado data, hora e local da coleta e transportadas ao laboratório para análise. As amostras foram submetidas às análises microbiológicas (pesquisa de *P. aeruginosa* e coliformes totais) e físico-químicas (pH e temperatura), sendo analisadas no Laboratório de Análise de Água e Bromatologia localizado no Campus da Associação Caruaruense de Ensino Superior (ASCES) em Caruaru.

Os autores estabeleceram os contatos iniciais com os diretores das escolas, entregando correspondência oficial que explicava os objetivos do estudo e solicitava autorização para as análises. Para cada coleta era preenchido um formulário padrão, onde eram anotados dados relevantes, relativos às condições locais e da amostra, tais como: data, hora, temperatura, pH, sistema de abastecimento, nome do coletor e local da coleta. Na área onde estava localizada a caixa d'água, foram coletados dados sobre a presença de árvores de grande porte próximas a cisterna, cujas raízes pudessem provocar infiltração nas paredes; condições de manutenção da caixa d'água; presença de fossa sanitária e distância desta a caixa d'água; fins de utilização da água pelos alunos e número médio dos usuários.

Análises Microbiológicas

A técnica dos tubos múltiplos foi realizada como preconizado pelo Standard methods for the examination of water and wastewater (APHA) para a pesquisa de *P.*

aeruginosa e do grupo coliforme²³. As condições de cultivo empregadas para pesquisa de *P. aeruginosa* foram o Caldo Asparagina em 3 séries de 5 tubos, com incubação a 35°C/48 h para a fase presuntiva e o Caldo Acetamida para a fase confirmatória na mesma temperatura e tempo de incubação. Para a pesquisa de coliformes foram utilizados os meios Caldo Lactosado (ensaio presuntivo) e Caldo Lactosado Verde Brilhante Bile (ensaio confirmatório) incubados à 35°C/48 h.

Análises Físico-Químicas

A determinação de pH foi realizada em pHmetro digital de bancada PHTEC após a análise bacteriológica e a medição de temperatura feita em termômetro de mercúrio no momento da coleta.

Processamento e Análise dos Dados

Os dados foram digitados, devidamente conferidos e processados no programa Excel 2007 (Microsoft Office®) no qual foi aplicada uma análise descritiva para obtenção de percentual de positividade das amostras para *P. aeruginosa* e coliformes totais e a determinação de frequências pelo programa EPI INFO 6.04d.

Considerações Éticas

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê Científico e pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Associação Caruaruense de Ensino Superior (ASCES) sob o número de processo CAAE - 1322.0.000.217-09. A pesquisa foi desenvolvida sob aspectos de extrema confidencialidade em relação à identificação das escolas, assim como dos seus resultados laboratoriais analisados. Estes foram utilizados com fins estritamente acadêmicos científicos e para prestação de serviço social, por meio de práticas educativas continuadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras analisadas apresentaram um valor médio de pH de $7,04 \pm 0,53$, não havendo diferença significativa entre o valor médio do pH das escolas localizadas na zona urbana - 7,19 (IC_{90%} de 6,98-7,39) - e na zona rural - 6,86 (6,67-7,04). A temperatura das amostras coletadas apresentou um valor médio de $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

A grande maioria das escolas apresentou contaminação pelas bactérias pesquisadas, estando ambas ausentes em apenas 13,9% do espaço amostral. A presença de *P. aeruginosa* sobrepôs a do grupo coliforme

nas amostras analisadas. Foi observado também que as escolas da zona rural apresentaram um número significativamente maior de amostras contaminadas em relação à zona urbana (Tabela 1).

O grupo coliforme esteve ausente em 20% das amostras positivas para *P. aeruginosa*, não podendo ser

as mesmas reprovadas do ponto de vista bacteriológico uma vez que a portaria 518 do Ministério da Saúde²⁴ só considera como indicador do padrão de potabilidade para água de consumo o grupo coliforme.

A quantificação das bactérias se deu pelo Número Mais Provável (NMP) (Tabela 2). Não foi possível a

Tabela 1. Percentual do número de escolas públicas municipais de Caruaru-PE, dentro dos critérios de elegibilidade adotados, com a água utilizada para consumo contaminada pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* e pelo grupo coliforme

Micro-organismo pesquisado	Percentagem do número de Escolas Contaminadas					
	Zona Urbana ¹		Zona Rural ²		Urbano e Rural ³	
	%	IC _{90%}	%	IC _{90%}	%	IC _{90%}
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	75,00	65,73-84,27	93,75	88,57-98,93	83,33	75,35-91,31
Coliformes Totais	60,00	49,51-70,49	81,25	72,89-89,61	69,40	59,53-79,27

Nota: IC_{90%} = Intervalo de Confiança com uma confiabilidade de 90%

1 – n=20; 2 – n=16; 3 – n=36

Tabela 2. Avaliação do nível de contaminação por *Pseudomonas aeruginosa* e coliformes totais por região e escola analisada

Local	Escolas	NMP <i>P.aeruginosa</i>	NMP Coliformes	Local	Escolas	NMP <i>P.aeruginosa</i>	NMP Coliformes
Zona Urbana	E1	2.0	500	Zona Rural	E21	20	<1.8
	E2	2.0	17		E22	89	<1.8
	E3	17	4,5		E23	2.0	49
	E4	<1.8	<1.8		E24	8.3	4,5
	E5	<1.8	<1.8		E25	4	70
	E6	<1.8	<1.8		E26	>1600	>1600
	E7	9.1	27		E27	<1.8	80
	E8	<1.8	<1.8		E28	130	110
	E9	4.0	79		E29	2.0	4
	E10	70	17		E30	8	22
	E11	140	>1600		E31	2.0	13
	E12	<1.8	<1.8		E32	6	<1.8
	E13	9.2	>1600		E33	>1600	170
	E14	24	79		E34	27	22
	E15	>1600	210		E35	22	8
	E16	>1600	>1600		E36	280	33
	E17	90	<1.8				
	E18	1.8	<1.8				
	E19	2.0	>1600				
	E20	900	<1.8				

NMP: Número Mais Provável/100 mL de amostra

NMP<1.8 é representativo de amostra negativa

obtenção da média do NMP/indicador ou NMP/Região uma vez que os resultados foram bastante dispersos, variando entre <1,8 e >1600 NMP/100 mL, não sendo a média de NMP uma boa medida de tendência central. Escolas com nível de contaminação >1600 NMP/100 mL tanto para *P. aeruginosa* e/ou coliformes representaram 19,44% do total de escolas analisadas. Níveis >1600 NMP/100 mL para *P. aeruginosa* na zona urbana estiveram presentes em 10% das escolas analisadas enquanto que na zona rural esse índice se elevou para 12,5%.

Os laudos foram entregues durante visita dos autores que prestaram esclarecimentos sobre o significado dos resultados obtidos, com o intuito de orientar e sugerir medidas preventivas e corretivas das contaminações observadas. Foram beneficiadas 24.477 pessoas entre alunos, funcionários e professores que cooperaram de maneira magnífica com a realização do estudo. É objetivo do Projeto Águas do Agreste identificar o problema e orientar para as devidas soluções, no entanto a execução das mesmas cabe ao município e aos seus gestores.

Com base nas informações coletadas, que incluem os dados levantados na entrevista com os usuários, os registros das condições de armazenamento das águas, bem como os resultados das análises, foi eleita como primeira medida a ser recomendada aos interessados, a limpeza e desinfecção das caixas d'água por meio de uma cartilha explicava do processo. Paralelamente, como algumas escolas ainda utilizavam o filtro de vela, recomendou-se a frequência e limpeza correta do mesmo também por intermédio de cartilha. Rogues e colaboradores (2007)¹⁰, ao avaliarem a contribuição da água de torneira na colonização por *P. aeruginosa* em Unidades de Terapia Intensiva (UTI), enfatizaram a necessidade de uma desinfecção adequada da torneira e a manutenção da qualidade da água oferecida por ela uma vez que 35% de

todos os casos de colonização adquirida por *P. aeruginosa* foram advindas da torneira.

De acordo com os dados obtidos com o preenchimento do formulário de coleta (Tabela 3), em torno de 40% dos diretores das escolas responderam que faziam a limpeza da caixa d'água numa periodicidade de 6 meses a 1 ano, 35% não sabiam a periodicidade e 25% afirmaram nunca ter limpado a caixa d'água em suas gestões. Aos entrevistados que responderam não saber a periodicidade ou não proceder com a limpeza do reservatório, foi perguntado qual o motivo para tal, 82% responderam que não possuíam informações sobre a periodicidade de limpeza, enquanto que 18% afirmaram que sabiam, mas não dispunham de recursos financeiros para o procedimento da ação. Apenas 2,8% das escolas que afirmaram nunca limpar a caixa d'água negativamente para coliformes, mas todas estavam positivas para *P. aeruginosa*.

A água utilizada pelas escolas da zona urbana era fornecida pela rede de abastecimento urbano. O uso de água transportada por caminhão tanque na zona urbana era feita apenas em períodos de falta de água ou consumo extra. As escolas da zona rural eram 100% abastecidas pelos caminhões tanque, uma vez que a rede de abastecimento urbano dessa região não possuía vazão suficiente para o suprimento adequado das escolas. Escolas abastecidas por caminhões tanque, em sua grande maioria da Zona Rural, apresentaram os maiores índices de contaminação por *P. aeruginosa*, o que corrobora com o estudo publicado por De Victorica & Galvan (2001)²⁵ que associaram os maiores níveis de risco de contaminação por esta bactéria com a estocagem em tanques, tubulações e filtros que não sofrem manutenção. A positividade da *P. aeruginosa* em 22,2% das escolas que afirmaram limpar a caixa d'água com regularidade (Tabela 3) pode ser devido a possibilidade de informações inverídicas por parte dos gestores das

Tabela 3. Distribuição de amostras positivas e negativas para os indicadores analisados, segundo a periodicidade de limpeza da caixa d'água (n=36)

Periodicidade de limpeza da caixa d'água	<i>P. aeruginosa</i>		Coliformes totais	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
	%	%	%	%
Nunca lavou	61,1	0	58,3	2,8
Lava entre 6 meses e 1 ano	22,2	16,7	0	38,9

escolas ou mesmo a contaminação proveniente da fonte de abastecimento, no caso, o caminhão tanque.

CONCLUSÃO

A não detecção do grupo coliforme não significa a ausência de outros indicadores bacterianos de contaminação ou bactérias patogênicas, fato este evidenciado pela presença de *P. aeruginosa* em amostras de água que não apresentaram bactérias do grupo coliforme. Dados presentes nesse estudo demonstram a necessidade de se implantar como padrão de potabilidade da água de consumo a pesquisa de *P. aeruginosa*, uma vez que a portaria 518 de 25 de março de 2004 não reprova a água contendo esta espécie bacteriana. Tal medida é de extrema importância devido ao fato da *P. aeruginosa* ser considerada, além de um patógeno oportunista, um indicador de poluição da água por material orgânico.

Essa simples abordagem do problema, feita durante a execução desse estudo, demonstra o quanto é importante, e até mesmo, essencial a conscientização do consumidor sobre suas responsabilidades relativas ao armazenamento e utilização responsável da água, para que o objetivo maior, a garantia da potabilidade, seja alcançado. Torna-se imprescindível a participação do cidadão comum no monitoramento da qualidade da água e este envolvimento pode ser estimulado por meio de campanhas e projetos educativos que exaltem a importância do comprometimento do usuário.

Tais dados foram repassados às secretarias de Educação e Saúde do Município de Caruaru a fim de se firmar parcerias e buscar soluções para os problemas de potabilidade. As mesmas se comprometeram a desenvolver programas de conscientização da importância da qualidade da água e a manutenção da mesma (Secretaria de Saúde) e providenciar as limpezas de todas as caixas d'água das escolas (Secretaria de Educação). Esse é um dos passos que poderá proporcionar a transição de um Programa de Alimentação Escolar Assistencialista para um Programa Educativo enfatizando o dever do Estado em ser responsável pelo bem-estar das crianças.

Considera-se que o estudo além de ter proporcionado experiência prática, motivou o interesse dos autores para trabalhos sociais, integrando pesquisa, ensino e extensão à realidade diária.

REFERÊNCIAS

1. Cosgrove WS, Rijsberman FR. Challenge for the 21st Century: Making water everybody's business. Paris: World Water Council, 2000: 149-56.
2. Lima JRO, Marques SG, Goncalves AG, Salgado-Filho N, Nunes PC, Silva HS et al. Microbiological analyses of water from hemodialysis services in São Luís, Maranhão, Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 2005; 36 (2): 103-8.
3. Guilherme EFM, Silva JAM. *Pseudomonas aeruginosa* como indicador de contaminação hídrica. *Higiene Alimentar.* 1998; 14 (76): 43-7.
4. United Nations Children's Fund [UNICEF]: On World Water Day, glass half empty for fifth of world's children (Press release) [cited 2008 mar 19]. Available from: <www.unicef.org/media/media_25643.html>.
5. Daniels NA, Mackinnon L, Rowe SM, Bean NH, Griffin PM, Mead PS. Foodborne disease outbreaks in United States schools. *J Pediatr Infect Dis.* 2002; 21 (7): 623-8.
6. Wang Y, Zhang S, Yu J, Zhang H, Yuan Z, Sun Y et al. An Outbreak of *Proteus mirabilis* food poisoning associated with eating stewed pork balls in brown sauce, Beijing. *Food Control.* No prelo 2009.
7. Gould GW, Abee T, Granum PE, Jones MV. Physiology of food poisoning microorganisms and the major problems in food poisoning control. *Int J Food Microbiol.* 1995; 28:121-8.
8. De Vos D, Lima JR, Pirnay JP, Duinslaeger L, Revets H, Vanderkelen A, et al. Analysis of epidemic *Pseudomonas aeruginosa* isolates by isoelectric focusing of pyoverdine and RAPD-PCR: modern tools for an integrated anti-nosocomial infection strategy in burn wound centers. *Burns.* 1997; 23: 379-86.
9. Aumeran C, Paillard C, Robin F, Kanold J, Baud O, Bonnet R, et al. *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* outbreak associated with contaminated water outlets in an oncohaematology pediatric unit. *J Hosp Infect.* 2006; 65: 47 – 53.
10. Rogues AM, Boulestreau H, Lashéras A, Boyer A, Gruson D, Merle C, et al. Contribution of tap water to patient colonization with *Pseudomonas aeruginosa* in a medical intensive care unit. *J Hosp Infect.* 2007; 67: 72 – 8.
11. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº 275 de 22 de setembro de 2005 da Dispõe sobre o regulamento técnico de características microbiológicas para água mineral natural e água natural. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 23 set. 2005.*
12. Fagundes CM, Fischer V, Silva WP, Carbonera N, Araujo MR. Presença de *Pseudomonas* spp em função de diferentes etapas da ordenha com distintos manejos higiênicos e no leite refrigerado. *Ciência Rural.* 2006; 36(2): 568-72.
13. Tancredi RCP, Cerqueira E, Marins BR. Águas minerais consumidas na cidade do Rio de Janeiro, Superintendência de controle de zoonoses, vigilância e fiscalização sanitária - Boletim de divulgação técnica e científica [serial on line] 2002 november [cited 2008 mar 20]; 13: 14. Available from: <<http://www2.rio.rj.gov.br/governo/vigilanciasanitaria/boletins/bol13.pdf>>
14. Vanconcelos U, Calazans GMT. Antibiogramas de linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de diferentes ambientes aquáticos. *Rev. Patol. Trop.* 2006; 35 (3): 241-4.

15. Abreu M. Alimentação escolar na América Latina: programas universais ou focalizados/políticas de descentralização. Brasília: SEDIAE/INEP/MEC; 1995.
16. D'Avila AL. Simposio Programas de Alimentación Escolar na América Latina: textos e exposições. Rio de Janeiro: FAE/ONU; 1995.
17. Silva MV. A trajetória do Programa de Merenda Escolar (1954-1994) e o estado nutricional de crianças brasileiras. *Cad Nutrição*. 1996; 11:31-49.
18. Pipitone MAP. Os arquivos brasileiros de nutrição e a trajetória da criação e consolidação da Campanha Nacional de Alimentação Escolar no Brasil. *Cad Nutrição*. 1998; 15:33-50.
19. Fonseca JP. Merenda escolar: um paliativo, um direito. In: Conceição JAN. Saúde escolar: a criança, a vida e a escola. São Paulo: Savier, 1994.
20. Pereda CL. El programa de alimentación escolar. Guatemala: INCAP; 2001. Notas técnicas PP/NT/023.
21. Pedraza DF, Andrade SLLS. A alimentação escolar analisada no contexto de um programa de alimentação e nutrição. *RBPS*. 2006; 19(3):164-74.
22. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [IBGE]. Resultados da Amostra do Censo Demográfico 2000 - Malha municipal digital do Brasil: situação em 2001. Informações de acordo com a Divisão Territorial vigente em 01.01.2001. Rio de Janeiro (RJ); 1 jan 2004.
23. Eaton AD, Clesceri LS, Rice EW, Greenberg AE, Franson MAH. Standard methods for the examination of water and wastewater. 21st ed. [centennial edition] Washington (DC): APHA – American Public Health Association, Hardcover; 2005.
24. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) 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.
25. De Victorica J, Galvan M. *Pseudomonas aeruginosa* as an indicator of health risk in water for human consumption. *Water sci. technol*. 2001; 43 (12): 49-52.

Nutritional value and antinutritional factors of foliaceous vegetable *Talinum fruticosum*

Valor nutricional e fatores antinutricionais da folha vegetal *Talinum fruticosum*

RIALA6/1228

Joana Filomena Magalhães LEITE¹, João Andrade da SILVA^{2*}, Tatiane Santi GADELHA³, Carlos Alberto GADELHA³, José Pinto de SIQUEIA JÚNIOR³

*Endereço para correspondência: Universidade Federal da Paraíba. Cidade Universitária, s/n. Castelo Branco. CEP. 58059-900. João Pessoa-PB, Brasil.

Fone (083) 3216 7998. e-mail: andrade@ccs.ufpb.br

¹Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, Brasil.

²Departamento de Nutrição da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, Brasil.

³Departamento de Biologia Molecular da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, Brasil.

Recebido: 15.07.2009 – Aceito para publicação: 01.10.2009

ABSTRACT

Talinum fruticosum Juss (L.) is an unconventional plant belonging to the family Portulacaceae; it is a herbaceous perennial plant that grows in tropical regions as a foliaceous vegetable. *T. fruticosum* leaves are a source of fiber and minerals and they contribute to assemble the micronutrients for daily nutritional requirements. These plants supply the essential nutrients to the human organism; however, these plants contain antinutritional factors such as lectins and tannins which may compromise their bioavailability. In the present study, the *T. fruticosum* leaves samples were investigated on proximate composition and antinutritional factors. Samples were exposed to heat treatment for washing and for cooking for 10 min. These procedures neither significantly changed the carbohydrates and lipids contents, nor eliminated the hemagglutinating activity which is inactivated at 70 °C, although no effective reduction of tannin from the leaves was observed.

Key words. *Talinum fruticosum*, bredo, antinutritional factors, unconventional vegetable, proximate composition

RESUMO

Talinum fruticosum Juss (L.) é uma planta não convencional da família Portulacaceae e trata-se de planta herbácea perene que cresce em regiões tropicais como vegetais folhosos. As plantas fornecem nutrientes essenciais ao organismo, no entanto, a biodisponibilidade pode ser comprometida pela presença de fatores antinutricionais tais como lectinas e taninos. Em virtude das folhas de *T. fruticosum* serem fonte de fibra e de minerais e por contribuem para reunir os micronutrientes necessários para a nutrição diária, no presente estudo as amostras de folhas dessa planta foram investigadas quanto à composição centesimal, bem como os fatores antinutricionais. As amostras foram submetidas ao tratamento térmico nos procedimentos de lavagem e de cozimento durante 10 min. Estes processos não foram capazes de alterar significativamente os teores de carboidratos e lipídeos, tampouco a supressão da atividade hemaglutinante que é inativada a 70°C. Contudo não houve eficácia na redução dos teores de tanino presentes nas folhas estudadas.

Palavras-chave. *Talinum fruticosum*, bredo, fatores antinutricionais, vegetais não convencionais, composição centesimal

INTRODUCTION

Plants generally provide essential nutrients for the body and can be a source of nutrients for people of all social classes in view their reasonable cost and accessibility, which can be grown without the need for major financial investment. However, the bioavailability of their nutrients may be compromised by the presence of antinutritional factors such as lectins and tannins. Based on the most recent definition of lectins, they are considered to be proteins with at least one non-catalytic domain able to recognize and bind reversibly to specific mono- and oligosaccharides¹.

Tannins are polyphenols that form complexes with proteins, making them insoluble and inactivating their enzymatic activity. They may also bind to other macromolecules such as starch, causing a reduction in the nutritional value of food².

Considering the detrimental effects of antinutritional factors present in food intended for human consumption, most of these substances appear to be inactivated or inhibited with appropriate heat treatment³.

Talinum fruticosum Juss (L.) is a non-conventional plant of the family Portulacaceae; it is herbaceous perennial plant that grows in tropical regions as a leafy vegetable. Its leaves are smooth and succulent, or spirally provision opposite cross with flowers and small inconspicuous met in inflorescences axillary or terminal film⁴.

This plant is commonly known as bredo but is also called other popular names such as “gomes major,” “ceirão” and spinach, and it is a traditional food during Easter. The leaves of this herb are prepared as broths and the cooked leaves are used to accompany sea food which is allowed in this period of abstinence from red meat.

In the present study, the leaves were investigated to determine their proximate composition, and antinutritional factors. The aim of this study was to demonstrate its nutritive value and thereby to promote the consumption and utilization of this species in regions where it is grown.

MATERIAL AND METHODS

Material

Talinum fruticosum leaves were collected from Cruz do Espírito Santo, Paraíba, Brazil. Rabbit erythrocytes were obtained from the Federal University of Paraíba and human blood was obtained from healthy donors from the Hematology Center of Paraíba.

Heat treatment

Proximate composition was determined on three forms of the leaves: fresh, bleached and cooked for 10 min in boiling water. Leaf extract was subjected to different elevated temperatures to test for inactivation of the antinutritional factors.

Proximate composition analysis

Moisture content was determined using the AOAC method⁵ and ash content according to AOAC⁶. Total nitrogen content was obtained using the Kjeldahl method and the percentages of nitrogen were transformed into protein content by multiplying by a conversion factor of 5.3 (AOAC⁶). Total fat extraction was performed according to the AOAC⁶ method, using a Soxhlet apparatus. Carbohydrate content was determined by the phenol-sulfuric acid method⁷.

Determination of antinutritional factors

Hemagglutinating activity

Hemagglutinating activity was assayed in tubes with serial dilutions of the leaf extract according to Moreira and Perrone⁸. All 10 tubes of the series received 100 µL of 0.15 M NaCl. Added to the first tube of the series were 100 µL of the supernatant from the 0.15M NaCl the extract of the leaves. The second tube received 100 µL from the mixture of the first and so on until the tenth tube with a total of 200 µL was discarded. A 100- µL aliquot of 2% suspension rabbit and human (A, B or O) erythrocytes in the same buffer was added to each tube. Hemagglutination was determined after a 1-h incubation at 37°C. Hemagglutinating and hemolytic activities were expressed as a titer, namely, the reciprocal of the highest dilution that gave a positive result.

Determination of soluble proteins

Protein concentration was determined by the method described by Bradford⁹ using bovine serum albumin (BSA) as standard. The samples were submitted to extraction at a proportion (1:10) with the following buffers: 0.1 M glycine, pH 2.6, pH 9.0 M Glycine 0.1, 0.1 M Tris-HCl pH 7.6, all with 0.15 M NaCl, with stirring for 3 h at room temperature. Afterward, each extract was centrifuged at 5,000 rpm for 25 min at 4 ° C, and the supernatants used for analysis.

Tannin content determination - Total tannins were extracted in water and determined by a colorimetric method as described by Rangana¹⁰. They were quantified using the Folin–Denis reagent, and the results were expressed as tannic acid equivalents.

Statistical analysis

Analyses were performed in duplicate. The data were processed statistically using Kruskal–Wallis with the help of the Program Biostat 5.0. The means and standard deviation were determined and differences were considered significant at $P < 0.05$.

Results and discussion

Chemical Composition

The proximate composition of the leaves of *T. Fruticosum* are described in Table 1. The fresh leaves of the plant have a 89.08% moisture content. With washing and cooking, the moisture content was significantly higher because of the swelling of the leaves. Aletor and Adeogun¹¹ found in leaves of *T. triangulare* a 91% moisture level. Wallace, Marfo and Plahar¹², in examining fresh leaves of plants of the species *E. hirta*, *I. involucrata* and *X. maffafa* found lower moisture (74.41%, 84.61% and 88.41%) compared to that observed in this study, and 91.43% moisture in leaves of *L. Taxaracifolia* (wild lettuce). Singh, Kawatra and Sehgal¹³ found 95.4% moisture in leaves of fresh carrot. We observed a significant reduction in ash content with heat treatment, which could be explained by the increase in moisture after heat-

ing. Wallace, Marfo and Plahar¹² found the species *X. maffafa* to have a similar value (1.48%).

Protein content decreased significantly with cooking, but not with washing. Aletor and Adeogun¹¹ found higher protein content (2.5%) in leaves of the same species studied here. Higher values (3.42%, 2.60%, 2.71%) were also reported in work with leaves of other species¹².

The thermal processing applied did not cause a significant change in the content of carbohydrates presents. Low levels of lipids were found in leaves of *T. Fruticosum* when compared with other food sources, but these quantities are greater than those found in other plant leaves¹⁴. Thus, heat processing did cause loss of these macronutrients.

Antinutritional factors

The presence of antinutritional factors in foods compromises their nutritional quality. Table 2 displays the finding for the different antinutritional factors investigated. Plant lectins have the capacity to resist gastric digestion and pass into the intestinal region¹⁵. The specificity of lectins for specific sugars allows these proteins bind to intestinal microvilli thereby reducing the area of absorption of nutrients¹⁴. The lectins in *T. Fruticosum* leaves have a specificity for sugars present in the membrane of human and rabbit erythrocytes. The fresh leaves of the plant showed hemagglutinating activity. The inactivation of this antinutritional factor was demonstrated over range of temperatures starting at 40 °C with increments of 5 °C. Total inactivation was seen at 70°C.

Table 1. Proximate composition of leaf *Talinum fruticosum*

	fresh leaves (X±SD)	bleached leaves (X±SD)	cooked leaves (X±SD)
Moisture(%)	89.80 ± 0.04 ^a	91.12 ± 0.24 ^b	92.60 ± 0.32 ^c
Protein(%)	1.32 ± 0.16 ^a	1.38 ± 0.17 ^a	1.24 ± 0.18 ^b
Fat(%)	3.13 ± 0.54	2.99 ± 0.42	3.23 ± 1.51
Carbohydrates(%)	2.96 ± 0.14	2.88 ± 0.42	2.92 ± 0.28
Ash(%)	1.46 ± 0.16 ^a	1.24 ± 0.02 ^b	0.40 ± 0.09 ^c

X – Arithmetic mean; SD – Standard deviation
a, b and c – significant difference, $p < 0.05$

Table 2. Antinutritional factors in *Talinum fruticosum* leaves

Antinutritional factor	Fresh leaves	Bleached leaves	Cooked leaves
Erythrocytes			
A	UH	-	-
B	UH	-	-
O	UH	-	-
Rabbit	UH	-	-
Tannin (mg/100g)	1072 ^a	2794 ^b	1309 ^a

UH: Hemagglutinating activity
a and b – significant difference $p < 0.05$

The tannin content found in the leaves of the fresh plant leaves (1073 mg/100 g) was not reduced to acceptable amounts after heat treatment. Levels of polyphenols above 1,000 mg/100 g dry weight are considered high and damaging to protein digestibility¹⁵. Santos² studied the effect of cooking on the antinutritional factors in leaves of broccoli, cauliflower and cabbage noting that with the increase of time for cooking there was no reduction of tannin content to negligible levels for cabbage and broccoli. Umaru, Adamu, Dahiru and Nadro¹⁶ when studying species of fruit consumed in Nigeria, detected tannin levels of $7.40 \pm 0.14\%$ in *B. aegyptiaca*, $6.39 \pm 0.5\%$ in *Hyphaena thebaica* and $5.90 \pm .13\%$ in *Borassus aethiopum*. Del Vecchio, et al.¹⁷ investigated the content of antinutritional factors in pumpkin seeds, fresh, cooked and roasted, noting a significant decrease in the levels of cyanide, an inhibitor of trypsin, hemagglutinating activity and tannin, but the treatment that was most efficient was cooking.

CONCLUSION

The results of this study suggest that *Talinum fruticosum* plant is a low calorie food containing low levels of macronutrients, namely lipids and carbohydrates. As it is a source of fiber and minerals, this plant contributes to meeting daily nutritional requirements for micronutrients. Heating (70 ° C) was able to inactivate the lectin, but it did not reduce the levels of tannins to tolerable levels. Further studies are necessary to determine the time and temperature needed to reduce tannin levels in order to enhance the nutritional quality of this plant. It is also important to conduct toxicological tests with the leaves

of the plant to determine the amounts that can be consumed without deleterious effects.

Further research of this underutilized vegetable from different regions should also be carried out, since its compounds may vary with maturity, soil and cultivation among other factors likely to change its composition.

Acknowledgments

We are grateful to CNPq and Capes for financial support. We also thank Dr. A. Leyva for English editing of the manuscript.

REFERENCE

1. Peumans WJ, Van Damme EJM. 1995. The role of lectins in plant defence. *J. Histochem.* 1995; 27:253-71.
2. Santos MAT. Efeito do cozimento sobre alguns fatores antinutricionais em folhas de brócoli, couve-flor e couve. *Ciênc Agrotecn.* 2005; 30(2), 294-301.
3. Silva MM, Silva MAAP. Fatores antinutricionais: inibidores de proteases e lectinas. *Rev Nutr.* 2000 ,(13),3-9.
4. Cardoso MO. Hortaliças não-convencionais da Amazônia. Brasília: Embrapa-SPI; Manaus: Embrapa-CPAA.1997. 150p
5. Association of Official Analytical Chemists - AOAC.. Official Methods of Analysis. 15th ed. Washington; 1990.
6. Association of Official Analytical Chemists - AOAC.. Official Methods of Analysis, 17th ed. Washington; 2000.
7. Dubois M, Gilles KA, Hamilton, JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytic Chemist.* 1956; 28(3), 350-6.
8. Moreira RA, Perrone JC. Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology*, 1977; 59(5): 783-7.

9. Bradford MMA. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of dye binding. *Analyt. Biochem.* 1976; 72(1/2), 248-54.
10. Ranganna S. Manual of analysis of fruit and vegetables products. New Delhi: Tata McGraw-Hill Publishing Company Limited, 1977. 634p
11. Aletor VA, Adeogun OA. Nutrient and antinutrient constituents of some tropical leafy vegetables. *Food Chem.* 1995; 53(4): 3775-79
12. Wallace PA, Marfo EK, Plahar WA. Nutritional quality and antinutritional composition of four non-conventional leafy vegetables. *Food Chem.* 1998; 61(33), 287-91.
13. Sing G, Kawatra A, Sehgal S. Nutritional composition of selected green leafy vegetables, herbs and carrots. *Plant Foods for Hum Nutr.* 2001; 56(4): 359-64.
14. Salazar J, Velásquez R, Quesada S, Piccinelli AL, Rastrelli L. Chemical composition and antinutritional factors of *Lycianthes synanthera* leaves (chomte). *Food Chem.* 2006; 97(2): 343-8.
15. Vasconcelos IM, Oliveira JTA. (2004). Antinutritional properties of plant lectins. *Toxicon.* 2004; 44(4): 385-403.
16. Umaru HA, Adamu R, Dahiru D, Nadro MS. (2007). Levels of antinutritional factors in some wild edible fruits of Northern Nigeria. *African J. Biotechnol.* 2007; 6(16), 1935-8.
17. Del-Vechio G, Corrêa AD, Abreu CMP, Santos CD. Efeito do tratamento térmico em sementes de abóboras (*cucurbita* spp.) sobre os níveis de fatores antinutricionais e/ou tóxicos. *Ciênc. Agrotec.* 2005; 29(2): 396-72.

Relação entre a composição nutricional e a origem floral de pólen apícola desidratado

Correlation between nutritional composition and floral origin of dried bee pollen

RIALA6/1229

Illana Louise Pereira de MELO¹, Alex Silva de FREITAS², Ortrud Monika BARTH^{2,3}, Ligia Bicudo de ALMEIDA-MURADIAN^{1*}

*Endereço para correspondência: Laboratório de Análise de Alimentos, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP). Av. Prof. Lineu Prestes, 580, bloco 14, Cidade Universitária, CEP 05508-900. São Paulo, SP, Brasil. Fone: (11) 3091-3656 ou 57, Fax: (11) 3815-4410. E-mail: alinutri@edu.usp.br, ligiabi@usp.br

¹Laboratório de Análise de Alimentos, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP).

²Laboratório de Palinologia, Departamento de Botânica, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), CCS, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

³Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Recebido: 24.07.2009 – Aceito para publicação: 19.10.2009

RESUMO

A composição química do pólen é variável e depende da origem botânica. No presente trabalho foi investigada a correlação da composição centesimal e das vitaminas antioxidantes com a origem floral em amostras de pólen apícola. Foram analisadas seis amostras desidratadas de pólen apícola coletadas na região do Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil. A vitamina C foi quantificada por titulação, o β -caroteno por cromatografia em coluna aberta e a vitamina E por cromatografia líquida de alta eficiência. A composição centesimal foi determinada seguindo-se as metodologias recomendadas por AOAC (1995) e IAL (2005) e a caracterização floral foi feita por meio de observação em microscópio. As concentrações das vitaminas variaram de 114 a 340 $\mu\text{g/g}$ para vitamina C, 16,27 a 38,64 $\mu\text{g/g}$ para vitamina E e de 3,14 a 77,88 $\mu\text{g/g}$ para o β -caroteno. A composição centesimal das amostras apresentou conformidade com as especificações estabelecidas pela legislação brasileira. Foi encontrada grande variabilidade de tipos polínicos nas amostras analisadas e alguns deles apresentaram alta correlação com a vitamina C (Myrtaceae), com o β -caroteno (Arecaceae, Cecropia e Fabaceae) e com os lipídeos (Arecaceae e Fabaceae). Outras amostras mostraram correlação negativa com β -caroteno (*Mimosa caesalpiniaefolia* e Poaceae), com proteínas (Arecaceae) e com lipídeos (*Mimosa caesalpiniaefolia*).

Palavras-chave. pólen apícola; composição centesimal; vitaminas antioxidantes; análise polínica.

ABSTRACT

Pollen composition is variable depending on the floral origin. The purpose of present study was to correlate the centesimal composition and the antioxidants vitamins with the floral origin of dried bee pollen samples collected from the region of the Vale do Ribeira, São Paulo, Brazil. Six batches of dried bee pollen pellets were analyzed. Vitamin C was quantified by titration technique, β -carotene by open column chromatography, and vitamin E by HPLC. The proximate composition was determined following the methodology recommended by AOAC (1995), and the floral characterization was performed under microscopy observation. Vitamin contents varied from 114 to 340 $\mu\text{g/g}$ for vitamin C; from 16 to 39 $\mu\text{g/g}$ for vitamin E; from 3 to 78 $\mu\text{g/g}$ for β -carotene. The analyzed samples were in compliance with the Brazilian legislation limits regarding to the proximate composition. The pollen types highly varied within the samples and some of them were strongly correlated with the vitamin C (Myrtaceae), β -carotene (Arecaceae, Cecropia and Fabaceae) and lipids (Arecaceae and Fabaceae). On the other hand, other types were negatively correlated, such as *Mimosa caesalpiniaefolia* and Poaceae types with β -carotene, Arecaceae type with proteins and *Mimosa caesalpiniaefolia* type with lipids.

Key words. bee pollen; centesimal composition; antioxidants vitamins; pollen analysis.

INTRODUÇÃO

Os grãos de pólen são estruturas microscópicas contidas nas anteras dos estames das angiospermas e gimnospermas e representam o gametófito masculino das plantas. Além de ser o próprio objeto da polinização, para muitos insetos, e especialmente para as abelhas, o pólen é a principal fonte de alimento não líquido. Portanto, o pólen tem grande importância na apicultura como fonte de proteínas, gorduras e minerais para as abelhas e como produto excedente do apiário.^{1,2,3,4} Os grãos de pólen variam quanto a forma, tamanho, cor, aparência, características morfológicas e por isso, na prática, podem ser utilizados para identificar o gênero das plantas e algumas vezes, as espécies vegetais.^{5,6}

Segundo a Instrução Normativa N° 3, de 19 de Janeiro de 2001, do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento, define-se pólen apícola como o resultado da aglutinação do pólen das flores, efetuada pelas abelhas operárias, mediante néctar e suas substâncias salivares, o qual é recolhido no ingresso da colmeia.⁷

O pólen apícola possui não só as vitaminas antioxidantes (vitaminas C, E e β -caroteno, como pró-vitamina A), mas também as do complexo B e vitamina D.^{8,9} As vitaminas antioxidantes são capazes de estabilizar os radicais livres, que são envolvidos em muitas doenças degenerativas características do envelhecimento e tanto podem ser provenientes do meio externo ou como resultantes naturais do metabolismo humano.¹⁰

O conteúdo de macro e micronutrientes do pólen apícola são influenciados pela origem botânica.^{4,6,11,12} Segundo Funari et al., a composição química do pólen apícola varia com a espécie vegetal, condições ambientais (diferentes localidades, estações do ano e diferentes anos), idade e estado nutricional da planta (quando o pólen está se desenvolvendo).¹³ De acordo com Campos et al., é necessário um método sistemático para caracterizar o pólen apícola com relação a seus constituintes tendo em vista o crescente interesse fitoterápico do pólen apícola e seus produtos.¹⁴

Deste modo, o conhecimento da origem botânica do pólen apícola, bem como de sua composição química, é importante para tipificar o produto obtido nas diferentes regiões e agregar valor a este produto. Este trabalho teve como objetivo obter dados analíticos nacionais sobre a composição nutricional (composição centesimal e vitaminas antioxidantes) do pólen apícola

desidratado proveniente da região do Vale do Ribeira, SP, Brasil e correlacioná-los com a origem botânica.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Foram adquiridos seis lotes diferentes de amostras desidratadas de pólen apícola, recém coletadas, diretamente do entreposto de comercialização de produtos apícolas “PRONATU Laboratório de Produtos Naturais LTDA” localizado no Estado de São Paulo (cidade de Pariquera-Açu). Os lotes foram designados por letras do alfabeto (A, B, C, D, E e F).

As amostras foram coletadas no apiário Trianoski, no período de 23/02/2007 a 09/04/2007 com intervalo de uma semana entre os lotes. O apiário fica instalado em zona de Mata Atlântica, no Vale do Ribeira, localizada cidade de Pariquera-Açu, SP. Foram utilizadas 15 colmeias de abelhas *Apis mellifera* e as amostras foram submetidas ao processo de secagem em estufa da marca Ballardín®, com circulação de ar em sistema aberto, ajustada à temperatura de 45°C durante aproximadamente seis horas.

Métodos

Determinação de umidade: Foi realizada pelo processo de liofilização utilizando o equipamento da marca Edwards® modelo EC Super Modulyo, a temperatura de -40 °C por 26 horas e vácuo final inferior a 4×10^{-1} Torr, segundo as normas do fabricante. Este processo tem como objetivo preservar a qualidade do produto além de minimizar algumas reações de degradação que ocorre durante a secagem, como exemplos, a reação de Maillard, desnaturação de proteínas e reações enzimáticas.^{15,16}

Determinação das proteínas: Foi determinado através do método Micro-Kjeldahl, utilizando-se o fator 6,25 para transformação do nitrogênio total em proteínas.^{17,18}

Determinação dos lipídeos: Foi determinada em extrator intermitente de Soxhlet, utilizando-se éter etílico como solvente.^{18,19}

Determinação de cinzas: Foi realizada por gravimetria após incineração do material em mufla a 550°C, até peso constante.^{18,19}

Determinação da vitamina C: Foi realizada utilizando o método titulométrico adaptado, que se baseia na redução do 2-6-diclorofenol-indofenol (DCFI) pelo ácido ascórbico, de acordo com a AOAC.¹⁷

Determinação da Vitamina E: Foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), conforme descrito por Presoto et al. e Oliveira.^{20,21}

Determinação dos Carotenóides totais e do β -caroteno: Foi realizada por cromatografia em coluna aberta (CCA), conforme descrito por Rodriguez-Amaya e Oliveira.^{21,22}

Análise polínica: Foi realizada através do processo de preparo direto das lâminas de pólen, isto é, sem fazer uso do método da acetólise, baseado numa mistura de 25 bolotas recolhidas proporcionalmente às cores encontradas em dois gramas de cada amostra bem misturada; os tipos polínicos foram identificados por comparação com a literatura e contagem sucessiva de ao menos 300 grãos para o cálculo das porcentagens de cada um dos tipos polínicos encontrados na amostra.^{2,3}

Análise estatística: Foi realizada análise de Correlação de Pearson entre os dez tipos polínicos e os nutrientes estudados (vitaminas e composição centesimal). Nos conjuntos de dados em que não foram observadas distribuição normal e, principalmente, a homogeneidade das variâncias, o teste estatístico não-paramétrico de Correlação de Spearman foi adotado. Os resultados foram expressos como média dos resultados \pm desvio padrão. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Statistica 8.0 e adotando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$).²³

RESULTADOS

Na Tabela 1 está apresentada a frequência dos tipos polínicos nas amostras obtidas.

Verifica-se que o tipo *Mimosa caesalpiniaefolia* apareceu como pólen dominante nos dois primeiros lotes (A, B), enquanto o tipo *Mimosa scabrella* apareceu como pólen dominante em apenas um lote (E). Já os lotes C, D e F não apresentaram pólen dominante, apenas pólen acessório tipo *Mimosa caesalpiniaefolia* e *Myrcia* no lote C, *Cecropia* no lote D e *Myrcia* e *Asteraceae* no lote F. O tipo *Astrocaryum* aparece na proporção de pólen isolado importante, em todos os lotes, com exceção do lote E onde aparece como pólen acessório. O mesmo acontece com o tipo *Mimosa caesalpiniaefolia* nos lotes E e F.

Os resultados da análise de composição centesimal, bem como os dados da Regulamentação Brasileira⁷, Argentina^{24,25} e Suíça²⁶ são apresentadas na Tabela 2, onde pode-se observar que todos os itens estão de acordo com as três especificações (Brasileira, Argentina e Suíça).

Nas análises realizadas foram identificadas as três vitaminas propostas neste trabalho (vitamina C, E e -caroteno), como mostra a Tabelas 3.

Realizando-se análise estatística de correlação entre os tipos polínicos e os nutrientes estudados (Tabela 4), constatou-se:

Tabela 1. Porcentagens de tipos polínicos obtidos em amostras desidratadas de pólen apícola

Família Gênero / Espécie	Frequência (%)*					
	Lote A	Lote B	Lote C	Lote D	Lote E	Lote F
Acacia			< 3 (PI)			
Arecaceae tipo <i>Astrocaryum</i>	5 (PII)	3 (PII)	5 (PII)	10 (PII)	20 (PA)	10 (PII)
Asteraceae	< 3 (PI)	< 3 (PI)	< 3 (PI)	< 3 (PI)	< 3 (PI)	20 (PA)
<i>Cecropia</i>				30 (PA)		10 (PII)
<i>Eucalyptus</i>	< 3 (PI)					
Fabaceae (amarela)	< 3 (PI)			3 (PII)	< 3 (PI)	< 3 (PI)
Malvaceae		< 3 (PI)	< 3 (PI)		< 3 (PI)	
Mimosaceae tipo <i>Mimosa scabrella</i>					47 (PD)	
Mimosaceae tipo <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i>	90 (PD)	95 (PD)	45 (PA)	< 3 (PI)	5 (PII)	10 (PII)
Myrtaceae tipo <i>Myrcia</i>		< 3 (PI)	45 (PA)	3 (PII)	< 3 (PI)	20 (PA)
<i>Pachira</i> (Bombacaceae)				< 3 (PI)		< 3 (PI)
Passifloraceae		< 3 (PI)	< 3 (PI)	< 3 (PI)	< 3 (PI)	5 (PII)
Poaceae	< 3 (PI)	< 3 (PI)	< 3 (PI)		< 3 (PI)	< 3 (PI)
<i>Trema</i>	< 1 (PI)				3 (PII)	
NI				3 (PII)	< 3 (PI)	

* PD = pólen dominante (> 45% do total de grãos); PA = pólen acessório (de 16% a 45%); PII = pólen isolado importante (de 3% a 15%); PI = pólen isolado ocasional (< 3%); NI = não identificado.

Tabela 2. Análise química das amostras desidratadas de pólen apícola e as Regulamentações Brasileira (Brasil 2001), da Argentina (Krell 1996, Código Alimentario Argentino 1990) e da Suíça (Bogdanov et al. 2004)

Lotes	Análise Química* (%)			
	Umidade	Proteínas	Lipídeos	Cinzas
A	2,56 ± 0,05	24,91 ± 0,88	4,81 ± 0,16	3,17 ± 0,00
B	2,03 ± 0,14	26,45 ± 0,52	4,46 ± 0,20	3,21 ± 0,01
C	2,99 ± 0,04	28,28 ± 0,44	4,53 ± 0,08	3,30 ± 0,03
D	2,18 ± 0,03	21,22 ± 0,18	5,69 ± 0,22	2,90 ± 0,00
E	2,82 ± 0,10	19,98 ± 0,12	5,27 ± 0,32	3,00 ± 0,00
F	1,50 ± 0,05	20,68 ± 0,33	5,18 ± 0,13	2,89 ± 0,01
Valor Médio	2,34 %	23,59 %	4,97 %	3,08 %
Regulamentação				
Brasileira (%) Regulamentação	Máximo de 4	Mínimo de 8	Mínimo de 1,8	Máximo de 4
Argentina (%) Regulamentação	Máximo de 8	15 a 28	-	Máximo de 4
Suíça (%)	Máximo de 6	10 a 40	1 a 10	2 a 6

* Resultados expressos em base seca através da média ± desvio padrão de análises em triplicata.

Tabela 3. Concentração das vitaminas C, E e dos carotenóides totais e β-caroteno nas amostras de pólen apícola

Lotes	Vitaminas (µg/g)*			
	Vitamina C	Vitamina E	Carotenóides totais	β-caroteno
A	114 ± 1,62	38,64 ± 2,72	40,62 ± 4,89	6,65 ± 0,29
B	124 ± 3,94	16,27 ± 0,38	25,34 ± 1,20	3,14 ± 0,09
C	340 ± 11,4	20,54 ± 1,30	33,95 ± 2,95	5,05 ± 0,03
D	126 ± 4,88	18,42 ± 0,47	268,5 ± 14,9	77,88 ± 5,01
E	127 ± 2,08	21,06 ± 1,76	103,3 ± 9,2	25,19 ± 1,80
F	144 ± 4,49	32,27 ± 1,53	117,2 ± 16,8	17,83 ± 1,91

* As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em Média ± Desvio Padrão.

Com relação à vitamina C, houve uma forte associação positiva ($r=0,95$) entre a sua concentração e a porcentagem do tipo polínico Myrtaceae tipo *Myrcia* ($p<0,05$). Enquanto o tipo Passifloraceae mostrou uma correlação positiva importante ($r=0,67$), porém apenas marginalmente significativa ($p<0,10$);

Com relação à vitamina E, houve ausência de correlações significativas;

Com relação aos carotenóides totais e ao β -caroteno, observou-se perfis semelhantes nas associações com alguns tipos polínicos específicos, conforme mostra a Tabela 4;

Com relação às proteínas, houve uma forte associação negativa ($r= -0,81$) entre o seu conteúdo e a porcentagem do tipo polínico Arecaceae tipo *Astrocaryum* ($p<0,05$);

Com relação aos lipídeos, houve forte associação positiva e significativa ($p<0,05$) entre a sua porcentagem e as dos tipos polínicos Arecaceae tipo *Astrocaryum* ($r=0,88$) e Fabaceae ($r=0,93$). Já o tipo polínico Mimosaceae tipo *Mimosa caesalpiniaefolia* mostrou uma forte correlação negativa ($r= -0,94$) e significativa ($p<0,05$) com a concentração de lipídeos;

Com relação às cinzas, houve ausência de correlações significativas.

DISCUSSÃO

A análise polínica permite identificar as principais fontes polínicas utilizadas pelas abelhas, bem como, os períodos de produção de pólen no campo e possíveis épocas de carência.³

Nas amostras estudadas algumas apresentaram pólen dominante, ou seja, um dos tipos polínicos foi encontrado na proporção de mais de 45% do total de grãos. Enquanto outros lotes apresentaram uma maior variedade de tipos polínicos, não sendo encontrado pólen dominante. Alguns tipos apareceram na proporção de pólen isolado importante (de 3% a 15% do total de grãos), indicando que pode se tornar fonte de coleta de pólen se ocorrer em grande quantidade nas áreas de produção. Nenhum dos lotes apresentou um único táxon botânico, sendo todas as amostras constituídas de pólen heterofloral, o que lhes garante propriedades variadas. Tal ocorrência também foi observada por Almeida-Muradian et al., que analisaram a taxonomia botânica de 10 amostras de pólen apícola provenientes do sul do Brasil e, apesar de serem designadas amostras de pólen monofloral pelo produtor, todas elas apresentaram mais de um táxon.⁶ Os autores concluíram que o fato das bolotas de pólen apresentar apenas uma cor não

Tabela 4. Correlação entre os nutrientes estudados com alguns tipos polínicos encontrados nas amostras de pólen apícola

Tipo Polínico	Coeficiente de correlação (r)				
	Vitamina C	Carotenóides Totais	β - Caroteno	Proteínas	Lipídeos
Arecaceae tipo <i>Astrocaryum</i>		0,79*	0,88**	- 0,81**	0,88**
<i>Cecropia</i>		0,84**	0,94**		
Fabaceae		0,92**	0,92**		0,93**
Mimosaceae tipo <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i>		- 0,73**	- 0,94**		- 0,94**
Myrtaceae tipo <i>Myrcia</i>	0,95**				
Passifloraceae	0,67*				
Poaceae		- 0,65**	- 0,65**		

As correlações entre os tipos polínicos e os nutrientes foram realizadas pela Correlação de Pearson ou Spearman, quando apropriado.

** Correlações estatisticamente significativas ($p<0,05$).

* correlações marginalmente significativas ($p<0,10$).

indica que sejam necessariamente monoflorais, ainda que elas possuam mais chances de serem procedentes de uma única fonte quando comparadas com amostras que apresentam várias cores.⁶

Os resultados da análise de composição centesimal mostram que todos os itens estão dentro do padrão de identidade e qualidade para o pólen apícola, de acordo com as regulamentações de três países (Brasileira, Argentina e Suíça).

Almeida-Muradian et al., ao avaliarem amostras desidratadas (n=10) de pólen apícola e coletadas na região sul do Brasil, obtiveram valores de 7,4% de umidade.⁶ Este valor é maior que a porcentagem média de umidade encontrada no presente trabalho (2,34%), provavelmente devido ao uso de outro método de análise para a determinação de umidade (estufa a vácuo). Bastos et al. também encontraram valores elevados de umidade (média de 8,78%) nas amostras desidratadas de pólen apícola provenientes dos estados de São Paulo e Minas Gerais (Karl Fischer).²⁷

Nas amostras estudadas, foi encontrada uma variação de 20,68 a 28,28% de proteína bruta. Resultados similares foram apresentados por: Bastos et al., que encontraram 21,2% de proteínas em amostras de pólen apícola dos estados de São Paulo e Minas Gerais; Funari et al., 26,2% em amostras provenientes de Botucatu/SP; Almeida-Muradian et al., 21,0% em amostras do sul do Brasil; Marchini et al., 21,4% nas amostras de Piracicaba/SP.^{27,13,6,28}

O valor médio de lipídeos totais apresentado neste trabalho foi de 4,97%, semelhante ao encontrado por Funari et al. nas amostras de Botucatu/SP, de 5,1%.¹³ Enquanto que Bastos et al. e Almeida-Muradian et al. relataram valores mais altos do que o apresentado neste trabalho, 8,8% e 7,0% respectivamente.^{27,6} Já Barreto et al., ao analisarem amostras de pólen provenientes de várias regiões do Brasil, e Marchini et al., que analisaram amostras de Piracicaba/SP, apresentaram valores mais baixos: 3,82% e 3,60%, respectivamente.^{4,28}

Com relação ao teor de cinzas, resultados semelhantes foram observados por Bastos et al., Barreto et al. e Marchini et al. que encontraram valores de 2,79%, 2,89%, 2,90%, respectivamente.^{27,4,28}

Nas análises realizadas foram identificadas as três vitaminas propostas neste trabalho (vitamina C, E e β -caroteno). As concentrações de vitamina C variaram entre 114 e 340 $\mu\text{g/g}$ nas amostras desidratadas. Este resultado se assemelha aos descritos por Szczesna et al.,

que observaram valores médios de vitamina C de 140 $\mu\text{g/g}$ (n=2) em amostras polonesas de pólen apícola.²⁹ Já Oliveira encontrou resultados superiores ao analisar o conteúdo de vitamina C nas amostras de pólen (n=10) provenientes da cidade de Pindamonhangaba, São Paulo, apresentando valores que variaram de 152,8 e 542,2 $\mu\text{g/g}$ nas amostras processadas.²¹

A concentração de vitamina E do pólen apícola variou entre 16,27 e 38,64 $\mu\text{g/g}$ nas amostras estudadas. Resultados semelhantes foram encontrados por Oliveira variando de 8,2 e 32,4 $\mu\text{g/g}$ nas amostras processadas.²¹

A concentração de carotenóides totais do pólen apícola variou de 25,34 a 268,5 $\mu\text{g/g}$. Quanto ao β -caroteno, os resultados variaram entre 3,14 e 77,88 $\mu\text{g/g}$ nas amostras processadas. Resultados semelhantes foram encontrados por Oliveira com concentrações de carotenóides totais variando de 4,6 a 178,7 $\mu\text{g/g}$ e de β -caroteno variando entre 32,3 e 90,48 $\mu\text{g/g}$ nas amostras processadas, chamando a atenção ainda para a ausência de β -caroteno nas amostras coletadas no mês de Abril de 2005.²¹ Já Muniategui et al., mostraram valores de 0,49 a 242,6 $\mu\text{g/g}$ de amostra para carotenóides totais e obtiveram em média 10 $\mu\text{g/g}$ de β -caroteno em amostras comerciais de pólen apícola da Espanha.⁸

O valor pró-vitaminico A das amostras processadas variou entre 0,26 e 6,48 μg de retinol (12 μg de β -caroteno correspondendo a 1 μg de retinol). A ingestão diária recomendada para vitamina A é de 900 $\mu\text{g/dia}$ para homens e de 700 $\mu\text{g/dia}$ para mulheres, logo, em termos de rotulagem, apenas o lote D pode ser considerado fonte desta vitamina, através de quantidade de β -caroteno que apresenta.³⁰ A porção diária recomendada de pólen apícola seco de 25 gramas forneceria 162 μg de retinol, ou seja, 18% da ingestão diária recomendada para homens e 23% para mulheres.

A análise de correlação entre os tipos polínicos e os nutrientes estudados mostra uma forte associação positiva entre a concentração de vitamina C e as porcentagens dos tipos polínicos Myrtaceae tipo *Myrcia* e Passifloraceae, indicando que maiores porcentagens destes tipos polínicos podem estar associadas a maiores concentrações de vitamina C nas amostras de pólen apícola. Os carotenóides totais e o β -caroteno apresentaram perfis semelhantes nas associações com alguns tipos polínicos específicos, conforme mostra a Tabela 4. De acordo com a tabela apresentada, sugere-se que maiores porcentagens dos tipos polínicos Arecaceae tipo *Astrocaryum*, Cecropia

e Fabaceae estão fortemente associados a maiores concentrações tanto de carotenóides totais quanto de -caroteno nas amostras de pólen apícola. Enquanto que maiores teores dos tipos Mimosaceae tipo *Mimosa caesalpiniaefolia* e Poaceae estão fortemente associados a menores quantidades destes nutrientes.

Houve uma forte associação negativa entre o conteúdo de proteínas e a porcentagem do tipo polínico Arecaceae tipo *Astrocaryum*, indicando que maiores porcentagens deste tipo polínico pode estar associada a maiores concentrações de proteínas nas amostras de pólen apícola. Com relação aos lipídeos, houve forte associação positiva e significativa entre a sua porcentagem e as dos tipos polínicos Arecaceae tipo *Astrocaryum* e Fabaceae. Isto indica que quanto maior a presença destes tipos polínicos maior será o conteúdo de lipídeos no pólen apícola. Já o tipo polínico Mimosaceae tipo *Mimosa caesalpiniaefolia* mostrou uma forte correlação negativa e significativa com a concentração de lipídeos, sugerindo que maiores porcentagens deste tipo polínico está associado a menores quantidades de lipídeos no pólen apícola.

Houve ausência de correlações significativas entre os tipos polínicos com relação às concentrações de vitamina E e de cinzas, sugerindo que os tipos polínicos encontrados nas amostras estudadas não interferem nas concentrações destes nutrientes.

CONCLUSÃO

A composição centesimal das amostras estudadas está de acordo com as especificações estabelecidas pela legislação brasileira em vigor (Instrução Normativa Nº 3, 19/01/2001), bem como pelas legislações Argentina e Suíça. Foram encontradas as vitaminas antioxidantes (vitamina C, E e β -caroteno) em concentrações variáveis nas amostras estudadas.

Houve grande variabilidade dos tipos polínicos encontrados nas amostras e alguns deles estiveram fortemente correlacionados com os teores de vitamina C (Myrtaceae tipo *Myrcia*), de -caroteno (Arecaceae, *Cecropia* e Fabaceae) e de lipídeos (Arecaceae e Fabaceae). Outros estiveram correlacionados de forma negativa, como é o caso dos tipos *Mimosa caesalpiniaefolia* e Poaceae com os níveis de -caroteno, do tipo Arecaceae com as proteínas e do tipo *Mimosa caesalpiniaefolia* com os lipídeos.

AGRADECIMENTOS

À empresa PRONATU Laboratório de Produtos Naturais Ltda, pelo fornecimento das amostras; Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Processo 06/59187-9) pela bolsa concedida e apoio financeiro, respectivamente.

REFERÊNCIAS

1. Witherell PC. Otros productos de la colmena. In: Dadant E, editor. La colmena y la abeja mellifera. Montevideo: Hemisferio Sur; 1975. p. 684.
2. Barth OM. O pólen no mel brasileiro. Rio de Janeiro: Gráfica Luxor; 1989. 150 pp.
3. Moreti ACCC, Marchini LC, Souza VC, Rodrigues RR. Atlas do pólen de plantas apícolas. Rio de Janeiro: Papel Virtual; 2002. 93 pp.
4. Barreto LMRC, Funari SRC, Orsi RO, Dib APS. Produção de Pólen no Brasil. Taubaté-SP: Cabral Editora e Livraria Universitária; 2006. 99 pp.
5. Schmidt JO, Buchmann SL. Other products of hive. In: Graham JM, Amgrose JT, Langstroth LL, editors. The hive and te honey bee: a new book on beekeeping which contains the tradition of "Langstroth on the hive and the honeybee". Hamilton: Dadant; 1992. p. 928-77.
6. Almeida-Muradian LB, Pamplona LC, Coimbra S, Barth OM. Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. *J Food Compos Anal.*2005; 18: 105-11.
7. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Instrução Normativa n.3, de 19 de janeiro de 2001. aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geleia Real, Geleia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis. Acesso em: 14 Ago. 2008. Disponível em: <http://legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=12479&word>.
8. Muniategui S, Sancho MT, Lopez J, Huidobro JF, Simal J. Determination of carotenes from bee-collected pollen by high performance liquid chromatography. *J Apic Res.*1990; 29: 147-50.
9. Campos MG, Cunha A, Markham KR. Bee pollen: composition, properties and application. In: Mizrahi A, Lensky Y, editors. Bee products: properties, applications and apitherapy. New York: Plenum Press; 1997. p. 93-100.
10. Elliot JG. Application of antioxidant in foods and beverage. *Food Technol.*1999; 53: 46-8.
11. Villanueva MTO, Marquina AD, Serrano RB, Abellán GB. The importance of bee-collected pollen in the diet: a study of its composition. *Int J Food Sci Nutr.*2002; 53: 217-24.
12. Bastos DHM, Barth OM, Rocha CI, Cunha IBS, Carvalho PO, Torres EAS, et al. Fatty acid composition and palynological analysis of bee (Apis) pollen loads in the states of São Paulo and Minas Gerais, Brazil. *J Apic Res.*2004; 43: 35-9.
13. Funari SRC, Rocha HC, Sforcin JM, Filho HG, Curi PR, Gomes Dierckx SMA, et al. Composição bromatológica e mineral de pólen

- coletado por abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) em Botucatu, Estado de São Paulo. *Archivos ALPA*.2003; 11: 88-93.
14. Campos MGR, Bogdanov S, Almeida-Muradian LB, Szczesna T, Mancebo Y, Frigerio C, et al. Pollen composition and standardisation of analytical methods. *J Apic Res Bee World*.2008; 47: 156-63.
 15. Liapis AI, Millman MJ, Marchello JM. An analysis of the lyophilization process using a sorption-sublimation model and various operational policies. *AIChE Journal*.1985; 31: 1594-604.
 16. Boss EA. Modelagem e otimização do processo de liofilização: aplicação para leite desnatado e café solúvel [Tese de Doutorado]. Campinas, Brasil: Universidade Estadual de Campinas, 2004. 129 pp.
 17. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Official methods of analysis. 16th ed. Washington: The Institute; 1995.
 18. Almeida-Muradian LB, Bera A, Felsner ML, Cano CB. Produtos Apícolas. In: Almeida-Muradian LB, Pentead MDVC, editores. *Vigilância sanitária: tópicos sobre legislação e análise de alimentos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2007. p. 183-98.
 19. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo - Brasil). Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 4^a ed. Brasília (DF): ANVISA; 2005.1018pp.
 20. Presoto AEF, Rios MDG, Almeida-Muradian LB. HPLC determination of alpha-tocoferol, beta-carotene and proximate analysis of Brazilian parsley leaves. *Boll Chim Ig*.2000; 51: 111-14.
 21. Oliveira KCLS. Caracterização do pólen apícola e utilização de vitaminas antioxidantes como indicadoras do processo de desidratação [Dissertação de Mestrado]. São Paulo, Brasil: Universidade de São Paulo, 2006. 106 pp.
 22. Rodriguez-Amaya DB. *A Guide to Carotenoid Analysis in Foods*. Washington: ILSI Press; 2001. 64 pp.
 23. *Statistica Version 8.0 for Windows*. Tulsa: StatSoft; 2007. v. 1.
 24. Krell R. Value-added products from beekeeping. Rome: FAO; 1996. p. 87-113.
 25. Código Alimentario Argentino de pólen. Artículo 785 – Resolución 1550 de 12 de dezembro de 1990. Capítulo X, página 15. Acesso em 31 Jan. 2008. Disponível em: http://www.anmat.gov.ar/codigoa/CAPITULO_X_Azucarados_atualiz_06-03.pdf.
 26. Bogdanov S, Bieri K, Gremaud G, Iff D, Känzig A, Seiler K, et al. *Swiss Food Manual Chapter 23 B: Bienenprodukte - Pollen, BAG* (Swiss Federal Office for Public Health), Berne; 2004.
 27. Bastos DHM, Rocha CI, Cunha IBS, Carvalho PO, Torres EAS. Composição e qualidade de pólen apícola comercializado em algumas cidades nos estados de São Paulo e Minas Gerais – Brasil. *Rev Inst Adolfo Lutz*.2003; 62: 239-44.
 28. Marchini LC, Reis VDA, Moreti ACCC. Composição físico-química de amostras de pólen coletado por abelhas Africanizadas *Apis mellifera* (Hymenoptera:Apidae) em Piracicaba, Estado de São Paulo. *Cienc Rural*.2006; 36: 949-53.
 29. Szczesna T, Rybak-Chimielewska H, Bornus L. Effect of storage on variation of contents vitamin C and A in pollen collected bees. *Apiacta*.1991; 2. Acesso em: 30 Jan. 2008. Disponível em: <http://www.apimondiafoundation.org/foundation/files/1991/Teresa%20SZCZESNA,%20Helena%20RYBAK-CHIMIELEWSKA,%20L.%20BORNUS.pdf>.
 30. Dietary Reference Intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc, 2000. Acesso em: 09 Ago. 2008. Disponível em: <http://books.nap.edu/books/0309072794/html>.

Avaliação da concentração de flúor em águas minerais engarrafadas disponíveis no comércio

Assessment of fluoride concentration in bottled mineral waters commercially available

RIALA6/1230

André Luiz Marçal TERRERI^{1*}, Cecília Cristina Marques dos SANTOS², Maria do Rosário Viçeta LOPES², Renata Flávia Milani SILVA², Júlio César da Silva RODRIGUES¹

*Endereço para correspondência Rua José Nogueira de Carvalho, 410
CEP 15060-100. São José do Rio Preto, SP.

¹Centro Universitário de Rio Preto, UNIRP, São Paulo, Brasil.

²Instituto Adolfo Lutz Laboratório Regional de São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.

Recebido: 12.08.2009 – Aceito para publicação: 05.11.2009

RESUMO

A água é importante fonte de ingestão de flúor e considerando-se o aumento no consumo de água mineral e da prevalência de fluorose dentária, o presente estudo teve o objetivo de avaliar a concentração de flúor na água mineral engarrafada comercializada, comparando-a aos valores declarados no rótulo da embalagem. Foram adquiridas 39 amostras água mineral de diferentes marcas disponíveis em diversos supermercados, mercearias e lanchonetes de grande circulação do município de São José do Rio Preto, em 2008. A concentração de flúor foi determinada por análise em duplicata, utilizando-se potenciômetro com eletrodo íon-seletivo. A concentração de flúor variou entre <0,05 e 0,82 mg/L, com diferenças pouco significativas entre os valores estipulados nos rótulos da maioria das marcas de água mineral e aqueles determinados na presente investigação. Os valores de flúor encontrados nas amostras analisadas mostram ser livres de risco em causar fluorose dental, porém em teor sem indicativo de ação preventiva anticárie. Os teores de flúor nas amostras de água mineral analisadas estavam em conformidade com a legislação específica vigente.

Palavras-chave. água engarrafada, fluoretos, fluorose dentária, vigilância sanitária, eletrodo íon-seletivo.

ABSTRACT

Water is an important source of fluoride intake and considering the mineral water consumption increase, and of the prevalence of dental fluorosis, this study evaluated the concentration of fluoride in bottled mineral water, and compared to those values reported on the packaging label. Thirty-nine mineral water samples from different brands were purchased at several supermarkets, grocery stores, and highly frequented restaurants in São José do Rio Preto, SP. The fluoride concentration was determined on duplicate analysis, using a potentiometer with selective-ion electrode. The concentration of fluoride ranged from <0.05 to 0.82 mg/L, and no significant difference was observed between the values reported on the labels and those found in the present investigation in samples from the majority of brands. In spite of the fluoride contents found to be safe for not causing a risk for dental fluorosis, there was no significant preventive meaning for tooth cavity. The levels of fluoride in analyzed bottled mineral water samples were in conformity with the specific legislation in force.

Key words. bottled water, fluorides, dental fluorosis, health surveillance, selective-ion electrode.

INTRODUÇÃO

O flúor na água de beber é efetivo na prevenção da cárie dental, sendo considerado uma medida de grande alcance populacional. Nos dias atuais, é necessário considerar também o consumo de água mineral como um mecanismo de prevenção da cárie e ocorrência de fluorose, principalmente devido ao aumento de seu consumo pela população brasileira. Segundo o IBGE¹, entre os produtos que apresentaram aumento contínuo e expressivo de quantidade, entre 1974 e 2003, destacam-se as águas minerais, evidenciando relevante mudança de hábito no consumo deste produto nos domicílios. As quantidades aumentaram 5.694% (de 1974 a 2003), sendo mais expressivo o aumento observado de 1996 a 2003 (3.011%)¹. O consumo de água mineral e potável de mesa, no Brasil, no ano de 2006, chegou a 4.843.007.000 de litros¹, com grande potencial de crescimento, pelo baixo consumo *per capita*, apenas 22,85 litros. Os dados de produção de água mineral confirmam a posição de destaque da região Sudeste (50,3%), seguida pela região Nordeste (23,8%), Sul (12,8), Centro-Oeste (6,7%) e Norte (6,4%). Em termos das unidades da federação, São Paulo, é o maior produtor de água mineral envasada, com cerca de 1,4 bilhões de litros em 2005, o que representa aproximadamente 33,2% da produção nacional, seguido por Minas Gerais (8,6%), Rio de Janeiro (6,7%), Rio Grande do Sul (6,2%) e Bahia (6,1%)².

A exemplo do que foi constatado em âmbito nacional, pesquisa de Bastos, realizada no município de Bauru, estado de São Paulo, constatou que cerca de 29,7% da população do município consomem água mineral. Em alguns estudos^{3,4,5,6,7,8,9,10} que avaliaram a concentração de flúor na água engarrafada comercializada no Brasil, os autores concluíram que a maioria das amostras apresentou concentrações de flúor abaixo dos limites considerados anticárie^{3,4,5,6,7}, entretanto houve marcas com potencial para ocorrência de fluorose^{4,6,8,10}, reforçando a necessidade de gerar conhecimentos e informações fundamentais à vigilância sanitária, em relação ao benefício e ao risco a que a população se expõe ao consumir estas águas.

Frente ao aumento progressivo do consumo de águas minerais e a importância do flúor na prevenção da cárie e possível ocorrência de fluorose dentária, o objetivo da presente pesquisa foi determinar a concentração de flúor presente nas diferentes marcas de águas engarrafadas comercializadas em São José do Rio

Preto-SP e avaliar a concordância entre os resultados dos ensaios laboratoriais e as informações declaradas nos rótulos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 39 amostras de água engarrafada adquiridas em supermercados, mercearias e lanchonetes de grande circulação no município de São José do Rio Preto - SP, durante o período de março a agosto de 2008, que foram analisadas pelo Laboratório de Análise Físico-Química de Alimentos do Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Regional de São José do Rio Preto-SP.

Para a determinação do íon fluoreto (F), foi utilizado o método potenciométrico com eletrodo combinado de íon-seletivo para íon fluoreto (Potenciômetro modelo 710 A, marca Orion e eletrodo combinado Thermo Orion Íonplus), por ser o mais indicado e adequado para concentrações acima de 0,035 mg/L de F, devido à alta seletividade, melhor linearidade, menor susceptibilidade a interferentes, simplicidade e rapidez^{11,12}.

Segundo os Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos¹³, para as condições de concentração e interferentes encontrados nas amostras de água, é recomendado o tampão TISSAB III¹¹, cuja relação entre os volumes de tampão e amostra é de 1:10.

As amostras de água foram analisadas em duplicata, utilizando-se para isso, duas alíquotas de 5 ml de cada amostra, totalizando 5,5 mL¹⁴.

As atividades analíticas foram desenvolvidas em ambiente com temperatura de 27±1°C e todas as soluções preparadas com água destilada e deionizada.

Após a aferição do eletrodo, do coeficiente angular no intervalo de -54 e 60mV/década de concentração, foi preparada curva de calibração em triplicata com intervalos de concentração entre 0,01 e 0,25 mg/L de flúor. Para concentrações entre 0,3 e 1,0 mg/L de flúor, pesquisas anteriores, nas mesmas condições de desenvolvimento da técnica utilizada no presente estudo, demonstraram linearidade, atribuindo resposta analítica adequada e, portanto, o método pode ser aplicado^{13,14}.

As características de desempenho do método aplicado incluíram, segundo as instruções do INMETRO¹⁵, a determinação de parâmetros de validação, nas condições de uso, como linearidade, recuperação, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).

Tabela 1. Resultados relativos aos parâmetros de validação para precisão e exatidão

Concentração (mg/L)	CV (%)*	Erro Relativo (%)
0,3	1,8	0,5
0,5	1,4	2,2
1,0	3,2	3,2

CV= Coeficiente de Variação
* média de 6 replicatas

O limite de detecção foi determinado com os valores smédios de sete (7) repetições do branco com a adição de padrão considerando 10 vezes o desvio padrão (DPx10).

Em nossos estudos de verificação, uma vez que o método aplicado foi validado^{11,12,14}, para a faixa de concentração de 0,01 a 0,25 mg/L de flúor, a curva de calibração foi linear a partir de 0,05 mg/L de flúor, e esta concentração pode expressar o LQ, pois é a mais baixa que pode ser determinada com um nível aceitável de confiança, como observado na Figura 1.

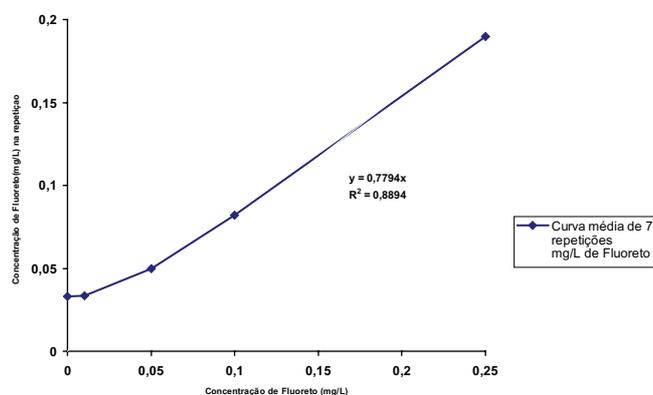


Figura 1. Curva de calibração em função da concentração de F⁻ (mg/L)

RESULTADOS

Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis do analito, é importante determinar o menor valor de concentração do analito que pode ser detectado pelo método (limite de detecção). Neste caso a concentração mínima de fluoreto medida com um grau de incerteza aceitável foi de 0,035 mg/L de flúor^{11,15}.

As concentrações de íons flúor obtidas por meio das análises, assim como as declaradas nos rótulos são apresentadas na Tabela 2. As concentrações de flúor

Tabela 2. Águas minerais comercializadas no município de São José do Rio Preto, em 2008, segundo a concentração de flúor declarada nos rótulos e os valores encontrados nas análises

Amostra	Concentração de flúor especificada no rótulo (mgF/L)	Resultados analíticos (n = 2) (mg F/L).
01	0,10	0,29
02	0,07	0,09
03	0,12	0,15
04	0,06	0,07
05	0,55	0,43±0,03
06	0,05	0,07
07	0,02	< 0,05
08	0,07	0,05
09	0,07	0,09
10	0,02	< 0,05
11	0,03	< 0,05
12	0,23	0,32±0,02
13	0,02	< 0,05
14	0,02	< 0,05
15	0,10	0,14
16	0,07	0,08
17	0,12	0,14
18	0,11	0,11
19	0,05	0,06
20	0,03	0,15
21	0,01	0,09
22	0,22	0,16
23	0,10	0,14
24	0,03	< 0,05
25	0,02	< 0,05
26	0,02	< 0,05
27	0,05	0,14
28	0,07	0,09
29	0,05	0,12
30	-	< 0,05
31	0,12	0,39
32	0,03	0,82
33	0,17	0,16
34	0,05	0,05
35	0,02	< 0,05
36	0,01	0,07
37	0,09	0,08
38	0,07	0,08
39	0,05	0,07

obtidas experimentalmente variaram entre o mínimo de <0,05 (LQ) e o máximo de 0,83 mg/L de flúor. Apenas uma marca de água mineral analisada teve concentração de íons flúor ótima para se obter ação anticárie, em conformidade com a Resolução SS-250 de 15 de agosto de 1995 da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, que considera dentro do padrão de potabilidade as águas que apresentam concentração de íon fluoreto dentro da faixa de 0,6 a 0,8 mg/L¹⁶. A maior discrepância encontrada com relação à concentração de flúor especificada no rótulo e o resultados analíticos foi da amostra codificada como nº 32, na qual havia uma concentração de flúor (mg/L) 27,5 vezes maior do que a especificada no rótulo.

Em 5 amostras os teores de flúor declarados nos rótulos eram maiores do que os obtidos experimentalmente e estes níveis variaram de 3 a 33,3%; 34 (87,2%) amostras apresentaram teores de flúor expressos nos rótulos menores do que as concentrações obtidas laboratorialmente e tais diferenças variaram entre 4,3 e 93,5%.

Dentre as amostras analisadas, 27 (69,2%) apresentaram teores de flúor em média 1,3 vez diferentes (maiores e menores) do que os teores declarados nos rótulos; e 10 (25,6%) apresentaram teores de flúor de duas a nove vezes menores do que os especificados nos rótulos.

Das 39 marcas avaliadas, 38 (97,4%), exibiam em seus rótulos a classificação “água fluoretada”, sendo que a obrigatoriedade desta informação, conforme a legislação de água mineral no Brasil, deve ser declarada quando a concentração de flúor for superior ou igual a 1,0 mg/L¹⁷.

DISCUSSÃO

Entre os produtos que apresentaram aumento contínuo e expressivo de quantidade no consumo pela população brasileira, destaca-se a água mineral, evidenciando relevante mudança de hábito e a necessidade da vigilância sanitária deste produto. Este aumento no consumo de água mineral é um fator que interfere de forma negativa na prevenção da doença cárie por meio da fluoretação das águas de abastecimento público, pois pesquisas sobre concentração de fluoretos em águas minerais não demonstraram, na maioria das águas minerais testadas, ação anticárie (0,6 a 0,8 mg/L)^{3, 4, 5, 6, 7}. Apenas uma dentre as trinta e nove marcas de águas avaliadas, neste estudo, apresentava concentração anticárie, sendo o restante com concentração sem significado preventivo. A maioria das embalagens (97,1%) destacava nos rótulos a água como sendo

fluoretada, apesar de não haver esta necessidade em 100% das águas analisadas, conforme a Resolução nº 274, de 22 de setembro de 2005¹⁷. Esta classificação pode induzir o consumidor, que conhece o benefício do fluoreto no controle da cárie e sabe da sua existência na água mineral⁴, a uma escolha e aquisição de um produto com um objetivo que não será atingido. Para contribuir na escolha do consumidor com relação aos benefícios preventivos da água fluoretada seria necessário destacar nas embalagens não só que ela seja fluoretada, conforme a legislação¹⁷ de água mineral (superior a 1,0 mg/L), mas fluoretada com concentração suficiente para exercer o poder preventivo contra cárie.

As amostras de águas engarrafadas analisadas neste estudo não podem ser classificadas como de risco para o aparecimento da fluorose dentária, diferentemente de algumas amostras encontradas nos estudos de Villena et al⁸ e Greg et al⁶ que mostraram, respectivamente, 7,7% e 8,5% das marcas analisadas com níveis acima de 1 mg/L de flúor.

Devido à disponibilidade e facilidade de acesso a vários veículos contendo fluoretos, tais como dentifrícios e soluções fluoradas, além dos alimentos e bebidas industrializados e processados com água fluoretada, o consumo de águas minerais engarrafadas, ao invés de água de abastecimento público otimamente fluoretada, por crianças durante a fase de formação dos dentes, parece ser mais segura com relação a fluorose, conforme concentrações encontradas neste estudo. Entretanto, em alguns casos, não é possível aos consumidores terem confiança na informação declarada no rótulo de algumas marcas de águas minerais, pois concentrações mais altas de fluoretos do que as descritas no rótulo, que colocam em risco o aparecimento de fluorose, foram encontradas em determinadas marcas de águas minerais^{4, 6, 8}.

O uso de águas engarrafadas com o propósito de diluir o leite em pó, preparar sucos e fórmulas infantis para crianças com menos de três anos de idade vem sendo aconselhado para diminuir a exposição cumulativa de fluoretos^{9, 18}, principalmente quando simultaneamente há uso de dentifrício fluoretado na fase em que não há controle da deglutição e formação dos incisivos permanentes, que são os dentes mais relevantes do ponto de vista estético¹⁹. As concentrações de fluoretos encontradas neste estudo confirmam a recomendação do uso destas águas engarrafadas com o propósito de diluir o leite em pó, preparar sucos e fórmulas infantis para crianças com baixo risco de cárie.

A Resolução nº 274, de 22 de setembro de 2005¹⁷, com o regulamento técnico para as águas envasadas, destaca que o produto que contém mais do que 2 mg/L de fluoreto deve trazer obrigatoriamente, nos rótulos das garrafas, que o produto não é adequado para lactentes e crianças com até sete anos de idade. Este limite proposto e descrito na resolução não é seguro para prevenir o aparecimento de fluorose dentária em crianças com os dentes em fase de formação, se o consumo for feito de maneira prolongada. Embora estudos de análise da concentração de fluoretos nas águas minerais mostrem concentrações seguras com relação a fluorose, na maioria das marcas, haveria a necessidade de rotular o produto como sendo não adequado para lactentes e crianças com até sete anos de idade, quando sua concentração exceder 0,8 mg/L de flúor, a exemplo da Lei Municipal 12.623/98, que proíbe a comercialização de água engarrafada com teor de flúor acima de 0,8 mg/L no município de São Paulo²⁰. A pesquisa realizada sugere a revisão do regulamento técnico das águas envasadas¹⁷ em relação à concentração mínima de fluoreto necessária, para a obrigatoriedade de descrição no rótulo das águas, considerando o potencial de aparecimento de fluorose dentária e também, o constante aperfeiçoamento das ações de segurança e controle sanitários, por parte da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), visando à proteção à saúde da população.

CONCLUSÕES

As concentrações de flúor encontradas nas águas minerais não foram consideradas um potencial para o aparecimento da fluorose dentária e tampouco possuem significado preventivo anticárie, embora o produtor destacasse na embalagem “água mineral fluoretada”.

REFERÊNCIAS

1. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [IBGE] Pesquisa de Orçamentos familiares 2002 – 2003: primeiros resultados: Brasil e grandes regiões. Rio de Janeiro; 2004. 276p.
2. Brasil. Ministério de Minas e Energia. Departamento Nacional de Produção Mineral. Sumário mineral. Brasília; 2006. 304 p.
3. Bastos JRM, Buzalaf MAR, Levy FM, Ribeiro TT, Mazzone FHR. Concentração de flúor em água mineral engarrafada e de fontes naturais das cidades de Lindóia, Águas de Lindóia e Serra Negra, Brasil. *Ver. Fac Odontol Univ Passo Fundo* 2001; 6 (1): 15-9.
4. Ramires I, Grec RHC, Cattán L, Moura PG, Lauris JRP, Buzalaf MAR. Avaliação da concentração de flúor e do consumo de água mineral. *Rev Saúde Pública* 2004; 38 (3): 459-65.
5. Alves NC, Odorozzi AC, Achilles N, Esteves VS, Goulart FC. Análise do teor de fluoretos em águas minerais comercializadas em Marília (SP) e impacto com a legislação e regulamentação. *Rev Paul Odontol* 2003; 2: 21-4.
6. Grec RHC, Garcia MP, Pessan JP, Ramires I, Costa B, Buzalaf MAR. Concentração de flúor em águas engarrafadas comercializadas no município de São Paulo. *Rev Saúde Pública* 2008; 42 (1): 154 - 7.
7. Santos LM, Barbosa KMM, Xavier SHC, Forte FDS, Sampaio FC, Reis ILR. Concentração de flúor em diferentes marcas de água mineral comercializadas em Alagoas. *Rev Bras Odontol* 2006 63 (1/2): 104-6.
8. Villena RS, Cury JA, Bastos R. Avaliação da concentração de flúor de águas minerais comercializadas no Brasil. *Rev. Saúde Pública* 1996; 30: 512-8.
9. Buzalaf MAR, Damante CAA, Trevizani LMM, Granjeiro JM. Risk of Fluorosis Associated With Infant Formulas Prepared With Bottled Water. *J Dent Children* 2004; 71 (2): 110-3.
10. Brandão IM, Valsecki Jr A. Análise de concentração de flúor em águas minerais na região de Araraquara, Brasil. *Rev Panam Salud Publica* 1998; 4(4): 238-42.
11. Freitas VPS, Brígido BM, Badoloto MIC, Mazon EMA, Alaburda J. Estudo comparativo de soluções-tampão para determinação de fluoreto em águas para diálise. *Rev do Inst Adolfo Lutz* 2003; 62 (3): 207-12.
12. Freitas VPS, Brígido BM, Alge ME, Silva CL, Zenebon O, Antunes JLF. Fluoreto em água: Estudo de metodologia analítica e níveis encontrados na região de Campinas. *Rev do Inst Adolfo Lutz* 1996; 56:29-36.
13. 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.
14. Lopes MRV, Santos CCM, Rigo KM. Estudo comparativo entre os procedimentos potenciométrico com eletrodo íon-seletivo para determinação de fluoreto em águas de abastecimento público segundo os métodos físico-químicos para análise de alimentos e com utilização minimizada de reagentes. *BIAL* 2005; 15(2): 7-9.
15. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial [INMETRO]. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Brasília; 2003. 31p.
16. São Paulo. Secretaria de Estado da Saúde. Resolução SS-250 de 15 de agosto de 1995. Define teores de concentração do íon fluoreto nas águas para consumo humano, fornecidas por sistemas públicos de abastecimento. *Diário Oficial [do] Estado de São Paulo*, São Paulo, SP, p. 11, 26 ago.1995, Seção 1.
17. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº274, de 22 de setembro de 2005 da do. Aprova o regulamento técnico para águas envasadas e gelo. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 22 set. 2005.
18. Buzalaf MAR, Granjeiro JM, Damante CA, Ornelas F. Fluoride content of infant formulas prepared with deionized, bottled mineral and fluoridated drinking water. *J Dent Children* 2001; 68: 37-41.
19. Franzman MR, Levy SM, Warren JJ, Broffitt B. Fluoride dentifrice ingestion and fluorosis of the permanent incisors. *J Am Dent Assoc* 2006; 137 (5): 645-52.
20. Prefeitura Municipal de São Paulo. Lei Municipal nº 12.623. de 6 de maio de 1998. Proíbe a comercialização de água mineral com teor de flúor acima de 0,8 mg/ no município e dá outras providências. *Diário Oficial [do] Município*, São Paulo, 06 maio 1998.

Determination and characterization of pathogens found in dairy products

Determinação e caracterização de agentes patogênicos encontrados em produtos lácteos

RIALA6/1231

Isabela Mateus MARTINS*, Dirce Yorika KABUKI, Arnaldo Yoshiteru KUAYE

*Endereço para correspondência: Laboratório de Higiene, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, CP6121, Campinas – SP CEP: 13083-862 Telefone: (19)35214011 E-mail: mmartins.isabela@gmail.com
Laboratório de Higiene, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).
Recebido: 14.08.2009 – Aceito para publicação: 23.11.2009

ABSTRACT

The quality of dairy products was investigated on 63 samples, being 24 nonindustrial-type ice creams, 19 pasteurized milk creams and 20 of cheese pâtés. The samples were analyzed for searching thermo-tolerant coliforms, coagulase positive *Staphylococcus*, *Salmonella* spp., molds and yeasts, *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. Additionally, characterization of the enterotoxigenic potential of *B. cereus* for the codified genes of enterotoxins NHE and HBL was also carried out by PCR technique; also the molecular subtyping of *L. monocytogenes* allelic polymorphism of virulence genes *actA* and *hly* was performed. Thirty-three percent (8/24) of ice cream samples and 15.8% (3/19) of milk cream samples did not comply with the microbiological standards established by RDC N°12/2001 of ANVISA, because these products showed thermo-tolerant coliform counts above the established limits. *L. monocytogenes* was detected in one milk cream sample and those bacteria isolates were identified as belonging to the lineage I, which is potentially pathogenic to human. Potentially enterotoxigenic *B. cereus* was isolated from the three kinds of products analyzed in the present study. The degree of microbiological contamination found in this study reflects the inadequate hygienic-sanitary conditions in processing the dairy products, indicating the necessity of a best action, surveillance and control by sanitary authorities.

Keywords. *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, Dairy Products, Pathogenicity, Polymerase Chain Reaction.

RESUMO

A qualidade de produtos derivados do leite foi verificada em 63 amostras, sendo 24 de sorvetes artesanais, 19 de cremes de leite pasteurizados e 20 de pâtés de queijo. As análises microbiológicas foram realizadas para averiguar a presença de coliformes termotolerantes, estafilococos coagulase positiva, *Salmonella* spp., bolores e leveduras, *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes*. Além disso, foram realizados ensaios para efetuar a caracterização do potencial enterotoxigênico de *B. cereus* quanto aos genes codificadores das enterotoxinas NHE e HBL por meio de técnica PCR e a subtipagem molecular dos genes *actA* e *hly* de *L. monocytogenes*. As 33% (8/24) de amostras de sorvetes e 15,8% (3/19) de amostras de cremes de leite estavam em desacordo com os padrões microbiológicos estabelecidos para coliformes termotolerantes, de acordo com a RDC N°12/2001 da ANVISA. A presença de *L. monocytogenes* foi observada em apenas uma amostra de creme de leite e os isolados da bactéria foram identificados como pertencentes à linhagem I, que é potencialmente patogênica ao homem. *B. cereus* com potencial enterotoxigênico foi isolado nos três grupos de alimentos estudados. O perfil de contaminação microbiológica observado nos produtos avaliados neste estudo serve de alerta para que os produtores melhorem as condições higiênico-sanitárias no processamento e da necessidade das autoridades sanitárias em estabelecer maior controle desses produtos.

Palavras-chave. *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, Produtos Lácteos, Patogenicidade, Reação em Cadeia da Polimerase.

INTRODUCTION

Milk and dairy products constitute an excellent medium for the development of deteriorative and pathogenic microorganisms. The presence of pathogens in milk products has been a concerning question of public health, since they have contributed to innumerable outbreaks of foodborne diseases¹.

The genera *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Bacillus* and *Listeria* are amongst the main microorganisms involved in the contamination of dairy products. Infections caused by the genera *Salmonella* are currently considered as the most important causes of foodborne diseases², and outbreaks involving *Salmonella enteritidis* in ice creams have been reported in the United States³ and England^{4,5}.

Another important microorganism prevalent in ice creams is *Staphylococcus aureus*^{6,7,8,9}, which is the agent of intoxication caused by the ingestion of a thermostable toxin preformed in foods. In Brazil, the presence of toxigenic *Staphylococci*, both coagulase positive and negative, has led to two outbreaks associated with the consumption of fresh Minas-type cheese and raw milk, which was evidenced as a microorganism frequently isolated in these foods^{10,11}.

Contamination by *Bacillus cereus* is highly significant, not only because it is widely spread in the environment, presenting spores resistant to heat treatment¹², but also due to its potential to cause emetic diseases and diarrhea. Gastroenteritis is attributed to the production of enterotoxins, including the hemolytic (HBL) and non-hemolytic (NHE) complexes¹³. Amongst other foods, this disease has been associated with the consumption of milk and dairy products² and some studies have isolated the microorganism in pâtés and ice creams^{14,15,16}, dairy creams¹⁷, and raw and pasteurized milk^{18,19,20}.

Listeria monocytogenes is considered to be a pathogen of considerable importance in public health, causing infection in humans which, due to the gravity of the disease, can lead to death¹². This pathogen has been detected in various foods, but is more common in raw milk and cheeses^{21,22,23,24}.

Genetic studies of virulent genes in *L. monocytogenes* isolates have shown the existence of three genetically distinct lineages, and by the assessment of the allelic polymorphism of the virulence genes *actA* and *hly*, may be divided into lineages I, II and III, with

lineage I being considered to be the one with the greatest pathogenic potential for humans²⁵.

Considering the important participation of dairy products in the population nutrition and the lack of surveys with respect to the innocuousness of ice creams, dairy creams and pâtés in Brazil, the aim of this study was to identify the hazards associated with the consume of these products, sold in the city of Campinas-SP, and the consequent compliance with the microbiological pattern established by the Brazilian National Agency for Sanitary Surveillance (ANVISA), the RDC 12/01²⁶; in addition, to verify the presence of *Bacillus cereus* potentially enterotoxigenic and *Listeria monocytogenes* in these products.

MATERIAL AND METHODS

Sampling

Sixty-three samples of dairy products commercialized at Campinas city (SP, Brazil) were analyzed, consisting of 24 samples of artisan-type ice creams with three different flavors produced in four local ice cream manufacturers, 19 samples of pasteurized dairy creams from six different brands and 20 samples of cheese pâtés from different brands and with varied flavors, sold in supermarkets. The samples were transported to the laboratory in isothermal boxes with ice. Ice creams were stored at freezing temperature (-17°C), and the other products at 4°C, until analyzed.

Microbiological analyses

The microbiological analyses for the thermo-tolerant coliforms, coagulase positive staphylococcal count, detection of *Salmonella* spp., *Bacillus cereus* count and the yeast and mold count were all carried out according to the methodologies commended by the *American Public Health Association*²⁷. The presence of *Listeria monocytogenes* was evaluated using the methodology proposed by the *Canadian Health and Food Branch*²⁸.

The thermo-tolerant coliforms count was carried out using the Most Probable Number (MPN) technique in a series of three tubes containing lauryl sulphate tryptose broth (LST, Oxoid), incubated at 35°C/24-48h, followed by transference to EC broth (Merck) and incubation at 45°C/24-48h. For the *B. cereus*, coagulase positive *Staphylococcus* and yeast and mold counts, the surface streaking technique was used on mannitol egg yolk polymixin agar (MYP, Difco) with incubation at

30°C/24h, Baird Parker agar (BP, Difco) with incubation at 35°C/48h, and dichloran Bengal rose chloramphenicol agar (DBRC, Oxoid) with incubation at 25°C/4 days, respectively. *B. cereus* and *Staphylococcus* spp. typical colonies were identified morphologically by the Gram stain and other specific biochemical tests²⁷.

To detect *Salmonella* spp., 25 grams of sample, pre-enriched in buffered peptone water (Oxoid) were incubated at 35°C/24h and then transferred to tetrathionate selective enrichment broth (Difco) and Rapaport Vassiliadis (Oxoid), with incubation at 35°C/24h and 42°C/24h, respectively. They were then transferred to the selective media xylose lysine desoxycholate agar (XLD, Difco), bismuth sulphite agar (BS, Difco) and Hektoen enteric agar (HE, Acumedia, Michigan) and incubated at 35°C/24h. Typical colonies were transferred to triple sugar iron agar (TSI, Difco) and lysine iron agar (LIA, Difco) and incubated at 35°C/24h. The isolates showing typical reactions in TSI and LIA were identified by complementary biochemical assays and serology²⁷.

The research of *L. monocytogenes* was carried out using 25 grams of samples, which were enriched in modified Listeria enrichment broth (LEB, Difco), incubated at 30°C/24-48h, followed by enrichment in modified Fraser broth (MFB, Difco), incubated at 35°C/24-48h. For isolation purposes, lithium chloride phenyl ethanol moxalactam agar (LPM, Difco) and Oxford agar (OXA, Difco) were used, and incubated at 30°C/48h and 35°C/48h, respectively. Typical colonies were identified by the morphological characteristics and biochemical tests²⁸.

Characterization of the enterotoxigenic potential of *B. cereus*

The enterotoxigenic potential of 25 isolates of *B. cereus* was evaluated by determining the presence of the genes *nheA*, *nheB* and *nheC*, codifiers for NHE complex, and *hblA*, *hblC* and *hblD* codifiers for HBL complex by the PCR (*Polymerase Chain Reaction*) technique. The isolates were inoculated in brain heart infusion broth (BHI, Difco) supplemented with 1% of the glucose (Difco) and incubated in shaker at 200rpm, at 32°C for 18 hours. To DNA extraction, 250 µl of the broth were centrifuged at 13.000 x g for 10 min. The supernatant was discharged, the bacteria cells were suspended in TE buffer [(Tris (Merck) 10mM, EDTA (Sigma) 1mM, pH=7,5] and boiled in water bath at 100°C for 10 minutes

as previously utilized²⁹. The primers and PCR reaction were carried out as described by Hansen; Hendriksen¹³.

Subtyping of *L. monocytogenes*

The molecular subtyping of 10 isolates of *L. monocytogenes* obtained from a sample of pasteurized dairy cream was carried out by evaluating the allelic polymorphism of the genes *actA* and *hly*. The gene *actA* was characterized by the PCR technique and the *hly* gene by the PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) technique using the restriction enzymes *HhaI* and *HpaII*²⁵.

RESULTS AND DISCUSSION

The microbiological standards established for commercialized products in Resolution RDC nº 12/01 of the Brazilian National Agency for Sanitary Surveillance (ANVISA)²⁶, were adopted as the reference for the thermo-tolerant coliforms, coagulase positive *Staphylococcus*, *Salmonella* spp. and *B. cereus* counts in the samples of ice creams, dairy creams and pâtés. The frequency of samples not compliant with the patterns established for the foods analyzed, is shown in Table 1.

The percentage of samples not compliant with regulation was higher for ice creams, followed by dairy creams and pâtés. Thirty-three percent (8/24) of ice cream samples and 15.8% (3/19) of dairy cream exceeded the standard pattern by containing 1.7 log MPN/g and 1 log MPN/g of thermo-tolerant coliforms, respectively. The count of thermo-tolerant coliforms ranged from <0.5 to 3.4 log MPN/g in ice creams and <0.5 to 3.1 log MPN/g in dairy creams.

Another work in Brazil showed 58% of artisan-type ice creams over the maximum acceptable limit established by ANVISA for thermo-tolerant coliforms⁷. In Korea, Jo et al.³⁰ found coliforms counts in ice creams ranging from 1.7 to 2.4 log CFU/g. The high quantity of samples not compliant with the legal patterns found for thermo-tolerant coliforms in ice cream and dairy creams indicates contamination of fecal origin during processing, suggesting the presence of enteropathogens.

However, 5% (1/20) of the pâté samples were out of pattern (3 log CFU/g) by containing 4.5 log CFU/g of *B. cereus*. In contrast to the samples of dairy creams and ice creams, they did not present thermo-tolerant coliforms above the limit established for this product (2 log MPN/g).

Table 1. Percentage of samples not compliant with the microbiological criteria established in RDC 12/2001(Brazil)

Food	Number of samples	Number of non-compliant samples (%)			
		Thermo-tolerant coliforms	Coagulase positive <i>Staphylococcus</i>	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Bacillus cereus</i>
Ice cream	24	8 (33.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	Nd*
Dairy cream	19	3 (15.8)	0 (0.0)	0 (0.0)	Nd*
Pâté	20	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (5.0)

*Not determined as reference microbiological pattern (RDC N°12/01).

For the other established patterns, all the samples exhibited counts of coagulase positive *Staphylococcus* less than the legal limit of 2.0 log CFU/g, and absence of *Salmonella* spp. (**Table 1**), thus complying with the legislation. André et al.¹⁰, to the contrary, found 66.7% and 70.8% of samples positive for *S. aureus* in raw milk and Minas-type fresh cheese manufactured in Goiás, Brazil.

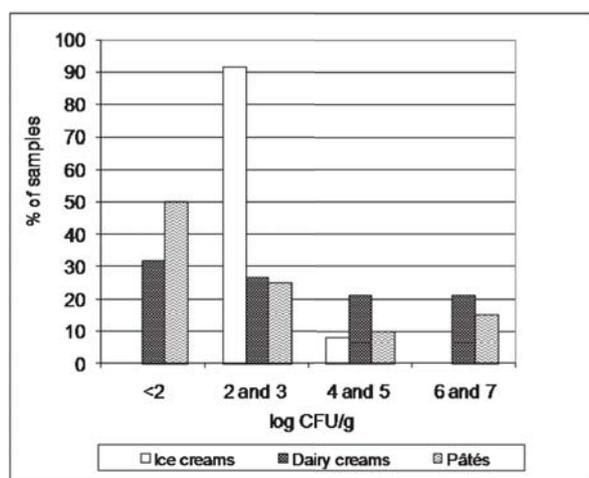


Figure 1. Frequency of Molds and Yeasts detected in milk products.

Determinations of molds and yeasts, *B. cereus* and *L. monocytogenes* in ice creams and pasteurized dairy creams, complementary to those required by Brazil regulation, were performed to establish largeness microbial profile for these products. The quantification of molds and yeasts, considered as indicators of the environmental conditions during processing, indicated the high counts (**Figure 1**). Variations ranged from 2.0

to 4.4 log CFU/g for ice creams, <2.0 to 6.5 log CFU/g for dairy creams and <2 to 7.7 log CFU/g for pâtés. In ice creams, the results were similar to those reported by Warke et al.³¹ and Kanbakan et al.⁹, and than the ones found by Jo et al.³⁰.

The elevated numbers of fecal coliforms, yeasts and molds found in the products evaluated, showed the need for control practices with respect to environmental contamination and the hygienic-sanitary condition of the production line, and also during the commercialization and handling of these products.

The complementary analysis for *B. cereus* were carried out since this microorganism is widely distributed in the environment and also because its spores are heat resistant and can survive pasteurization, which contributes to their presence in foods^{18,19}. **Figure 2** shows the results of the *B. cereus* counts found in the samples, varying from <2 to 3.1 log CFU/g in the ice creams, a result similar to that found by Warke et al.³¹. The count of 4.5 log CFU/g found in a single sample of pâté was similar to others values previously described^{14,16}. Dairy cream samples revealed higher counts (up to 7.4 log CFU/g), and for 10,5% (2/19) of the samples, the count level may represent risk for the development of diarrheic syndrome to consumer once the infective dose of *B. cereus* have been associated to 5 log of feasible cells³². This pathogen was also found in significant amounts in raw and pasteurized milk¹⁸ and other dairy products such as fresh Minas-type cheese and ricotta^{33,34}.

The present study and others already published^{18,33,34} evidence the need for authorities and producers to adopt *B. cereus* as a reference in microbiological hazard control, particularly for dairy products.

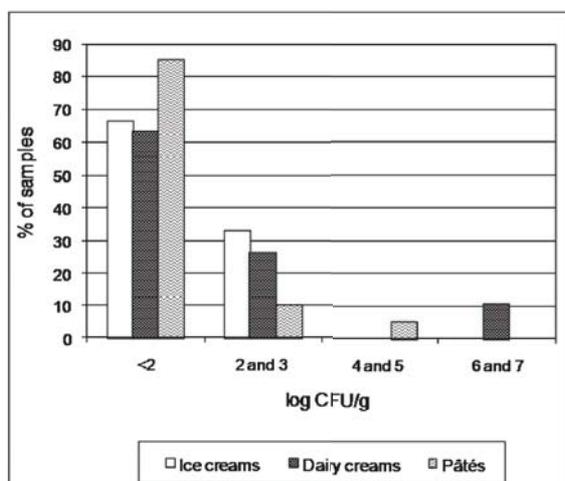


Figure 2. Frequency of *B. cereus* detected in milk products.

The characterization of the enterotoxigenic potential of *B. cereus* strains, performed via PCR of the coding genes of the main enterotoxins, NHE and HBL is shown in **Table 2**. From the 25 isolates of *B. cereus* proceeding from the milk products, 100% (25/25) were positive for at least one of the six genes tested, 32% (8/25) were positive for the three genes coding for the HBL hemolysin (*hblA*, *hblD* e *hblC*), and the three genes coding for the NHE enterotoxin (*nheA*, *nheB* e *nheC*) were detected in 76% (19/25) of the isolates. Other works with dairy products also observed the prevalence

of NHE complex genes in *B. cereus* isolates^{15,18,19,20,29,33}, confirming that these genes appear to be present in the majority of the isolates of this pathogen³⁵.

Among the 25 isolates of *B. cereus*, 6 distinct toxigenic profiles were characterized (**Table 2**). For ice creams, there was predominance of only one of the genes that code the NHE complex (61.5%). The isolates of dairy creams showed higher profile scope, and 33.4% had all the analyzed genes. Among the pâtés, only the three genes that express the NHE complex were detected in two isolates, and all the genes (HBL and NHE complexes) were detected in only one of the isolates.

The maximum biological activity of enterotoxins (HBL and NHE) depends on the presence of three proteins^{36,37}. Therefore, most of the isolates exhibit at least three HBL and/or NHE genes, and these are potentially capable of producing enterotoxins in favorable conditions.

The diversity among strains may increase the chances of the persistent environmental contamination to reach the finished products³⁸. The food exposure to air environmental during extended time, to improper hygiene conditions on counters and equipment, and to abusive temperatures are frequently associated to eventual contaminations by foodborne pathogens and enterotoxin production by *B. cereus*^{18,19,20}.

L. monocytogenes may be found in several foods, including pâtés^{39,40}, ice creams^{8,31,41} and dairy creams⁴¹. In our work, it was isolated only in one sample of pasteurized dairy cream and *Listeria welshimeri* was

Table 2. Enterotoxigenic profile of *B. cereus* isolated from ice creams, pâtés and pasteurized dairy creams

HBL			NHE			Foods		
<i>hblA</i>	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	Ice cream	Dairy cream	Pâté
+	+	+	+	+	+	23.1% (3/13)	33.4% (3/9)	33.3% (1/3)
-	-	-	+	+	+	61.5% (8/13)	22.2% (2/9)	66.7% (2/3)
-	-	-	+	-	+	7.7% (1/13)	22.2% (2/9)	0
-	+	+	-	-	-	7.7% (1/13)	0	0
+	+	+	+	+	-	0	11.1% (1/9)	0
-	-	+	+	+	-	0	11.1% (1/9)	0

Table 3. Frequency of *Listeria* species detected in milk product samples

Food	Number of samples analyzed	Number of positive samples (%)	Species
Dairy cream	19	1(5.25) 1(5.25)	<i>L. monocytogenes</i> <i>L. welshimeri</i>
Ice cream	24	1 (4.1)	<i>L. welshimeri</i>
Pâté	20	0	-

detected in two samples, one of dairy cream and one of ice cream (**Table 3**). Similarly, *L. monocytogenes* has been detected recently, with low frequencies (2.35% - 5.1%), in other dairy products such as cheeses, raw milk, yogurt and butter^{21,22,24,33}.

L. monocytogenes isolates from the dairy cream sample were genetically characterized by studying the allelic polymorphism of virulence genes *actA* and *hly*. The gene *actA* has 2 alleles named as types 3 and 4, according to the presence of 3 or 4 proline-rich repeats regions²⁵, and the type 4 was found among the isolates investigated. PCR-RFLP distinguishes 8 alleles for gene *hly*; allele 1 was identified in all the isolates evaluated, thus belonging to lineage I, and considered particularly pathogenic to human.

The analyses of *actA* and *hly* types enable us to separate *L. monocytogenes* in three lineages²⁵. Similarity in works with ricotta cheese and Latin-type fresh cheese, all the isolates were also lineage I^{23,33}. Based on the genetic characterization of the isolates, the pasteurized dairy cream may represent a product that exposes the consumer to risks, due to the presence of lineage I, potentially pathogenic and previously associated to human listeriosis outbreaks⁴².

This investigation has a great public health importance and must have the attention of dairy industries to apply the Good Manufacture Practices throughout the production chain, and of the competent authorities of public health, that must establish more strict microbiological parameters and controls to guarantee safety products to consumer and decrease the incidence of food poisonings and costs in the health sector.

CONCLUSIONS

Our findings highlights the high rate of thermo-tolerant coliforms contamination in artisan-type ice cream samples, far exceeding in some cases the regulation limit. Regarding the pâtés samples, the different rates of molds and yeasts and *B. cereus* may be associated to high environmental contamination. Further the pasteurized dairy creams were the products that showed a great potential risk due to the high contamination level of potentially enterotoxigenic *B. cereus* and the presence of *L. monocytogenes* virulent strain.

REFERENCES

- De Buyser ML, Dufour B, Marie M, Lafarge V. Implication of milk and milk products in food-borne disease in France and different industrialized countries. *Int J Food Microbiol* 2001; 67 (1-2): 1-17.
- Germano PML, Germano MIS. *Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos*. São Paulo: Varela, 2001.
- Henessy TW, Hedberg CW, Slutsker L, White KE, Besser-Wiek JM, Moen ME, Feldman J, Coleman WW, Edmonson LM, MacDonald KL, Osterholm MT. A national outbreak of *Salmonella enteritidis* infections from ice cream. *N Engl J Med* 1996; 334 (20): 1281-6.
- Djuretic T, Wall PG, Nichols G. General outbreaks of infectious intestinal disease associated with milk and dairy products in England and Wales: 1992 to 1996. *Commun Dis Rep CDR Wkly* 1997; 7: 41-5.
- Dodhia H, Kearney J, Warburton F. A birthday party, home-made ice cream, and an outbreak of *Salmonella enteritidis* pahge type 6 infection. *Commun Dis Public Health* 1998; 1: 31-4.
- Armondes MP, Issy PN, André MCDPB, Serafini AB. Aspectos higiênico-sanitários de sorvetes produzidos artesanalmente na cidade de Goiânia, GO. *Hig Alim* 2003; 17 (107): 86-94.
- De Farias FE, Da Silva WR, Botelho ACN, Da Hora IMC, Kronenberger G, Da Cruz AG. Microbiological quality of ice creams

- commercialized in some cities in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Int J Dairy Technol* 2006; 59 (4): 261-4.
8. El-Sharef N, Ghenghesh KS, Abognah YS, Gnan SO, Rahouma A. Bacteriological quality of ice cream in Tripoli-Libya. *Food Control* 2006; 17: 637-41.
 9. Kanbakan U, Çon AH, Ayar A. Determination of microbiological contamination sources during ice cream production in Denizli, Turkey. *Food Control* 2004; 15: 463-70.
 10. 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 SmaI digestion. *Food Control* 2008; 19: 200-07.
 11. Carmo LS, Dias RS, Linardi VR, Sena MJ, Santos DA, Faria ME, Pena EC, Jett M, Heneine LG. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiol* 2002; 19: 9-14.
 12. Franco BDGM, Landgraf M. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Atheneu, 2005.
 13. Hansen BM, Hendriksen NB. Detection of Enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Strains by PCR Analysis. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 185-9.
 14. Rosenquist H, Smidt L, Andersen SR, Jensen GB, Wilcks A. Occurrence and significance of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* in ready-to-eat food. *FEMS Microbiol Lett* 2005; 250: 129-36.
 15. Wijnands LM, Dufrenne JB, Rombouts FM, Veld PH, Leusden FM. Prevalence of potentially pathogenic *Bacillus cereus* in food commodities in the Netherlands. *J Food Prot* 2006; 69 (11):2587-94.
 16. Wong TL, Carey-Smith GV, Hollis L, Hudson JA. Microbiological survey of prepackaged pâté and ham in New Zealand. *Lett Appl Microbiol* 2005; 41: 106-11.
 17. Arnensen LPS, O'Sullivan K, Granum PE. Food poisoning potential of *Bacillus cereus* strains from Norwegian dairies. *Int J Food Microbiol* 2007; 116: 292-6.
 18. Bartoszewicz M, Hansen BM, Swiecicka I. The members of *Bacillus cereus* group are commonly present contaminants of fresh and heat-treated milk. *Food Microbiol* 2008; 25: 588-96.
 19. Svensson B, Monthán A, Guinebretière MH, Nguyen-Thé C, Christiansson A. Toxin production potential and the detection of toxin genes among strains of the *Bacillus cereus* group isolated along the dairy production chain. *Int Dairy J* 2007; 17: 1201-08.
 20. Zhou G, Liu H, He J, Yuan Y, Yuan Z. The occurrence of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis* and *B. mycoides* in Chinese pasteurized full fat milk. *Int J Food Microbiol* 2008; 121: 195-200.
 21. Aygun O, Pehlivanlar S. *Listeria* spp. in the raw milk and dairy products in Antakya, Turkey. *Food Control* 2006; 17: 676-9.
 22. Colak H, Hampikyan H, Bingol EB, Ulusoy B. Prevalence of *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. in Tulum cheese. *Food Control* 2007; 18: 576-9.
 23. Kabuki DY, Kuaye AY, Wiedmann M, Boor KJ. Molecular subtyping and tracking of *Listeria monocytogenes* in latin-style fresh-cheese processing plants. *J Dairy Sci* 2004; 87: 2803-12.
 24. Kalorey DR, Warke SR, Kurkure NV, Rawool DB, Barbudde SB. *Listeria* species in bovine raw milk: A large survey of Central India. *Food Control* 2008; 19: 109-12.
 25. Wiedmann M, Bruce JL, Keating C, Johnson AE, McDounough PL, Batt CA. Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential. *Infect Immun* 1997; 65 (7): 2707-16.
 26. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001. Aprova regulamento técnico sobre padrões microbiológicos em alimentos. Diário Oficial [da] republica federativa do Brasil. Brasília, DF, 10 de jan. 2001, Seção 1.
 27. Downes FP, Ito K. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4th edition, Washington: American Public Health Association, 2001, 676p.
 28. Pagotto F, Daley E, Farber J, Warburton, D. Isolation of *Listeria monocytogenes* from all food and environmental samples. In: CANADA. Health Products Food Branch. *Compendium of analytical methods: laboratory procedures of microbiological analytical of foods*, [MFHPB 30] Ottawa, 2001. Available from: <http://www.hc-sc.gc.ca>
 29. Kabuki DY, Soares CM, Souza RM, Kuaye AY. Avaliação do perfil enterotoxigênico de *Bacillus cereus* isolados de queijos Minas frescal. XX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Curitiba, PR, 2006.
 30. Jo C, Kim H-J, Kim D-H, Lee W-K, Ham, J-S, Byun, M-W. Radiation sensitivity of selected pathogens in ice cream. *Food Control* 2007; 18: 859-65.
 31. Warke R, Kamat A, Kamat M, Thomas P. Incidence of pathogenic psychrotrophs in ice creams sold in some retail outlets in Mumbai, India. *Food Control* 2000; 11: 77-83.
 32. Kramer JM, Gilbert RJ. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In: Doyle MP, ed. *Foodborne bacterial pathogens*. New York: Marcel Dekker, 1989, p. 21-69.
 33. Esper LMR. Diagnóstico da qualidade de ricotas comercializadas no município de Campinas - SP. [dissertação] Campinas, São Paulo: Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP); 2006.
 34. Kabuki DY, Rocha JAK, Kuaye AY. Ocorrência de *Bacillus cereus* em queijos Minas frescal elaborados por diferentes processos tecnológicos. XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, Santos, SP, 2005.
 35. Granum PE. *Bacillus cereus*. In M. P. Doyle (Ed.), *Food microbiology: Fundamentals and frontiers*. Washington, DC, USA: ASM Press, p.373-81, 2001.
 36. Beecher DJ, Schoeni JL, Wong ACL. Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infect Immun* 1995; 63(11): 4423-8.
 37. Schoeni JL, Wong ACL. *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins. *J Food Prot* 2005; 68(3): 636-48.
 38. Guinebretière MH, Nguyen-The C. Sources of *Bacillus cereus* contamination in a pasteurized zucchini purée processing line, differentiated by two PCR-based methods. *FEMS Microbiol Ecol* 2003; 43(2): 207-15.
 39. Nichols G, McLauchlin J, Louvois J. The contamination of pâté with *Listeria monocytogenes*. Results from the 1994 European Community – Coordinated Food Control Program for England and Wales. *J Food Prot* 1998; 61(10): 1299-1304.
 40. Dominguez C, Gomez I, ZumalacarreGUI J. Prevalence and contamination levels of *Listeria monocytogenes* in smoked fish and pâté sold in Spain. *J Food Prot* 2001; 64 (12): 2075-7.
 41. Kiss R, Tircza T, Szita G, Bernath S, Csikó G. *Listeria monocytogenes* food monitoring data and incidence of human listeriosis in Hungary. *Int J Food Microbiol* 2004; 112: 71-4.
 42. Swaminathan B, Gerner-Smidt P. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes Infect* 2007; 9: 1236-43.

Avaliação físico-química e sensorial de pães de forma enriquecidos com soro de leite em pó

Physical-chemical and sensory evaluation of pan breads enriched with powder whey

RIALA6/1232

Adriana de Sousa LIMA^{1*}, Janeeyre Ferreira MACIEL¹, Rita de Cássia Ramos do Egipto QUEIROGA², Eufrásio de Andrade Lima NETO³, Ulisses Umbelino dos ANJOS³, Larissa Raphaela Gonçalves de FARIAS¹

*Endereço para correspondência: Cidade Universitária, s/n, Campus Universitário I, Bairro Castelo Branco, CEP: 58059-900, João Pessoa, Paraíba (PB), Brasil, Telefones: (83) 32167384/ (83) 88821351.
e-mail: adrianalimanutri@yahoo.com.br.

¹Laboratório de Microbiologia, Centro de Tecnologia, Departamento de Tecnologia e Química de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba (PB), Brasil.

²Laboratório de Bromatologia, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Nutrição, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba (PB), Brasil.

³Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Departamento de Estatística, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba (PB), Brasil.

Recebido: 14.08.2009 – Aceito para publicação: 09.11.2009

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi enriquecer pão de forma com soro de leite em pó, disponibilizando ao produto final maior concentração de proteínas e minerais, especialmente cálcio e fósforo, além de incentivar o consumo de derivados do soro de leite, resíduo da indústria de laticínios normalmente destinado a alimentação de animais ou ao descarte. Esse ingrediente foi adicionado nas concentrações de 5, 7,5 e 10%, sob duas diferentes formas: 1. misturado diretamente à farinha; 2. dissolvido em água e tratado termicamente. Ainda, foi elaborado pão de forma convencional, para fins de comparação. Os pães foram avaliados quanto a preferência e aceitação, e submetidos às análises de pH, acidez, volume específico e umidade. As concentrações de proteínas, lipídios, cinzas, cloretos, cálcio e fósforo foram determinadas somente nos pães selecionados nos testes sensoriais. Todos os pães foram aceitos, pois obtiveram escores médios acima de 5,0 (“não gostei, nem desgostei”), entretanto os que continham 10% de soro de leite em pó tratado termicamente e 7,5% deste ingrediente, na forma não tratada, foram selecionados, por terem sido tão bem aceitos quanto o pão convencional, com escores médios acima de 7,0 (“gostei regularmente”). O uso de 10% de soro de leite em pó promoveu incrementos de proteínas, cálcio e fósforo (30,7%, 185% e 38,5%, respectivamente), contribuindo para que o aporte diário desses nutrientes alcance os níveis de recomendação preconizados.

Palavras-chave. pão de forma, soro de leite em pó, tratamento térmico, valor nutritivo.

ABSTRACT

In this work the aim was to enrich pan bread with powdered whey, providing to the final product higher concentration of protein and minerals, especially calcium and phosphorus, beyond to encourage the consumption of products derived from whey, waste of dairy industry usually destined for animal feed or disposal. This ingredient was added in concentrations of 5, 7.5 and 10%, under two different forms: 1. mixed directly to the flour, 2. dissolved in water and heat treated. Still, the conventional pan bread was elaborated, for comparison. The breads were evaluated for preference and acceptance, and for pH, acidity, specific volume and moisture analyses. The proteins, lipids, ash, chlorides, calcium and phosphorus analyses were determined only in the pan breads selected in the sensorial tests. All pan breads were accepted, with mean scores above 5.0 (“indifferent”), however, those containing 10% of heat treated powdered whey and 7.5% of this non heat treated ingredient were selected because they were so well accepted as the conventional pan bread, with mean scores above 7.0 (“like regular”). The use of 10% of powdered whey promoted increments in proteins, calcium and phosphorus concentrations (30.7%, 185% and 38.5% respectively), contributing to the daily intake of these nutrients reaches the recommended levels.

Key words. pan bread, powdered whey, heat treatment, nutritive value.

INTRODUÇÃO

O soro de leite, considerado principal resíduo da indústria de laticínios, é um derivado lácteo recomendado como substituto do leite em diversos produtos alimentícios, incluindo pães, podendo ser adicionado tanto na forma fluida ou em pó (integral ou fracionado). Suas proteínas possuem um dos mais altos índices de valor biológico, quando comparadas com outras fontes protéicas como ovos, caseína, carnes e, principalmente a soja. Quanto aos minerais, é considerado uma boa fonte de cálcio e fósforo^{1,2}. Além dos benefícios nutricionais, pesquisas demonstram diversos efeitos terapêuticos que as proteínas do soro de leite parecem exercer no organismo, tais como atividades anticâncer, antimicrobiana e antiviral, antiulcerogênica, proteção ao sistema cardiovascular, ação imunomoduladora, dentre outras^{3,4,5}.

A adição do soro de leite em pó às formulações de pães irá contribuir para a melhoria nutricional desses produtos, especialmente em termos de proteínas de alto valor biológico e cálcio, tendo em vista que a farinha de trigo, principal ingrediente da panificação, apresenta deficiências em certos aminoácidos essenciais como por exemplo, a lisina, e contém baixa concentração (20mg/100g) e biodisponibilidade de cálcio⁶. Essa prática promoverá um maior aproveitamento dos nutrientes do soro de leite na alimentação humana, visto que ainda predomina o seu uso na alimentação animal e o descarte em águas residuais, gerando sérios problemas ambientais.

Quando acrescentados aos produtos de panificação, o soro de leite em pó também promove melhoria nas características sensoriais, incrementando a cor da crosta e conferindo maciez aos pães⁷. Entretanto, a concentração desse ingrediente lácteo a ser adicionada nas formulações de pães de forma tem sido limitada devido a problemas associados à capacidade de absorção de água pela massa, gerando produtos com baixo teor de umidade.

Diversas pesquisas reportam redução no tempo de mistura e pouca elasticidade da massa, bem como depressão no volume de pães formulados com soro de leite em pó em altas concentrações e sem tratamento térmico^{8,9,10}. Esses efeitos negativos estão associados à interação entre proteínas do soro de leite e proteínas do glúten¹¹.

Alguns pesquisadores verificaram que a aplicação de tratamento térmico às proteínas do soro de leite resultou em melhoria significativa na qualidade dos pães,

promovendo aumento no volume e redução na taxa de envelhecimento, prolongando seu frescor^{8,9}. O objetivo deste trabalho foi avaliar as características físico-químicas e sensoriais de diferentes formulações de pães de forma enriquecidas com soro de leite em pó, selecionando as que obtiverem melhor aceitação sensorial para fins de avaliação do valor nutricional.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

O soro doce de leite em pó foi fornecido pela empresa Alibra Ingredientes Ltda, localizada em Campinas, São Paulo.

Os ingredientes usados para a produção dos pães de forma foram: farinha de trigo especial (1500 g), fermento biológico seco instantâneo (15 g), açúcar cristal (90 g), gordura vegetal hidrogenada (45 g), sal (25,5 g) e água (825 mL), sendo adquiridos em estabelecimentos comerciais de João Pessoa, PB.

MÉTODOS

Formulações e elaboração dos pães

Os pães de forma foram enriquecidos com soro de leite em pó nas concentrações 5%, 7,5% e 10%, adicionado sob duas diferentes formas: 1. misturado diretamente à farinha; 2. dissolvido em parte da água da formulação, tratado termicamente a 80°C/10 minutos e resfriado a 10°C.

Um total de sete formulações foi avaliado: pão de forma convencional (sem soro de leite em pó - PC); pães de forma com soro de leite em pó, misturado diretamente à farinha (PSLP 5%, PSLP 7,5% e PSLP 10%) e pães de forma com soro de leite em pó, dissolvido e tratado termicamente (PSLPT 5%, PSLPT 7,5% e PSLPT 10%).

Todos os ingredientes secos foram homogeneizados em um misturador tipo espiral, na velocidade lenta por 15 minutos (até atingir o ponto de véu), sendo feita a adição de SLPT e/ou água. Em seguida, a massa que se encontrava com temperatura de 24 °C foi boleada e submetida a descanso por 10 minutos, sendo posteriormente, dividida em unidades de 750 g. Após a modelagem manual, porções individuais foram colocadas em formas (22 x 11 cm) previamente untadas com gordura vegetal hidrogenada e transportadas até a câmara de fermentação, permanecendo por, aproximadamente 1 hora e 40 minutos, a 35 ±1°C. Os pães foram assados a 200 °C por 20 minutos, e após

três horas de resfriamento foram fatiados, embalados em sacos plásticos de polietileno e armazenados à temperatura ambiente até a realização das análises.

Análises físico-químicas

As sete formulações de pães foram submetidas às análises de pH¹², em pHmetro da marca WTW-Germany, modelo 330i; acidez titulável¹², expressa em mL de NaOH 0,1N consumido por 10g de pão, até pH 8,5; volume específico¹³ e umidade¹⁴(012/IV). As determinações de proteínas¹⁴ (036/IV), lipídios¹⁴ (032/IV), cinzas¹⁴(437/IV), cálcio¹⁴ (396/IV), cloretos¹⁴ (028/IV), fósforo¹⁵ e carboidratos, por diferença, foram realizadas somente nas formulações selecionadas nos testes sensoriais. Todas as análises foram efetuadas em triplicata.

Avaliação sensorial

Os pães de forma com soro de leite em pó foram avaliados 24 horas após seu processamento, no Laboratório de Análise Sensorial da Universidade Federal da Paraíba, em cabines individuais sob luz branca, sendo servidos em pratos brancos descartáveis codificados (três dígitos aleatórios), acompanhados de um copo com água mineral para enxágue bucal.

No teste de comparação pareada-preferência, 35 provadores não treinados avaliaram a preferência dos pães de forma em três etapas: 1) foram julgados dois pares de amostras, contendo soro de leite em pó sem tratamento térmico (PSLP 5% e PSLP 7,5%; PSLP 5% e PSLP 10%); 2) foram julgados dois pares de amostras contendo soro de leite em pó, dissolvido e tratado termicamente (PSLPT 5% e PSLPT 7,5%; PSLPT 5% e PSLPT 10%); 3) foi julgado um par de amostras, constituído pelas formulações preferidas na primeira e segunda etapas. Quando não foi verificada a preferência, optou-se pela amostra de pão de forma com maior concentração de soro de leite em pó.

A aceitação foi avaliada de forma global por 50 provadores não treinados, utilizando escala hedônica de 9 pontos, com escores variando de 9 “gostei extremamente” a 1 “desgostei extremamente”¹⁴, sendo consideradas aceitas as amostras que obtiveram escores médios superiores a 5,0 (equivalente ao termo hedônico “não gostei e nem desgostei”)¹⁶.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) (protocolo nº0084).

Análise estatística

Os resultados das análises físico-químicas dos pães tiveram inicialmente suas médias e desvios padrão determinados, para posteriormente serem submetidos aos testes de Lilliefors e Levene, a fim de serem verificadas a normalidade e homocedasticidade. Os dados que não apresentaram normalidade e homogeneidade foram analisados utilizando-se o teste não paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney¹⁷. No teste sensorial de aceitação, foi realizada Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey, a 5% de probabilidade, para comparação das médias. Esses dados foram processados utilizando-se o pacote estatístico “R”¹⁷. Com relação ao teste sensorial de comparação pareada-preferência, os resultados foram confrontados com valores tabelados, a 5% de probabilidade¹⁸.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação físico-química dos pães

As médias e os desvios padrão das determinações físico-químicas realizadas no pão de forma convencional (PC) e nos pães contendo soro de leite em pó, nas duas formas de adição (não tratado e tratado termicamente) e nas concentrações 5%, 7,5% e 10%, estão apresentados nas Tabelas 1 e 2.

Os valores médios de pH e acidez dos pães variaram, respectivamente, de 5,20-5,49 e de 4,21-4,63 mL de NaOH 0,1N/10 g pão. Martinez-Anaya et al.¹⁹ verificaram valores de pH e acidez variando de 5,40-5,70 e de 2,9-4,5 mL de NaOH 0,1N/10 g pão, respectivamente, para pães adicionados somente de levedura de padaria. Quando bactérias lácticas foram adicionadas juntamente com leveduras, o pH e a acidez variaram, respectivamente, de 4,92-5,33 e de 3,38-5,13 mL de NaOH 0,1N/10 g de pão.

A adição de soro de leite em pó promoveu elevação no pH dos pães, sem alterar a acidez, com exceção da formulação PSLPT 10%, que apresentou acidez elevada, indicando tratar-se de massa ácida. Quílez et al.²⁰ ao estudarem pães fermentados somente por levedura de padaria observaram que a aceitação aumentava com a elevação no pH e redução na acidez. Contrariamente, a formulação PSLPT 10%, com maior acidez, apresentou boa aceitação sensorial, semelhante a do pão de forma convencional. Tebaldi et al.²¹ verificaram uma variação no pH de 5,11 a 5,76, em pães de forma consumidos na cidade do Rio de Janeiro, não sendo mencionados valores de acidez.

Tabela 1. Resultados das análises físico-químicas dos pães de forma convencional e adicionado de soro de leite em pó

Formulações	pH	Acidez (mL de NaOH 0,1N/10g de pão)	Volume específico (cm ³ /g ⁻¹)	Umidade (%)
PC	5,20 ^a ±0,04	4,21 ^a ±0,34	4,06 ^a ±0,36	34,92 ^a ±0,26
PSLP 5%	5,30 ^b ±0,05	4,42 ^a ±0,58	4,46 ^b ±0,19	32,85 ^b ±0,97
PSLP 7,5%	5,45 ^c ±0,07	4,34 ^a ±0,32	4,06 ^a ±0,12	33,08 ^{b,c} ±0,87
PSLP 10%	5,49 ^c ±0,04	4,25 ^a ±0,50	4,14 ^a ±0,24	33,59 ^c ±0,95

Médias seguidas de letras diferentes, na mesma coluna, diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney, a 5% de significância.

PC= pão de forma convencional (sem soro de leite em pó); PSLP 5%, PSLP 7,5% e PSLP 10% = pães de forma contendo 5%, 7,5% e 10% de soro de leite em pó, na forma não tratada; respectivamente.

Tabela 2. Resultados das análises físico-químicas dos pães de forma convencional e adicionado de soro de leite em pó tratado termicamente

Formulações	pH	Acidez (mL de NaOH 0,1N/10g de pão)	Volume específico (cm ³ /g ⁻¹)	Umidade (%)
PC	5,20 ^a ±0,04	4,21 ^a ±0,34	4,06 ^a ±0,36	34,92 ^a ±0,26
PSLPT 5%	5,38 ^b ±0,13	4,30 ^a ±0,53	4,14 ^{a,b} ±0,14	36,04 ^b ±0,41
PSLPT 7,5%	5,43 ^b ±0,05	4,23 ^a ±0,28	4,20 ^b ±0,07	34,95 ^{a,c} ±0,93
PSLPT 10%	5,47 ^c ±0,05	4,63 ^b ±0,46	4,19 ^{a,b} ±0,16	34,09 ^{a,d} ±0,93

Letras diferentes, na mesma coluna, diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney, a 5% de significância.

PC= pão de forma convencional (sem soro de leite em pó); PSLP 5%, PSLP 7,5% e PSLP 10% = pães de forma contendo 5%, 7,5% e 10% de soro de leite em pó tratado termicamente; respectivamente.

O volume específico das formulações PC, PSLP e PSLPT, nas diferentes concentrações (5%, 7,5% e 10%), ficaram acima de 4,0cm³/g⁻¹, destacando as amostras PSLP 5% e PSLPT 7,5% que apresentaram aumento no volume específico quando comparado à formulação PC. Esses valores foram considerados satisfatórios, tendo em vista que Granito e Guerra²² encontraram valores de 3,70 cm³/g⁻¹ para o volume específico do pão de forma convencional adicionado de ácido ascórbico (100 mg/Kg de farinha). Esse aditivo é adicionado para melhorar a capacidade de retenção de gás pela massa, consequentemente aumentando sua habilidade para produzir pão com maior volume. Kulp et al.⁸, afirmaram que a adição de proteínas do soro de leite ao pão de forma contribui para aumento no volume específico. Contrariamente, Renner e Abdel-Salam¹¹ relataram que

alguns peptídios presentes no soro de leite têm efeito supressor no volume específico de pães.

Em relação à umidade, os pães de forma com e sem adição de soro de leite em pó apresentaram teores variando de 32,85% a 36,04%. A legislação não estabelece limite para umidade em pães²³. Tebaldi et al.²¹ encontraram em pães de forma, valores para essa variável entre 34,20% e 37,76%. Esses resultados demonstraram grande variação, sendo necessário o estabelecimento de padrões que assegurem qualidade aos produtos finais, assim como estudos que associem a umidade com a aceitação sensorial de pães.

O teor de umidade dos pães com soro de leite em pó tratado termicamente foi superior ou igual ao do produto convencional, sendo superiores aos dos pães contendo esse ingrediente, na forma não tratada. O

tratamento térmico aplicado ao soro de leite em pó parece ter contribuído para o incremento observado no teor dessa variável, considerando que as proteínas do soro de leite são, em geral, muito solúveis, não se ligando, portanto, a grandes quantidades de água em sua conformação nativa, e o tratamento térmico das proteínas leva as suas moléculas a se desenovelarem e a aumentarem sua capacidade de retenção de água²⁴.

Avaliação sensorial

Teste de comparação pareada-preferência

A primeira etapa do teste de comparação pareada-preferência realizada com os pares de amostras de pães contendo soro de leite em pó sem tratamento térmico (PSLP 5% e PSLP 7,5%; PSLP 5% e PSLP 10%) revelaram preferência (p-valor<0,05) pela formulação PSLP 5%, quando comparada à formulação PSLP10%. Não foi verificada preferência (p-valor>0,05) entre o par PSLP 5% e PSLP 7,5%. Neste caso, a amostra com maior concentração de soro de leite em pó foi selecionada para a terceira etapa da avaliação. Na segunda etapa, quando os pares de amostras de pães contendo soro de leite em pó tratado termicamente (PSLPT 5% e PSLPT 7,5%; PSLPT 5% e PSLPT 10%) foram comparados, os resultados indicaram que não houve preferência (p-valor>0,05) por nenhuma formulação, portanto optou-se pela amostra PSLPT 10%. Na terceira etapa, foram comparadas as formulações selecionadas na primeira e segunda etapas (PSLP 7,5% e PSLPT 10%), não tendo sido verificada preferência entre as amostras (p-valor>0,05). Logo, essas formulações tiveram sua composição química determinada.

Teste de aceitação

Os resultados do teste de aceitação realizados nos pães de forma contendo soro de leite em pó com e sem

tratamento térmico, nas diferentes concentrações, estão apresentados na Tabela 3.

Quanto à aceitação, foi verificado que todas as amostras de pães testadas foram consideradas aceitas pelos provadores, pois obtiveram escores médios acima de 5,0 (“não gostei e nem desgostei”)¹⁶. As médias dos escores atribuídos pelos consumidores variaram de 5,8 a 7,8 situados entre a faixa da escala hedônica “não gostei, nem desgostei” a “gostei moderadamente”. Battochio et al.²⁵ encontraram médias variando de 5,96 a 6,81 para pão de forma integral, utilizando escala hedônica de 9 pontos.

Quando o soro de leite em pó foi adicionado, na forma não tratada, a formulação PSLP 7,5% apresentou a melhor aceitação e apesar da formulação PSLP 5% ter sido preferida quando comparada com PSLP 10%, no teste de aceitação não foi verificada diferença significativa (p-valor>0,05) entre essas amostras (Tabela 3).

Todas as formulações que receberam adição de soro de leite em pó tratado termicamente apresentaram escores médios acima de 7,0 (“gostei regularmente”), indicando boa aceitação. A formulação PSLPT 10% apresentou melhor aceitação que a PSLPT 5% e não diferiu (p-valor>0,05) da PSLPT 7,5% (Tabela 3).

Quando a aceitação da formulação PC foi comparada com as duas formulações contendo soro de leite em pó, selecionadas no teste de comparação pareada-preferência (PSLP 7,5% e PSLPT 10%), não foi verificada diferença significativa (p-valor>0,05) entre elas (Tabela 3).

Composição química dos pães selecionados

Na Tabela 4 estão apresentadas as médias e os desvios padrão da composição química do pão de forma convencional (PC) e dos pães de forma contendo soro de leite em pó, nas duas formas de adição (não tratado e

Tabela 3. Resultados do teste de aceitação sensorial dos pães de forma convencional e adicionado de soro de leite em pó, com e sem aplicação de tratamento térmico

Formulações	Escores médios	Formulações	Escores médios	Formulações	Escores médios
PSLP 5%	6,1 ^a ±0,68	PSLPT 5%	7,1 ^a ±1,60	PC	7,7 ^a ±0,76
PSLP 7,5%	7,8 ^b ±0,89	PSLPT 7,5%	7,6 ^{ab} ±1,07	PSLP 7,5%	7,8 ^a ±0,89
PSLP 10%	5,8 ^a ±0,63	PSLPT 10%	7,8 ^b ±1,26	PSLPT 10%	7,8 ^a ±1,26

Médias seguidas de letras iguais, na coluna, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a p-valor > 0,05.

PSLP = pães de forma contendo soro de leite em pó; PSLPT= pães de forma contendo soro de leite em pó, na forma tratada termicamente; PC= pão de forma convencional.

Tabela 4. Resultados da composição química dos pães de forma convencional e com soro de leite em pó, nas duas formas de adição, selecionados nos testes sensoriais

Variável	Formulações		
	PC	PSLP 7,5%	PSLPT 10%
Umidade (g/100g)	34,85 ^a ± 0,21	32,43 ^b ± 0,38	34,64 ^a ± 0,78
Proteínas (g/100g)	6,97 ^a ± 0,30	7,91 ^b ± 0,20	9,11 ^c ± 0,36
Lipídios (g/100g)	3,00 ^a ± 0,27	2,17 ^a ± 0,52	3,91 ^b ± 0,67
Carboidratos*	53,87 ^a	55,88 ^b	50,51 ^c
Cinzas (g/100g)	1,30 ^a ± 0,07	1,61 ^b ± 0,03	1,82 ^c ± 0,05
Cloretos** (mg/100g)	242,81 ^a ± 6,18	231,59 ^a ± 12,34	226,18 ^a ± 6,12
Cálcio (mg/100g)	31,83 ^a ± 0,11	74,67 ^b ± 4,00	90,60 ^c ± 6,88
Fósforo (mg/100g)	87,90 ^a ± 13,67	115,30 ^b ± 11,07	121,71 ^b ± 1,93

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

Médias seguidas de letras iguais na mesma linha, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney (teste U), com nível de 5% de significância.

tratado termicamente) e nas concentrações selecionadas (7,5% e 10%).

A adição de soro de leite em pó promoveu elevação no teor de proteínas dos pães, com incrementos de até 30,7% quando comparado ao produto convencional, contribuindo também com o acréscimo de aminoácidos essenciais à proteína do trigo, indicando melhoria no perfil desses aminoácidos, e conseqüentemente na digestibilidade.

De acordo com a Portaria nº 27 de 13 de Janeiro de 1998²⁶ um alimento sólido é considerado fonte de proteínas quando contém, no mínimo, 10% da Ingestão Diária Recomendada (IDR), para diferentes estágios de vida e grupos de indivíduos. Com base nesta recomendação, o pão contendo 10% de soro de leite em pó pode ser considerado alimento fonte de proteínas para todos os grupos de indivíduos, incluindo gestantes e lactantes, grupo com maior necessidade de ingestão desse nutriente.

O teor de cinzas foi maior nos pães com soro de leite em pó, podendo essa elevação ser devido ao aumento na concentração de minerais como cálcio e fósforo. Com relação ao teor de cloretos, não foi verificada elevação de concentração com a adição de soro de leite em pó, o que é satisfatório, tendo em vista que o aumento na ingestão

de sódio pode contribuir para o aparecimento de doenças cardiovasculares.

As concentrações de cálcio e fósforo nos pães de forma com soro de leite em pó foram maiores que as verificadas no pão de forma convencional, com incrementos de até 185% e 38,5%, respectivamente. O pão contendo 10% de soro de leite em pó disponibilizou concentração de cálcio (90 mg/100 g) equivalente a 15% da Ingestão Diária Recomendada (IDR)²⁶ recomendada para crianças de até seis anos, entretanto, para o fósforo o incremento não foi suficiente para classificar o pão como alimento fonte desse mineral²⁷. O fósforo e o cálcio são considerados minerais fundamentais para o organismo, sendo responsáveis pelo metabolismo dos ossos e dentes, ajudando na prevenção e combate a osteoporose²⁸.

A concentração de lipídios nos pães variou de 2,17 a 3,91%. Na literatura, foram verificados valores acima de 3% para pão de forma adicionado de leite, enquanto que em pães tradicionais foi citado o valor de 2,6%²⁹.

CONCLUSÃO

A adição de soro de leite em pó à formulação de pão de forma resultou em produto final com boa aceitação sensorial, contribuindo para a melhoria do

valor nutricional, especialmente em termos de proteínas de alto valor biológico e cálcio. A aplicação de tratamento térmico ao soro de leite em pó permitiu adicionar maior concentração desse ingrediente (10%) ao pão de forma, elevando a umidade e tornando-o tão bem aceito quanto o pão de forma convencional.

REFERÊNCIAS

1. Valduga E, Paviani LC, Mazur SP, Finzer JRD. Aplicação do soro de leite em pó na panificação. *Alim Nutr*, Araraquara. 2006; 17 (4):393-400.
2. Dallas P. O uso de derivados de soro em aplicações de produtos de consumo. *Leite e Derivados*. 1999; 8 (46): 48-50.
3. Rosaneli CF. Atividade antiulcerogênica de um concentrado de soro de leite bovino em modelos experimentais com ratos [Dissertação de Mestrado]. Campinas, São Paulo: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2002. 81p.
4. Moreno YMF. Influência das proteínas de soro de leite bovino no estado nutricional, composição corporal e sistema imune em coorte de crianças com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) [Dissertação de Mestrado]. Campinas, São Paulo: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2002. 105p.
5. Sgarbieri VC. Revisão: Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. *Rev Nutr*, Campinas. 2004; 17 (4): 397-409.
6. Oliveira JED, Marcini JS. Ciências nutricionais. São Paulo: Sarvier; 1998.
7. Caldas MCS. Aproveitamento de soro de leite na elaboração de pão de forma [Dissertação de Mestrado]. João Pessoa, Paraíba: Universidade Federal da Paraíba, 2007. 66p.
8. Kulp K, Chung H, Doerry W, Baker A, Olewnik M. Utilization of whey as a white pan bread ingredient. *Cereal Foods World*. 1988; 33 (5): 441-7.
9. Erdogdu-Arnoczky N, Czuchajowska Z, Pomeranz Y. Functionality of whey and casein in fermentation and in breadbaking by fixed and optimized procedures. *Cer Chem*. 1996; 73 (3): 309-16.
10. Kadharmestan C, Baik B, Czuchajowska Z. Whey Protein Concentrate Treated with Heat or High Hydrostatic Pressure in Wheat-Based Products. *Cer Chem*. 1998; 75 (5): 762-6.
11. Renner E, Abdel-Salam MH. Application of ultrafiltração in the dairy industry. London: Elsevier Appl Sci; 1991.
12. Hervé R, Gabriel V, Lefebvre D, Rabier P, Vayssier Y, Fontagné-Faucher C. Study of the behaviour of *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc* starters during a complete wheat sourdough breadmaking process. *LWT*. 2006; 39 (3): 256-65.
13. Gutkoski LC, Klein B, Pagnussatt FA, Pedó I. Características tecnológicas de genótipos de trigo (*triticum aestivum* l.) cultivados no cerrado. *Ciênc e Agro*, Lavras. 2007; 31(3): 786-92.
14. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo - Brasil). Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 4ª ed. Brasília (DF): ANVISA; 2005.1018pp.
15. Ranganna S. Analysis and quality control for fruit and vegetable products. New Delhi: Tata Mcgraw Hill; 2 ed. 1979.
16. Bárcenas ME, Rosell CM. Different approaches for improving the quality and extending the shelf life of the partially baked bread: low temperature and HPMC addition. *J Food Eng*. 2006; 72 (1):92-99.
17. R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2006.
18. Faria EV, Yotsuyanagi K. Técnicas de Análise Sensorial. Campinas (SP): ITAL/LAFISE; 2002.
19. Martínez-Anaya MA, Pitarch B, Bayarri P, Barber CB. Microflora of the sourdoughs of wheat flour bread: interactions between yeasts and lactic acid bacteria in wheat doughs and their effects on bread quality. *Cer Chem*. 1990; 67 (1): 85-91.
20. Quílez J, Ruiz JA, Romero MP. Relationships between sensory flavor evaluation and volatile and nonvolatile compounds in commercial wheat bread type baguette. *J Food Sci*. 2006; 71(6):423-427
21. Tebaldi LS, Massapust FC, Araújo LFL, Silva MVA, Trindade MB, Kronenberger G et al. Umidade e pH como parâmetros de qualidade em pães de forma. *Rev Hig Aliment*. 2006; 20 (143): 69-71.
22. Granito M, Guerra M. Efecto del uso de diferentes aditivos de panificación en la calidad de panes elaborados con harinas compuestas a base de harina de trigo y germen desgrasado de maíz. *Ciênc Tecnol Aliment*. 1997; 17 (2): 181-187.
23. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) Resolução RDC nº 263 DE 22 de setembro de 2005. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, p. 10, 19 mai 2005, Seção 1.
24. Antunes AJ. Funcionalidade de proteínas do soro de leite bovino. Barueri (SP): Manole; 2003. 135p.
25. Battochio JR, Cardoso JMP, Kikuchi M, Macchione M, Modolo JS. Perfil sensorial de pão de forma integral. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2006; 26 (2): 428-33.
26. Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 27 de 13 de janeiro de 1998. Dispõe sobre Regulamento Técnico referente à Informação Nutricional Complementar (conteúdo de nutrientes). Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, . p.1789, 16 de jan. 1998. Seção 1
27. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) Resolução RDC nº 269 de 22 de setembro de 2005. Regulamento Técnico sobre a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, p.1, 23 de set. de 2005. Seção 1.
28. Lerner BR, Lei DLM, Chaves SP, Freire RD. O cálcio consumido por adolescentes de escolas públicas de Osasco, São Paulo. *Rev. Nutr*. 2000; 13(1): 57-63.
29. TACO – Tabela Brasileira de Composição de Alimento. Campinas (SP): NEPA – UNICAMP. 2ª ed.; 2006.

Estudo da composição físico-química e aceitação de bananadas comerciais por meio de análise multivariada

Study on physical-chemical composition and acceptance of marketed banana jams by means of multivariate analysis

RIALA6/1233

Rossana Catie Bueno de GODOY^{1*}, Edneide Luciana Santiago MATOS², Daniele de Vasconcellos SANTOS², Tatiane da Silva AMORIM³, Nina WASZCZYNSKYJ⁴, Manoel Alves de SOUSA NETO⁵

*Endereço para correspondência: Embrapa Florestas, Estrada da Ribeira km 111, Colombo-PR, Brasil. CEP: 83411-000, e-mail: catie.godoy@gmail.com

²Universidade Federal do Recôncavo Baiano, Campus da UFRB, Cruz das Almas-BA, Brasil,

³Laboratório de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas-BA, Brasil.

⁴Centro Politécnico, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, Brasil

⁵Laboratório de Análise Sensorial, Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza-CE, Brasil

⁵Laboratório de Análise Sensorial-Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza-CE, Brasil

Recebido: 18.08.2009 – Aceito para publicação:30.09.2009

RESUMO

Dentre os vários produtos originários da banana, a produção de doces é um dos segmentos mais importantes com abrangência de pequenas e grandes agroindústrias, o que resulta em produtos com grande variabilidade. Com o objetivo de conhecer as principais características de doze marcas de bananadas foi feito levantamento dos principais componentes informados nos rótulos, sua composição físico-química e aceitação. Os dados foram avaliados por análises uni e multivariadas. Algumas marcas de bananadas vendidas no mercado brasileiro não estão em conformidade com a legislação que regulamenta a rotulagem de alimentos. Os produtos apresentaram diferenças significativas em todos os componentes avaliados, pH, sólidos solúveis totais, acidez total titulável, vitamina C, açúcares redutores, açúcares totais, textura e cor. A acidez total titulável e os sólidos solúveis totais foram os principais responsáveis pela divergência dos doces analisados. Com relação à aceitação foi constatada diferença significativa quanto às características de textura e de sabor entre as amostras comerciais analisadas. Na análise de *cluster* houve a formação de dois grupos, com tendência de agrupamentos entre os doces produzidos nas mesmas regiões. O estudo mostrou a necessidade de estabelecer a regularização e padronização desses produtos.

Palavras-chave. Doce de banana, agroindústria, caracterização físico-química, análise de *cluster*.

ABSTRACT

Among the several banana products, the remarkable one is the marmalade production, including the small and large agro-industries which result in a high variety of products. With the objective of evaluating the main features of these products, the present study investigated the physical-chemical and sensory characteristics of twelve marketed marmelades collected from different regions of the country. The data were analyzed by univariate and multivariate analysis. The products presented significant differences in all of the evaluated characteristics and components (pH, total soluble solids, total tritabile acidity, vitamin C, reducing sugars and total sugars, color and texture). The total tritabile acidity and soluble solids were the variables responsible for the divergence among products. Differences on texture and flavor aspects were found among samples. On the *cluster* analysis, two groups were delineated, with a trend in gathering the marmelades produced at the same regions. A lack of regulation and standardization for manufacturing these products was evidenced.

Key words. banana preserves, acceptance, agro-industry, physical chemical characterization, *cluster* analysis.

INTRODUÇÃO

A industrialização é fundamental à manutenção da bananicultura. Sendo a banana um fruto que amadurece rapidamente, é responsável por perdas pós-colheita que variam desde 22% a 40%^{1,2}.

Muitos produtos podem ser obtidos com bananas como purê, néctares, sucos, farinhas, flocos, banana passa e doces em massa³. Entretanto, a produção de doces é um dos segmentos mais importantes, abrangendo produtos como balas, doces de corte, doces cremosos e mariolas⁴.

O processo de obtenção de doces de banana de corte consiste na concentração da polpa de banana, previamente acidificada, com açúcar e pectina até atingir 73°Brix de concentração, de forma que possibilite o corte de mariolas, balas e bananadas⁵.

A legislação contempla bananadas no contexto geral de produtos de frutas, ou seja, produtos elaborados com frutas inteiras ou em partes, obtidos por secagem e ou desidratação e ou laminação e ou cocção e ou fermentação e ou concentração e ou congelamento e ou outros processos tecnológicos considerados seguros para a produção de alimentos. Estes produtos devem ser designados por denominações consagradas pelo uso⁶.

Há grande variedade de bananadas no mercado brasileiro, comercializadas em embalagens de celofane e madeira, em geral oriundas de produção artesanal e em latas, quando produzidas por indústrias maiores. Suas vendas assim como sua produção ocorrem em todo o território nacional⁷.

Na prática observa-se a falta de homogeneidade destes produtos sendo necessário primeiramente conhecer composição dos doces de banana disponíveis no mercado, de forma a subsidiar informações que contribuam para o estabelecimento de um padrão.

Alguns trabalhos foram realizados nesta linha, com doces de goiaba⁸. No entanto, para doces de banana as informações são escassas. Assim, o objetivo desse estudo foi caracterizar a composição físico-química e a aceitabilidade de doces de banana comerciais.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 12 amostras de bananadas (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L) em latas de 700 g, produzidas no Estado de São Paulo, Ceará, Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte. Foi feito o levantamento dos

ingredientes declarados nos rótulos e verificados se os mesmos estavam em conformidade com a legislação.

As análises físico-químicas realizadas foram: pH método nº 017/IV⁹. Teor de sólidos solúveis totais (SST), método 932.12¹⁰; Acidez total titulável (ATT), método nº 942.15¹⁰. Vitamina C (ácido ascórbico), método de Tillmans¹¹; açúcares redutores e totais, por titulometria¹², resultados em % de glicose.

A cor foi avaliada em colorímetro MINOLTA CR300, sistema CIE L*a*b* (L*=luminosidade; a* (+) = intensidade de vermelho; b*(+) = intensidade de amarelo). A textura foi medida em texturômetro TAXT2i¹³ com sonda cilíndrica de aço inoxidável (Ø 6mm). A compressão foi realizada a uma velocidade de 1mm/s, com distância de penetração de 20mm. Em cada amostra, foi avaliada a dureza (DUR), força de resistência máxima oferecida pela amostra antes da ruptura da superfície do gel, em gramas e adesividade (ADES), energia para remoção da sonda, correspondente à área negativa sob o gráfico da textura, em g.mm.

Para a avaliação sensorial utilizou-se o teste afetivo de aceitação, escala verbal e numérica de sete pontos, NBR 14141¹⁴ na qual: 1 = desgostei muito, 2 = desgostei regularmente, 3 = desgostei ligeiramente, 4 = não gostei nem desgostei, 5 = gostei ligeiramente, 6 = gostei regularmente, 7 = gostei muito. I. Os atributos avaliados foram aparência geral, cor, aroma, textura e sabor utilizando a escala de quanto gostou ou desgostou de sete pontos. Participaram dos testes 30 pessoas do Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura Tropical.

O estudo foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado com 12 tratamentos e 4 repetições. Para os dados obtidos foram realizadas análises de variância e as médias dos tratamentos foram agrupadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Foram utilizadas técnicas multivariadas de análise de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average) com base na distância de Mahalanobis e análise de componentes principais. Utilizou-se o programa STATISTICA¹⁵ e GENES – Aplicativo Computacional em Genética e Estatística¹⁶.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a Resolução RDC nº 259¹⁷ os ingredientes devem estar presentes nos rótulos em ordem decrescente de proporção. Além disso, a informação dos

aditivos alimentares deve constar sua função principal, seu nome completo ou seu número INS (Sistema Internacional de Numeração) ou ainda ambos.

Verifica-se na Tabela 1 que todos os produtos avaliados estão em conformidade com a legislação, ou seja, a ordem de declaração dos ingredientes foi decrescente, indo do ingrediente utilizado em maior quantidade até aquele de menor quantidade. Com relação à informação sobre os aditivos alimentares observou-se que a maioria dos produtos não estão em conformidade com a resolução uma vez que não informaram a finalidade do uso do aditivo ou o seu número no sistema INS¹⁸.

Caracterização físico-química

O valor médio de pH foi 4,25 sendo que a maioria dos produtos situou-se entre 4,26 a 4,39 com exceção das amostras A,C e I, as quais apresentaram pH inferiores às médias obtidas (Tabela 2). O teor de sólidos solúveis totais dos produtos comerciais variou de 71,0 a 82,66 °Brix, sendo que a faixa de SST dos produtos situou-se entre 74,0 e 75,3 °Brix.

A acidez total titulável variou de 0,40 a 1,20 % de ácido cítrico, com média de 0,733% (Tabela 2). Os produtos menos ácidos foram os da marca J, L e H. Importante ressaltar que sete dos produtos analisados continham acidulantes nos rótulos, sendo que seis destes usam o ácido cítrico (Tabela 1).

A vitamina C variou entre 0,84 até 7,92 mg/100g. Para os açúcares a variação foi significativa tanto para os redutores quanto para os açúcares totais. As amostras apresentaram teores de açúcares redutores variando de 26,55 % (J) a 52,82% (H). A média de açúcares totais das bananadas, avaliadas neste estudo, foi de 50,48% de glicose (Tabela 2), com variações de 41,01% (L) a 59,11% (G). Em estudo das propriedades reológicas de 5 formulações de doce de banana realizadas por Toledo¹⁹ obteve a média de 44,96% de açúcares redutores nas amostras cujos teores variaram de 24,75% a 63,10%.

A análise de cor neste estudo mostrou grande variabilidade entre as amostras (Tabela3). Os valores de L* indicaram a predominância de cores escuras, com valores entre 25,93 e 37,58; sendo as amostras A, B,C e D as que se

Tabela 1. Ingredientes declarados nos rótulos das bananadas comerciais

Marcas	Ingredientes	Origem
A	Banana e açúcar. Contém acidulante (ácido cítrico)	Paraíba
B	Banana, açúcar e pectina. Contém ácido cítrico	Pernambuco
C	Polpa de banana, açúcar, pectina cítrica, ácido cítrico e benzoato de sódio	Pernambuco
D	Polpa e banana, açúcar cristal e acidulante ácido cítrico	Pernambuco
E	Banana, açúcar, pectina e ácido cítrico	Ceará
F	Polpa de banana e açúcar. Contém acidulante HIII ácido cítrico	Ceará
G	Polpa de banana e açúcar. Contém acidulante ácido cítrico	Ceará
H	Polpa de banana, açúcar e conservador sorbato de potássio	São Paulo
I	Banana, açúcar, acidulante HIII ácido fosfórico	Rio Grande do Norte
J	Banana, açúcar, glucose e espessantes agar e goma jataí	São Paulo
K	Banana, açúcar e canela	São Paulo
L	Polpa de banana e açúcar	São Paulo

Tabela 2. Características físico-químicas de bananadas comerciais

Marcas	pH	Sólidos	Acidez	Vitamina C	Açúcares	Açúcares
		Solúveis	Total titulável	%	redutores	totais
		Totais (°Brix)	% ac. cítrico	ác. ascórbico	% glicose	% glicose
A	3,863 d	73,400 e	0,713 f	4,200 bc	44,510 bc	52,760 a
B	4,306 b	76,400 bc	0,840 d	4,900 b	35,266 de	55,996 a
C	4,023 c	71,000 fg	1,200 a	2,700 d	39,043 cd	54,276 a
D	4,263 b	74,600 d	0,923 c	3,590 bcd	35,916 de	43,116 c
E	3,916 d	82,666 a	0,993 b	1,090 ef	36,126 de	57,033 a
F	4,300 b	75,200 d	0,770 e	2,493 d	40,150 cd	46,250 bc
G	4,266 b	75,266 cd	0,790 de	2,246 de	48,893 ab	52,523 ab
H	5,026 a	70,2500 g	0,440 h	7,926 a	52,826 a	59,113 a
I	4,026 c	76,733 b	0,803 de	0,846 f	46,300 abc	54,550 a
J	4,323 b	75,333 cd	0,406 h	2,386 de	26,553 f	43,850 c
K	4,306 b	71,733 f	0,503 g	3,426 cd	35,016 de	45,323 c
L	4,390 b	75,200 d	0,416 h	2,310 de	31,436 ef	41,016 c
Média	4,251**	74,815**	0,733**	3,176**	39,336**	50,484**
CV (%)	1,61	0,53	2,34	14,82	6,36	4,67

Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Tabela 3. Valores médios dos parâmetros de cor e textura de bananadas comerciais

Marcas	Força (g)	Adesividade (g.mm)	L* Luminosidade	a*	b*
				Intensidade de vermelho	Intensidade de amarelo
A	117,79 bcde	-354,27 ab	36,08 a	0,33 d	8,26 bc
B	258,00 a	-322,96 ab	37,58 a	0,17 d	11,67 a
C	172,69 b	-479,42 ab	37,61 a	0,82 d	12,68 a
D	88,01 de	-147,72 a	35,61 ab	3,97 c	11,84 a
E	75,11 e	-571,42 b	30,99 cd	4,80 bc	7,88 bcd
F	155,94 bc	-672,95 b	31,49 cd	1,53 d	7,77 bcd
G	149,69 bcd	-597,62 b	32,69 bc	0,67 d	8,01 bcd
H	306,08 a	-298,32 ab	26,43 e	6,60 ab	6,91 bcd
I	104,59 cde	-533,14 ab	29,12 de	3,98 c	6,28 cde
J	178,56 b	-314,65 ab	27,52 e	7,45 a	6,09 de
K	286,82 a	-434,86 ab	25,93 e	5,73 abc	4,73 e
L	261,60 a	-592,28 b	28,31 de	6,07 ab	8,81 b
Média	179,574**	-443,298*	31,612**	3,480**	8,410**
CV(%)	15,76	31,29	3,62	19,05	8,22

Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

apresentaram mais claras, com valores de L* mais altos, e as amostras H, J e K, as mais escuras, provavelmente devido ao escurecimento não-enzimático mais pronunciado durante o processamento.

Com relação aos parâmetros a* e b*, os valores baixos nas amostras evidenciam pouca coloração (cromaticidade), com a predominância do amarelo (componente b*) em praticamente todas as amostras (Tabela 3). Por outro lado, as amostras com maiores valores do componente a*, correspondente à cor vermelha, foram as amostras H, J, K e L, que apresentaram uma cor marrom mais escura, provavelmente pela formação dos pigmentos em maior intensidade resultantes do processamento, como ocorreu com o parâmetro L*.

A força máxima de resistência à penetração variou de 75,11g a 306,08 g, sendo as amostras B, H, K e L as que mostraram maior firmeza (Tabela 3). A grande variação nos valores de força máxima observada entre as amostras indica diferenças na estrutura do gel dos produtos, em decorrência da variabilidade nas formulações e métodos de processamento de cada produto. A formação do gel e suas características finais estão diretamente relacionadas ao teor de sólidos solúveis, pectina, ácido e teor de polpa²⁰. A média obtida para a firmeza das bananadas comerciais foi de 179,57 g, sendo inferior a outros produtos similares, como doces de goiabas que apresentam firmeza média de 453,7 g²¹.

Com relação à adesividade, os doces apresentaram valores variando de -147,72 g.mm a -597,62 g.mm (Tabela 3). O aumento da energia de remoção da sonda durante o teste de textura, evidenciado pelo aumento da adesividade que em geral é devido ao elevado teor de sólidos solúveis, como no caso das amostras E, F, G, I e L.

Análise sensorial

Todos os atributos foram avaliados entre 5 e 6 (gostei ligeiramente e gostei regularmente) sendo que os mais apreciados foram a cor e o sabor (Tabela 4). Com relação à aparência não houve diferenças significativas entre as amostras, assim como não houve para a cor e o aroma. No caso do aroma, este pode ser devido à rápida adaptação dos receptores do olfato quando submetido a um estímulo constante²². Outros trabalhos realizados para avaliar o aroma de doces também mostraram não haver diferenças neste atributo²³. Quanto à textura das bananadas, as diferenças foram significativas, os doces G e L apresentaram maiores valores, no entanto não diferiram significativamente das bananadas A, B, C, F, H, J e K (Tabela 4). As bananadas E e I obtiveram o menor valor para textura, diferindo estatisticamente das demais amostras.

Para o sabor houve diferenças significativas entre as amostras A, F, G e L diferindo das amostras D e H. O maior valor recebido, neste atributo, foi atribuído à amostra G. Em avaliação de formulações de doces de

Tabela 4. Teste de aceitação em relação à aparência, cor, aroma, textura e sabor de bananadas comerciais

Marcas	Aparência	Cor	Aroma	Textura	Sabor
A	5,40 a	5,59 a	5,22 a	5,11 abc	5,66 a
B	4,51 a	4,66 a	5,07 a	5,11 abc	5,33 ab
C	5,14 a	5,51 a	4,70 a	5,48 abc	4,96 ab
D	4,29 a	5,25 a	4,81 a	4,48 bc	4,70 b
E	4,66 a	5,44 a	4,62 a	4,25 c	5,11 ab
F	5,40 a	5,33 a	5,14 a	5,77 ab	5,62 a
G	5,40 a	5,11 a	5,59 a	5,85 a	6,07 a
H	5,11 a	4,85 a	5,18 a	4,59 abc	4,07 b
I	4,11 a	4,81 a	5,22 a	4,40 c	4,88 ab
J	5,40 a	5,51 a	5,48 a	5,29 abc	5,18 ab
K	5,03 a	5,22 a	5,70 a	5,40 abc	5,22 ab
L	5,48 a	5,48 a	5,14 a	5,85 a	5,88 a
Média	5,00 ^{ns}	5,23 ^{ns}	5,16 ^{ns}	5,13 ^{**}	5,22 ^{**}
C.V(%)	32,04	29,45	29,50	29,63	31,26

Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey (p<0,05)

banana, houve diferenças significativas na textura (oral, táctil e visual), na cor e no sabor. No atributo aroma as amostras comerciais avaliadas, não diferiram entre si¹⁹.

Somando-se todos os atributos verifica-se que as bananas L, G e F tiveram melhor aceitação.

Análise de agrupamentos

No estudo físico-químico a acidez total titulável e os sólidos solúveis totais foram as variáveis que mais contribuíram para a diversidade das bananas comerciais respondendo por 72,13% da divergência apresentada nas amostras (Tabela 5). O pH, a força e a cor (intensidade de amarelo e intensidade de vermelho) por 17,93%. As demais variáveis responderam pelo restante do grau de divergência.

Na análise de agrupamentos observa-se a formação de dois grandes grupos de doces que apresentaram algum grau de similaridade (Figura 1). O grupo 1 inclui apenas a amostra C (Ceará) e o grupo 2 é formado pelo restante dos produtos. No grupo 2 verifica-se a formação de 2 subgrupos, o subgrupo 1 que abrange as amostras K, L, J e H (São Paulo) e o subgrupo 2 com as bananas E, D, I, B, G, F, A (Ceará, Pernambuco, Rio Grande do Norte

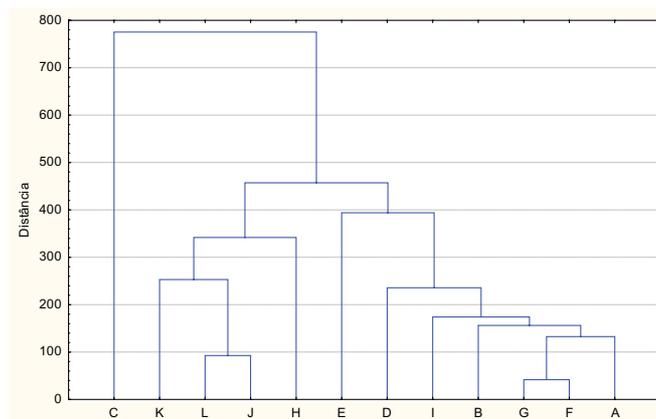


Figura 1. Dendrograma de dissimilaridade entre bananas comerciais.

e Paraíba). Os produtos de maior similaridade foram os doces G e F (Ceará), em seguida J e L (São Paulo).

Associando-se os agrupamentos formados pela composição físico-química das bananas com a região de origem verifica-se que os produtos tendem a serem similares nos seus locais de fabricação. Este fato deve ocorrer em função da matéria-prima utilizada e do tipo de processo empregado.

Tabela 5. Contribuição relativa (Sj) de onze características para a diversidade de bananas comerciais

Características	Sj	(%)
Acidez total titulável	39.861,57313	55,55
Sólidos solúveis totais	11.896,89738	16,58
pH	4.079,800159	5,69
Força	3.819,870934	5,32
b* (intensidade de amarelo)	2.696,193681	3,75
a* (intensidade de vermelho)	2.275,723617	3,17
Açúcares totais	2.093,488971	2,91
Açúcares redutores	1.982,066793	2,78
Vitamina C	1.616,926852	2,25
L (luminosidade)	.249,595529	1,74
Adesividade	192,895347	0,26

Análise de componentes principais

Os dados da análise sensorial mostram que os coeficientes de ponderação dos cinco primeiros componentes principais, relativos a cada característica avaliada, explicam 78,29% da variação total disponível (Tabela 6).

Na análise de componentes principais (Figura 2) verifica-se a formação do grupo 1 formado pelas amostras (1-A, 6-F, 10-J, 12-L, 3-C), do grupo 2 pelas amostras (2-B, 8-H, 9-I), do grupo 3 formado pelas bananas 7-G e 11-M e do grupo 4 pelos doces 4-D, 5-E.

As variáveis de maior peso no componente 1 foram a textura e a aparência, no componente 2, o aroma e a cor (Figura 3), portanto, todas estas variáveis citadas foram as mais importantes na diferenciação dos doces de banana comerciais.

CONCLUSÃO

- Há grande variação na composição físico-química destes doces bem como nas características de cor e textura;
- Na análise sensorial as diferenças foram significativas somente para textura e sabor;
- A acidez total titulável e os sólidos solúveis totais foram os principais responsáveis pela divergência dos doces;
- Na análise de *cluster* houve a formação de 2 grupos, um com a amostra C e outro com o restante dos produtos. Há uma tendência dos doces produzidos nas mesmas regiões terem composições físico-químicas similares.
- Na análise de componentes principais os provadores foram divididos em 4 grupos; a textura e a aparência foram os atributos mais importantes na diferenciação entre as marcas.

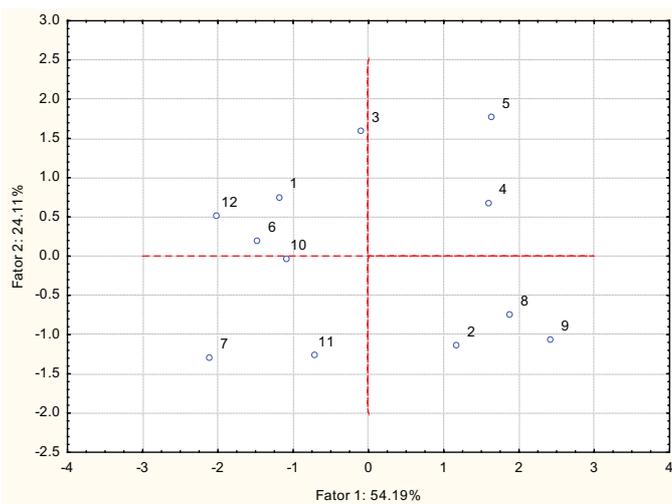


Figura 2. Dispersão gráfica dos escores de 12 bananas comerciais em relação a aceitação dos consumidores.

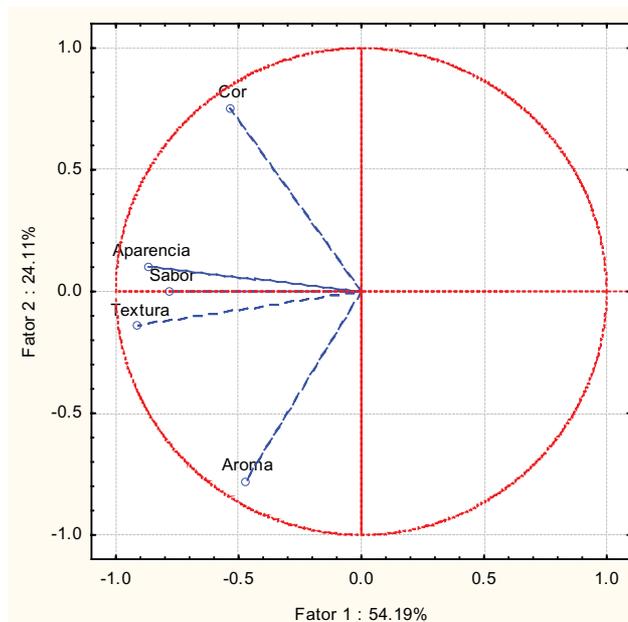


Figura 3. Atributos sensoriais das bananas comerciais em relação à aceitação dos consumidores.

Tabela 6. Os componentes principais e os coeficientes de ponderação da aceitação de bananas elaboradas com variedades resistentes à Sigatoka-negra.

Componente	Autovalores	Variância explicada	Autovalores acumulados	Variância Acumulada (%)
1	2,709360	54,18720	2,709360	54,1872
2	1,205604	24,11207	3,914964	78,2993
3	0,598168	11,96335	4,513131	90,2626
4	0,370744	7,41487	4,883875	97,6775
5	0,116125	2,32250	5,000000	100,0000

REFERÊNCIAS

1. Almeida GC, Silva T. Avaliação de perdas na cadeia comercial de banana nanica, banana prata e tomate longa vida. Belo Horizonte: Ceasa MG/FAEMG/ Sebrae MG; 2008. 50 p.
2. Campos RP, Valente JP, Pereira WE. Conservação pós-colheita de banana cv. nanicao climatizada e comercializada em Cuiabá – MT e região. *Rev Bras Frutic*. 2004; 25 (1): 172-4.
3. De Martin ZJ, Travaglini DA, Okada M, Quast DG, Hashizume T. Processamento: produtos, características e utilização. In: Medina JC, Bleinroth EW, De Martin ZJ, Travaglini DA, Okada M, Quast DG, Hashizume T, Moretti VA, Bicudo Neto LC, Almeida LASB, Renesto OV, editores. *Banana: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos*. 2nd ed. Campinas: ITAL; 1985. 302 p.
4. Almeida CO, Godoy RCB. Estado actual de la agroindustria de banano y plátano en Brasil. In: 5 Reunion Red de Investigación y Desarrollo de Plátano y banano para America Latina y El Caribe (MUSALAC). Heredia-Costa Rica, 2004. CD-ROM.
5. Almeida MEM. Processamento de Frutas. In: Almeida MEM, Schmidt FL, Gasparino Filho J, editores. *Processamento de compotas, doces em pasta e geleias: fundamentos básicos*. Campinas: ITAL,1999; p.13-36.
6. Brasil. Ministério da Saúde. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) Resolução RDC nº 272 de 22 de setembro de 2005. Trata do regulamento técnico para produtos de frutas. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, p.374, 23 de set. de 2005.Seção 1.
7. Torrezan R. Recomendações técnicas para a produção de doces em massa em escala industrial. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2002; 26p.
8. Mori EEM, Yotsuyanagi K, Ferreira VL. Análise sensorial de goiabadas de marcas comerciais. *Ciênc Tecnol Aliment*. 1998; 18 (1); 105-10.
9. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo - Brasil). *Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. 4ª ed. Brasília (DF): ANVISA; 2005.1018pp.
10. Association of Official Analytical Chemists. 17th ed. Washington: The Association; 2000 (1/2).
11. Lees R. *Food analysis and quality control methods for the food manufacturer and buyer*. London: Leonard Hil Books; 1975.
12. Laboratório Nacional de Referência Animal. *Métodos analíticos para controle de produtos de origem animal e ingredientes. Métodos Físicos e Químicos*, v.2. Brasília: SNDA; 1981.
13. Stable Micro Systems. *User Guide: Texture Expert for Windows*. Surrey: Stable Micro Systems, 1997; 155 p.
14. Associação Brasileira de Normas Técnicas [ABNT]. NBR 14141 de 1998: teste de aceitação. Rio de Janeiro; 3p.
15. *Statistica eletronic manual. Statistica Cage Linearity Technical Notes. Statistica 7.1 Stat Soft*. Tulsa, USA; 2005.
16. Cruz CD. Programa Genes: versão Windows; aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV; 2001. 648 p.
17. Brasil. Ministério da Saúde. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) Resolução RDC nº 259 de 20 de setembro de 2002. Aprova o regulamento técnico sobre rotulagem de alimentos embalados. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, p.33-4, 23 de set. de 2002. Seção 1.
18. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução CNS/MS n 4, de 24 de novembro de 1988. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, p.24.716-23, 19 de dez. de 1988. Seção 1.
19. Toledo PF. *Propriedades reológicas do doce de banana [Dissertação de Mestrado]*. Campinas, São Paulo. Universidade Estadual de Campinas, 2004. 76 pp.
20. Soares Jr AM, Maia ABRA, Nelson DL. Estudo do efeito de algumas variáveis de fabricação no perfil texturométrico do doce de manga. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2003; 23(1): 76-80.
21. Menezes CC. *Otimização e avaliação do sorbato de potássio e das embalagens sobre o doce de goiaba durante o armazenamento [Dissertação de Mestrado]*. Lavras, Minas Gerais. Universidade Federal de Lavras, 2008. 145 pp.
22. Queiroz MI, Treptow RO. *Análise sensorial para a avaliação da qualidade de alimentos*. Rio Grande: FURG; 2006. 268 p.
23. Wille GMF, Macedo REF, Masson ML, Stertz SC, Celuppi Neto R, Lima JM. Desenvolvimento de tecnologia para a fabricação de doce em massa com araçá-pêra (*Psidium acutangulum d. c.*) para o pequeno produtor. *Ciênc Agrotec*. 2004; 28 (6): 1360-6.

Influência do transporte a granel na qualidade do leite cru refrigerado

Influence of the bulk milk shipping on the quality of cooled raw milk

RIALA6/1234

Marco Antônio Pereira da SILVA^{1*}, Priscila Alonso dos SANTOS¹, Jacira dos Santos ISEPON², Cíntia Silva Minafra e REZENDE³, Moacir Evandro LAGE³, Edmar Soares NICOLAU³

*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

¹Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, Rio Verde – GO, Brasil

²Departamento de Fitotecnia Tecnologia de Alimentos e Sócio Economia: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Campus de Ilha Solteira Ilha Solteira – SP, Brasil.

³Centro de Pesquisa em Alimentos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, Goiânia – GO, Brasil.

Recebido: 07.09.2009 – Aceito para publicação: 30.10.2009

RESUMO

No presente estudo foi avaliada a influência do transporte a granel sobre a composição centesimal, CCS e CBT do leite cru refrigerado, em amostras coletadas no Sudoeste Goiano nos períodos chuvoso e seco de 2008. Foram coletadas amostras de leite armazenadas nos tanques de expansão das propriedades rurais e nos tanques isotérmicos após a chegada do leite na indústria. A comparação dos tipos de amostra com o período de coleta foi realizada por meio do teste F da análise de variância. As análises estatísticas foram realizadas por meio do *software* Sisvar. Os valores da composição centesimal e da CCS não sofreram alterações durante o transporte do leite da propriedade rural até o laticínio. Os valores de CBT do leite obtido na propriedade rural e do transportado a granel até o laticínio não estavam em conformidade com as especificações estabelecidas pela legislação brasileira. Foi verificado aumento na CBT durante o transporte a granel do leite cru refrigerado independentemente do período do ano.

Palavras-chave. estação do ano; higiene; leite resfriado; transporte a granel.

ABSTRACT

This study evaluated the influence of the bulk milk transportation on the centesimal composition, SCC and TBC of cooled raw milk, collected in the Goiás Southwest region during the periods of rainy and dry weathers of 2008. The comparison between the types of sample and period of sample collections was carried out by mean of F test of variance analysis. The statistical analyses were performed by mean of Sisvar software. No changes on centesimal composition and SCC occurred during milk transport to dairy industry. An increase of CBT was observed during the bulk transport of cooled raw milk independently of the period of the year; CBT values were higher than those limits established by the Brazilian legislation.

Key words. cooled raw milk; hygiene; season of year; shipping in bulk.

INTRODUÇÃO

O resfriamento do leite logo após a ordenha, e a coleta granelizada, são importantes medidas para garantir a qualidade microbiológica do leite¹. No entanto, a aplicação isolada dessas medidas, não é suficiente, faz-se 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). LORENZETTI² verificou uma alta contagem inicial de micro-organismos psicrotóxicos, após a chegada da matéria-prima na indústria, podendo resultar em sérios problemas na produção de lácteos.

Segundo BRASIL³ a CBT do leite refrigerado deve ficar abaixo de 750 mil UFC/mL e a contagem de células somáticas (CCS) abaixo de 750 mil CS/mL, sendo que o leite deve ser mantido na propriedade rural em tanques de expansão com temperatura máxima de 7°C e após a chegada na indústria a temperatura deve ser de no máximo 10°C.

O transporte do leite a granel, beneficia os produtores, com a redução dos custos com o frete, flexibilidade nos horários de ordenha e aumento de produtividade; as indústrias, com a redução dos custos com insumos e mão de obra para limpeza dos latões; e os consumidores, com a melhoria do produto⁴.

Conhecer as características do leite cru refrigerado após o recebimento pela indústria, são medidas importantes no monitoramento da qualidade dos derivados lácteos.

O presente estudo teve como objetivo averiguar as alterações que ocorrem na qualidade do leite transportado a granel em tanques isotérmicos, através da avaliação da composição centesimal, CBT e CCS.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

A pesquisa foi realizada no período de 30 de março a 25 de abril de 2008 (período chuvoso) e de 02 de maio a 11 de julho de 2008 (período seco). Foram coletadas amostras de leite, armazenadas em tanques de expansão de propriedades rurais do Sudoeste Goiano e amostras de leite após o transporte granelizado.

O laticínio responsável pela coleta granelizada recebia e processava aproximadamente, 50 mil L/dia no período chuvoso e aproximadamente 30 mil L/dia no período seco. Eram fabricados queijo mussarela, prato, ricota e manteiga.

O laticínio era registrado no Serviço de Inspeção Federal (SIF) e possuía fornecedores de leite integrados a um programa de coleta granelizada. Os tanques de expansão instalados nas propriedades rurais possuíam capacidade de armazenamento de aproximadamente 1.000 L e os caminhões que realizavam a coleta possuíam tanques isotérmicos de capacidade de aproximadamente 8.500 L.

Foram realizadas 20 viagens durante o período experimental totalizando 143 amostras de leite cru refrigerado e 38 amostras de leite granelizado. No período chuvoso foram feitas oito, totalizando 62 amostras de leite cru refrigerado de tanques de expansão e 16 de leite cru refrigerado obtido do tanque isotérmico. No período seco foram realizadas 12 viagens, sendo 81 amostras de leite cru refrigerado obtidas de tanques de expansão e 22 do tanque isotérmico.

As viagens eram compostas da amostragem de vários produtores e de uma amostra de cada compartimento do tanque isotérmico. Os tanques isotérmicos eram constituídos de dois compartimentos para armazenamento e transporte do leite da propriedade rural até o laticínio.

A coleta foi realizada em condições assépticas, após a agitação mecânica programada no próprio tanque de expansão, e o leite foi armazenado em frascos contendo conservante bronopol (análise da CCS e composição centesimal) e azidiol (análise da CBT), acondicionadas em caixa isotérmica contendo gelo e encaminhadas para realização das análises no Laboratório de Qualidade do Leite do Centro de Pesquisa em Alimentos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás (LQL/CPA/EV/UFG). Ao chegar à indústria, coletavam-se as amostras do tanque isotérmico após a agitação mecânica do leite por aproximadamente 5 minutos.

No momento da coleta aferia-se a temperatura (°C) de estocagem do leite na fonte de produção e após a chegada na indústria, anotando-se ainda o tempo de estocagem do leite na propriedade rural e o percurso da rota de coleta granelizada (km).

Análises laboratoriais

Composição centesimal

Os teores de gordura, proteína, lactose, extrato seco total (EST) e extrato seco desengordurado (ESD) foram determinados através do princípio analítico que baseia-se na absorção diferencial de ondas infravermelhas pelos componentes do leite, utilizando-se o equipamento

Milkoscan 4000 (Foss Electric A/S. Hillerod, Denmark). As amostras foram previamente aquecidas em banho-maria à temperatura de 40°C por 15 minutos para dissolução da gordura. Os resultados foram expressos em porcentagem (%).

Contagem de células somáticas

A análise de células somáticas (CS), cujo princípio analítico baseia-se na citometria de fluxo foi realizada através do equipamento Fossomatic 5000 Basic (Foss Electric A/S. Hillerod, Denmark). Antes da análise, as amostras foram previamente aquecidas em banho-maria à temperatura de 40°C por 15 minutos para dissolução da gordura. O resultado foi expresso em CS/mL.

Contagem bacteriana total

A contagem bacteriana total (CBT) foi realizada por meio do equipamento Bactoscan FC (Foss Electric A/S. Hillerod, Denmark), cujo princípio de análise baseia-se na citometria de fluxo que consiste na medição de características celulares, quando estas se encontram suspensas em meio fluido. Os resultados foram expressos em UFC/mL.

Análises Estatísticas

A comparação dos tipos de amostra e período de coleta foi realizada por meio do teste F da análise de variância. As análises estatísticas foram realizadas com o uso do Software Sisvar⁵.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 estão os resultados médios do tempo e temperatura de estocagem das amostras de leite cru refrigerado e distância da rota de coleta.

No período chuvoso foi possível observar que a temperatura média das amostras mantidas em tanques

de expansão em propriedades rurais do Sudoeste Goiano foi de 9,7°C, na chegada à indústria a temperatura média foi de 11°C. O tempo médio de armazenamento do leite cru refrigerado na propriedade rural até o momento da coleta foi de 46 horas. A distância média percorrida para a coleta granelizada do leite foi de 138 km.

Os resultados evidenciaram que no período chuvoso a temperatura do leite mantido nos tanques de expansão ficou acima da máxima permitida por BRASIL³ que é de 7°C. A temperatura média exigida para o recebimento do leite na indústria de laticínios, também ficou acima do permitido pela legislação que é de 10°C. O tempo de estocagem do leite na propriedade rural foi de 46 horas, sendo que o máximo permitido pela legislação brasileira é de 48 horas, entretanto recomenda-se como ideal a estocagem de até 24 horas na fonte de produção. No presente estudo foram coletadas amostras de leite com até 72 horas de estocagem na propriedade rural, o que pode contribuir para o aumento da contagem de microorganismos psicrótrófos.

No período seco foi possível observar uma temperatura média de 6,8°C no leite coletado em tanques de expansão, ao chegar à indústria de beneficiamento a temperatura foi de 8,5°C. O tempo médio de estocagem do leite na propriedade rural foi de 49 horas e a distância percorrida para a coleta granelizada do leite foi de 137 km.

Para o período seco a temperatura média permitida para o armazenamento do leite em tanques de expansão na propriedade rural e tanque isotérmico ficou dentro do proposto pela legislação, porém, o tempo médio de estocagem do leite na fonte de produção foi acima de 48 horas, sendo que foram encontradas amostras com até 72 horas de estocagem na propriedade rural.

Na pesquisa realizada por PINTO⁶ foi observado que em 16,7% das amostras, a temperatura estava acima de 10°C, portanto acima do limite máximo exigido pela

Tabela 1. Valores médios do tempo de estocagem, temperatura de estocagem e distância da rota de coleta das amostras de leite cru refrigerado

Período	Estocagem (horas)	Temperatura (°C)		Distância (km)
		Tanque de expansão	Tanque isotérmico	
Chuvoso	46	9,7	11,0	138
Seco	49	6,8	8,5	137

legislação. O tempo e a temperatura de armazenamento do leite na propriedade rural, são fatores que influenciam na qualidade do leite ao chegar à indústria de laticínios, além disso, MOURA⁷ e PINTO⁶ relataram que o manejo sanitário do rebanho, a manipulação do leite, incluindo a ordenha e o transporte das propriedades rurais até os laticínios, são responsáveis por alterações na qualidade do leite.

Na Tabela 2 encontram-se os resultados da composição centesimal, CCS e CBT das amostras de leite cru refrigerado obtidas de tanques de expansão e tanques isotérmicos durante os períodos chuvoso e seco de 2008.

Os resultados obtidos para a composição centesimal do leite transportado a granel da propriedade rural até a indústria, não diferiram significativamente ($p > 0,05$), ou seja, o transporte granelizado não alterou as características iniciais do leite cru refrigerado.

BRASIL³ recomenda para os teores de gordura, proteína, ESD e EST os valores mínimos de 3,0%; 2,9%, 8,4% e 11,4% respectivamente. Os resultados desta pesquisa estão próximos aos valores médios obtidos por DERESZ⁸, que encontrou para o teor de gordura, proteína e EST, 3,7%; 3,2% e 12,4% respectivamente. Valores de composição centesimal abaixo dos resultados encontrados

no presente estudo foram obtidos por TEIXEIRA⁹, que relataram 3,57%; 3,14% e 12,16% para os teores de gordura, proteína total e EST em vacas da raça holandesa e MARTINS¹⁰, que obtiveram média de 2,82% de proteína, 3,23% de gordura, 4,16% de lactose, 11,24% de EST e 8,0% de ESD.

Houve diferença significativa ($p < 0,05$) para o teor de lactose entre os períodos do ano, sendo que no período seco o teor de lactose foi mais elevado que no período chuvoso, os demais parâmetros avaliados não foram influenciados pelos períodos do ano (chuvoso e seco).

Os valores de lactose do presente estudo, ficaram abaixo do resultado obtido por TEIXEIRA⁹, que foi de 4,66% ao estudarem a lactação de vacas da raça holandesa. Resultado próximo ao da presente pesquisa foi obtido por MACHADO¹¹ que obtiveram média de lactose de 4,51% em amostras de leite de tanques de expansão.

A CCS não diferiu ($p > 0,05$) entre os períodos do ano e tipos de amostra, ou seja, o transporte a granel do leite cru refrigerado obtido na propriedade rural até o laticínio não afetou a CCS do leite.

Os resultados da CCS ficaram abaixo do limite máximo previsto pela Instrução Normativa nº 51³. A CCS máxima estabelecida para o recebimento do leite cru refrigerado nas regiões Centro-Oeste, Sul e Sudeste para o

Tabela 2. Valores médios da composição centesimal, CCS e CBT do leite cru refrigerado obtido de tanques de expansão e tanques isotérmicos no período chuvoso e seco de 2008

Parâmetros avaliados	Períodos do ano					
	Chuvoso			Seco		
	Tipo de tanque		Média	Tipo de tanque		Média
Expansão n = 62	Isotérmico n = 16	Expansão n = 81		Isotérmico n = 22		
Gordura (%)	3,87	3,8	3,84a	3,89	3,82	3,86a
Proteína (%)	3,32	3,32	3,32a	3,29	3,27	3,28a
Lactose (%)	4,41	4,41	4,41b	4,49	4,49	4,49a
EST (%)	12,52	12,45	12,49a	12,62	12,52	12,57a
ESD (%)	8,65	8,65	8,65a	8,72	8,71	8,72a
CCS (CS/mL)	$5,27 \times 10^5$	$5,22 \times 10^5$	$5,24 \times 10^5$ a	$5,37 \times 10^5$	$5,21 \times 10^5$	$5,29 \times 10^5$ a
CBT (UFC/mL)	$7,61 \times 10^6$	$11,66 \times 10^7$	$9,64 \times 10^6$ a	$3,50 \times 10^6$	$6,19 \times 10^6$	$4,84 \times 10^6$ b

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

período que vai de julho de 2008 a julho de 2011 é de 750 mil CS/mL. CASURA¹² informaram que o limite de 500 mil células/mL pode ser utilizado para dividir os animais não infectados dos infectados. Desta forma, os valores obtidos para a CCS sinalizaram para uma incidência de mastite no rebanho, o que pode resultar em prejuízos para os produtores rurais e principalmente para as indústrias, devido a alterações nas características sensoriais e a redução no rendimento industrial de queijos.

Os resultados da CCS obtidos por MARTINS¹⁰ foram de 334 mil CS/mL e 332 mil CS/mL, respectivamente, para os períodos chuvoso e seco, sendo que os valores do presente estudo foram maiores.

A CBT no período chuvoso diferiu significativamente ($p < 0,05$) dos resultados obtidos no período seco. Os valores da CBT do leite cru refrigerado ficaram acima dos padrões exigidos por BRASIL³, tanto nos períodos chuvoso e seco, quanto nas amostras obtidas na propriedade rural e tanques isotérmicos. Até 2011 a CBT máxima permitida para o recebimento do leite cru refrigerado pelas indústrias de laticínios será de 750 mil UFC/mL (BRASIL³), a partir dessa data para o leite de conjunto será permitido o máximo de 300 mil UFC/mL, e para o leite individual o máximo de 100 mil UFC/mL.

Pode ser observado mediante os resultados da CBT que no período chuvoso a contagem de microorganismos foi mais elevada que no período seco. Os fatores que influenciaram a contagem elevada foram a falta de higiene dos utensílios e equipamentos utilizados na ordenha e transporte do leite, a temperatura de estocagem ao redor de 10°C e o tempo de estocagem próximo a 48 horas.

A qualidade do leite está relacionada com o grau de contaminação inicial e com o binômio tempo/temperatura, em que o leite permanece desde a ordenha até o processamento¹³. De acordo com BRASIL³, a coleta granelizada do leite deve ser realizada por pessoal treinado, sendo fundamental, no momento da coleta na propriedade rural, a avaliação da estabilidade do leite através da prova do alizarol a 72%, o que não foi observado em nenhuma das propriedades avaliadas. A prova do alizarol no momento da coleta estabelece o padrão de qualidade do leite a ser recebido pela indústria de laticínios, o leite que não resistir à prova e coagular, não estará apto ao processamento térmico, devido a provável coagulação na tubulação durante a pasteurização do leite, o que poderia gerar sérios prejuízos a indústria de laticínios.

No presente estudo os responsáveis pelo transporte do leite cru refrigerado, não possuíam o

conhecimento necessário para a coleta granelizada do leite. Durante a coleta deveriam ser retiradas amostras de leite cru refrigerado de aproximadamente 250 mL, armazenadas em caixa isotérmica contendo gelo, para serem encaminhadas ao laboratório do laticínio, a fim de monitorar a qualidade do leite recebido pela indústria, entretanto, esse procedimento não era realizado. Como o tanque isotérmico possuía dois compartimentos para o armazenamento do leite, a falta de frascos contendo amostras de leite que identificassem individualmente as propriedades coletadas, impedia o monitoramento da qualidade do leite recebido pela indústria de laticínios. Em caso de fraudes como a adição de água que é muito comum, seria difícil para que o laticínio pudesse identificar o produtor responsável pela adulteração.

Embora não tenha ocorrido diferença significativa ($p > 0,05$) na interação entre os tipos de amostra em função dos períodos do ano, foi possível observar diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tipos de amostra, quando avaliados durante todo o período experimental. Ou seja, os resultados médios da CBT das amostras de leite cru refrigerado, após o transporte granelizado, foram maiores que os valores obtidos para as amostras armazenadas em tanques de expansão.

Os resultados médios da CBT foram de $5,2 \times 10^6$ UFC/mL e $8,4 \times 10^6$ UFC/mL para as amostras dos tanques de expansão e tanques isotérmicos, respectivamente. Esses valores estão acima da recomendação feita por BRASIL³, para o recebimento de leite cru refrigerado pelas indústrias de laticínios e indicaram que houve um aumento na contagem de microorganismos de 61,54% (UFC/mL) após a retirada do leite dos tanques de expansão até a chegada no laticínio.

Durante a coleta granelizada e até a chegada ao laticínio, vários fatores podem ter interferido na qualidade do leite cru refrigerado. Uma fonte potencial de contaminação era o registro de saída do leite, localizado na parte inferior do tanque de expansão. O acúmulo de sujidades nesse ponto pode ter provocado uma elevação da CBT. O mangote flexível por onde o leite era transportado até o tanque isotérmico, possuía uma proteção para evitar o acúmulo de sujidades, porém entre uma propriedade e outra não era realizada higienização, servindo de fonte para a multiplicação dos microorganismos. Porém, os maiores responsáveis pelo aumento da CBT foram a temperatura e o tanque isotérmico.

Ao transferir o leite cru refrigerado do tanque de expansão, para o tanque isotérmico pode ser observado

um ligeiro aumento da temperatura tanto no período chuvoso quanto no seco (Tabela 1), que possivelmente influenciaram o aumento da CBT, além disso, como o tanque era isotérmico o leite não passava por refrigeração até a chegada ao laticínio.

Como a limpeza e sanitização dos tanques isotérmicos era realizada após a estocagem do leite granelizado, ou em alguns casos somente no dia seguinte, pode ter ocorrido a formação de biofilmes, também responsáveis pelo aumento da CBT, portanto o transporte do leite cru refrigerado da propriedade rural até o laticínio exerceu uma forte influência na qualidade do leite recebido pela indústria de laticínios. PINTO⁶ relataram que o leite mantido no silo industrial não atendeu ao padrão microbiológico e apresentou contagens microbianas maiores do que as do leite mantido em tanques individuais ou coletivos.

Os valores médios da CBT são preocupantes, pois segundo FOX¹⁴, as bactérias psicotróficas causaram proteólise quando a população excedeu 10⁶ UFC/mL, entretanto, CROMIE¹⁵ relatou que os problemas apareceram quando a contagem atingiu 10⁷ UFC/mL. Como os resultados do presente estudo ficaram acima do valor relatado por FOX¹⁴, deverão ser tomadas medidas com o objetivo de minimizar ou prevenir o crescimento microbiano do leite da propriedade rural até a chegada ao laticínio. Os psicotróficos são microrganismos predominantes do leite cru refrigerado e são formados por diversos gêneros bacterianos, com predominância do gênero *Pseudomonas*, que em sua maioria produz proteases e/ou lipases a temperaturas de refrigeração¹⁶. Essas enzimas são preocupantes, pois de acordo com SØRHAUG & STEPANIAK¹⁷ as bactérias psicotróficas proteolíticas constituem a maior causa de deterioração de amostras de leite cru refrigerado devido a termorresistência.

Para corrigir os problemas relacionados a elevada CBT do leite cru refrigerado deverão ser realizados o monitoramento da temperatura de estocagem, a higiene e sanitização dos tanques de expansão, mangotes, tanques isotérmicos, utensílios e equipamentos, que entrem em contato com o leite cru refrigerado. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e órgãos responsáveis pela fiscalização do leite, deverão atuar no monitoramento da qualidade do leite cru refrigerado obtido no Sudoeste Goiano, para que a região possa atender as exigências da Instrução Normativa nº. 51 para 2011.

CONCLUSÕES

A composição centesimal e a CCS não alteraram durante o transporte do leite da propriedade rural até o laticínio. A maior CBT do leite durante o período chuvoso resultou em redução do teor de lactose. A CBT do leite obtido na propriedade rural e transportado a granel até o laticínio, não atendeu às especificações da legislação brasileira. Houve um aumento da CBT durante o transporte granelizado do leite cru refrigerado independente do período do ano.

REFERÊNCIAS

1. Nero LA, Mattos MR, Beloti V, Barros MAF, Pinto JPA. Leite e cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa 51. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2005; 25(1): 191–5.
2. Lorenzetti DK. Influência do tempo e da temperatura no desenvolvimento de microrganismos psicotróficos no leite cru de dois estados da região sul [Dissertação Mestrado]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2006. 71 pp.
3. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA). Instrução Normativa n. 51, de 18 de set. 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, p. 13-22, 20 de set. de 2002. Seção 1.
4. Ribeiro MT, Teixeira SRL. Qualidade do leite em tanques de expansão individuais ou comunitários. *Glória Rural*. 2000; 3(38): 28–35.
5. Ferreira DF. Sisvar: versão 4.3 (Build 43). Lavras: Departamento de Ciências Exatas, Universidade Federal de Lavras, 2003.
6. 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.
7. Moura ACS. Caracterização da qualidade do leite cru refrigerado produzido em municípios do estado de Alagoas [Tese de Doutorado]. Pernambuco, Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2008. 63pp.
8. Deresz F. Produção de leite de vacas mestiças Holandês x Zebu em pastagem de capim-elefante, manejada em sistema rotativo com e sem suplementação durante a época das chuvas. *R Bras Zootec*. 2001; 30(1): 197–204.
9. Teixeira NM, Freitas AF, Barra RB. Influência de fatores de meio ambiente na variação mensal da composição e contagem de células somáticas do leite em rebanhos no Estado de Minas Gerais. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2003; 55(4) 491–9.
10. 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.
11. Machado PF, Pereira AR, Sarries GA. Composição do leite de tanques de rebanhos brasileiros distribuídos segundo sua contagem de células somáticas. *R Bras Zootec*. 2000; 29(6): 1883–6.

12. Casura C, Schukken YH, Rüsç P. Quality assessment of California mastitis test as a diagnostic tool in quarter somatic cell count estimation. *Proc. IDF Int. Mastitis Seminar*, Tel Aviv, 1995, 357–8.
13. Silveira IA, Carvalho EP, Teixeira D. Influência de microrganismos psicotróficos sobre a qualidade do leite cru refrigerado. Uma revisão. *Higiene Alimentar*. 2000; 12(55): 21–7.
14. Fox PF. *Developments in Dairy Chemistry – 4. Functional Milk Proteins*. Elsevier Applied Science, Elsevier Science Publisher Ltd. London and New York, 1989.
15. Cromie S. Psychrotrophs and their enzyme residues in cheese milk. *Australian Journal of Dairy Technology*. 1992; 47(2): 96–100.
16. Arcuri EF, Silva PDL, Brito MAVP, Brito JRF, Lange CC, Magalhães MMA. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. *Cienc Rural*. 2008; 38(8): 2250–5.
17. Sørhaug T, Stepaniak L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. *Trends in Food Science & Technology*. 1997; 8: 35–7.

Influência da densidade de estocagem na composição química, no colesterol e no perfil de ácidos graxos em Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* LINNAEUS, 1857)

Influence of stocking density on the chemical composition in cholesterol and fatty acids profile in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* LINNAEUS, 1857)

RIALA6/1235

Maria Emília da Silva MENEZES^{1*}, Edma Carvalho de MIRANDA¹, Denise Maria PINHEIRO¹, Felipe Tenório CINTRA², Moaceli de Magalhães FREIRE², Cyro Rego CABRAL JÚNIOR³, Antônio Euzébio Goulart SANT'ANA¹

*Endereço para correspondência: Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas
Campus A.C. Simões. Tabuleiro dos Martins. CEP: 57072-970 – Maceió, AL, Brasil.
e-mail: memenezes_2@yahoo.com.br

¹Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas
Maceió, AL, Brasil

²CECA- Universidade Federal de Alagoas - Maceió, AL, Brasil

³Faculdade de Nutrição - Maceió-AL, Brasil.

Recebido: 16.09.2009 – Aceito para publicação: 03.12.2009

RESUMO

Para avaliar a influência da densidade de estocagem na composição química, no valor calórico, no teor de colesterol e no perfil de ácidos graxos em Tilápia s (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1875), foram utilizados 120 alevinos com peso inicial médio de 4,0g, distribuídos em 20 aquários (70L cada um) em delineamento experimental inteiramente casualizado com 4 tratamentos, 50, 75, 100 e 125peixes/m³ e 5 repetições. A ração fornecida continha 36% de proteína bruta e 3100kcal/ED/kg de ração. Ao final do cultivo, encontrou-se diferença significativa ($p < 0,05$) na análise do peso médio final e no ganho de peso total entre as diferentes densidades populacionais testadas, sendo o maior peso encontrado para a densidade de 75peixes/m³. Com relação à análise da composição corporal observou-se diferença ($p < 0,05$) entre as densidades para os teores de umidade; lipídeos totais; teor de proteína bruta, valor calórico e de colesterol. A relação poli-insaturados/saturados foi mais elevada na densidade de 100peixes/m³ (11,76), já a densidade de 50peixes/m³ apresentou um somatório de (6,85) para os teores de EPA+DHA. Na avaliação da qualidade nutricional dos lipídeos, as densidades estudadas mostraram os índices de n-6/n-3, hipocolesterolêmicos/hipercolesterolêmicos (HH), índice de ácidos graxos poliinsaturados de aterogenicidade (IA) e índice de trombogenicidade (IT) favoráveis quanto ao consumo alimentar. Conclui-se que a densidade de 50peixes/m³ pode ser considerada uma boa fonte de ácidos graxos, principalmente de ácido ômega-3 e pelo seu valor em HH.

Palavras-chave. *Oreochromis niloticus*, densidade de estocagem, composição química, colesterol, ácidos graxos

ABSTRACT

To assess the influence of stocking density on the chemical composition, the calorific value, the content of cholesterol and fatty acids profile in tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1875) were used 120 fingerlings with average initial weight of 4.0 g, distributed in 20 aquaria (70L) in a completely randomized design with 4 treatments, 50, 75, 100 and 125peixes/m³ and 5 replicates. The ration supplied contained 36% crude protein and 3100kcal/ED/kg ration. At the end of cultivation, there was significant difference ($p < 0.05$) in the analysis of the final weight and total weight gain between the different densities tested, the largest weight found for the density of 75peixes/m³. Regarding the analysis of body composition was observed difference (< 0.05) between the densities for the content of moisture, total lipids, crude protein, calorie and cholesterol. The polyunsaturated / saturated density was highest in the 100peixes/m³ (11.76), since the density of 50peixes/m³ presented a sum of (6.85) for the content of EPA+DHA. In assessing the nutritional quality of lipids, the density showed the rates of n-6/n-3, hypocholesterolemic / hypercholesterolemic (HH) index of atherogenicity (IA) and index of thrombogenicity (IT) as favorable for consumption. It is concluded that the density of 50peixes/m³ may be a good source of fatty acids, particularly omega-3 acid and its value in HH.

Key words. *Oreochromis niloticus*, storage density, chemical composition, cholesterol, fatty acids

INTRODUÇÃO

A tilapicultura vem se mostrando uma ótima alternativa para a piscicultura de água doce e estuarina. A expansão do cultivo da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1875) deve-se ao ótimo desempenho, alta rusticidade, facilidade de obtenção de alevinos, adaptabilidade aos mais diversos sistemas de criação, grande aceitação no mercado de lazer (pesque-pague) e alimentício (frigoríficos) e pelas qualidades nutritivas e organolépticas do seu filé¹.

No desenvolvimento de um pacote de produção para uma espécie de peixe, o primeiro passo é a determinação da densidade de estocagem ideal, a qual visa determinar os níveis ótimos de produtividade por área². Jobling³ relata que a densidade de estocagem tem efeito na sobrevivência e no crescimento, sendo uma possível causa do fracasso na produção final de peixes. Normalmente, peixes criados em baixas densidades de estocagem apresentam boa taxa de crescimento e alta porcentagem de sobrevivência, porém a produção por área é baixa⁴, caracterizando baixo aproveitamento da área disponível. Por sua vez, peixes mantidos em altas densidades normalmente têm menor crescimento⁵, ficam estressados⁶ e estão sujeitos ao aparecimento de interações sociais que levam à produção de um lote de peixes com tamanho heterogêneo⁷.

Entre as espécies de peixes utilizadas na aquicultura, as tilápias, especialmente do gênero *Oreochromis*, são algumas das mais promissoras em países de clima tropical ou subtropical^{8,9}. Tilápias do gênero *Oreochromis*, em especial *Oreochromis niloticus*, têm sido consideradas importantes para as condições de cultivo no Brasil por sua rápida taxa de crescimento, pela adaptabilidade aos diversos sistemas de cultivo e pela alta aceitação no mercado consumidor^{10,11}.

O pescado é de extrema importância na dieta alimentar por sua riqueza de nutrientes, alto teor protéico, contendo uma composição de aminoácidos equilibrada, lipídeos de excelente qualidade e baixo teor de colesterol¹². O conhecimento da composição química, no valor de colesterol e no perfil de ácidos graxos do filé da tilápia é necessário para que o seu consumo possa ser estimulado, possibilitando a competição com outras fontes protéicas largamente utilizadas como a de carne bovina, suína e de aves.

A natureza e proporção dos ácidos graxos na dieta também influenciam na concentração do colesterol

sérico, sendo que os ácidos graxos saturados tendem a elevá-lo, enquanto os ácidos graxos poli-insaturados promovem sua diminuição¹³. As pesquisas nutricionais e epidemiológicas revelam que a proporção entre ácidos graxos poli-insaturados n-6 e n-3 na dieta é tão importante para as funções fisiológicas e prevenção de doenças quanto à proporção entre ácidos graxos saturados e insaturados¹⁴.

Em peixes de água doce, os ácidos graxos alfa-linolênico (LNA) e linoléico (LA) são precursores de outros ácidos das famílias ômega 3 e 6, respectivamente. Portanto, a composição em ácidos graxos da ração fornecida para uma determinada espécie de peixe determinará a composição em ácidos graxos dos lipídeos dos peixes. A constatação epidemiológica de que o consumo de peixes é capaz de reduzir riscos de doenças coronarianas torna a carne de pescado um alimento importante, não apenas como alternativa alimentar de alto valor nutritivo, mas ainda de consumo de um alimento funcional¹⁵.

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência de diferentes níveis de densidades de estocagem na composição centesimal, no valor calórico, no teor de colesterol e no perfil de ácidos graxos em alevinos de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1857).

MATERIAL E MÉTODOS

Peixes

O presente experimento foi realizado nas instalações do Laboratório de Aquicultura do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, no período de agosto a outubro de 2007. Foram utilizados 120 alevinos de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1857), com peso inicial médio de 4,0g. Foram avaliadas diferentes densidades de estocagem, utilizando-se um delineamento inteiramente casualizado com 4 tratamentos: 50, 75, 100 e 125peixes/m³ e 5 repetições.

O experimento foi conduzido em um conjunto de 20 aquários de polietileno com capacidade para 70L, sendo que cada caixa foi considerado como unidade experimental. Os alevinos foram pesados em balança analítica e medidos ao início e ao término do experimento. Os aquários experimentais possuíam aeração contínua para promover a oxigenação da água, com uma troca diária de água de 10% do volume total.

Antes do início do experimento, os animais foram submetidos a um período de adaptação ao ambiente, ao

manejo e à dieta experimental, por 15 dias. Os peixes foram alimentados até a saciedade aparente três vezes por dia (8:00h; 12:00h e 17:00h) “*ad libitum*”, por 90 dias, durante este período, os aquários foram limpos diariamente, para a retirada de fezes e sobra de ração. A qualidade da água foi acompanhada a cada semana, através das medidas de temperatura, do pH por potenciômetro digital, oxigênio dissolvido por meio de oxímetro digital, quantidade de amônia e nitrato por espectrofotômetro.

Ao final do período experimental foram capturados três peixes de cada aquário, sendo anestesiados com 50mg/L de benzocaína¹⁶, pesados, medidos e abatidos. As seguintes características de desempenho foram estudadas: peso final (g); ganho de peso (%); conversão alimentar aparente (consumo de ração ÷ ganho em biomassa); taxa de crescimento específico (%/dia); índice de massa de filé; rendimento de filé e rendimento de carcaça eviscerada.

Preparo da Ração

A ração foi balanceada para apresentar-se isoprotéica e isoenergética (36% de proteína bruta e 3100kcal/ED/kg de ração), conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Composição percentual e química da dieta experimental

Ingredientes	Quantidade em (g)
Farelo de soja	1.725,00
Farinha de peixe	155,00
Farelo de trigo	60,00
Quirera de arroz	822,00
L-lisina	21,00
DL- metionina	13,50
CrO ₃	3,00
Treonina	12,00
Óleo de soja	15,00
Fosfato bicálcico	90,00
Calcário	55,50
Vitamina C	2,40
Sal comum	3,00
Premix vitamínico	3,00
Premix mineral	9,00
BHT (antioxidante)	0,6

Tabela 2. Composição bromatológica da ração experimental

Composição Centesimal (g/100g de porção)*	Ração Basal Experimental
Umidade	7,0 ± 0,28
Lipídeos totais	0,7 ± 0
Proteína bruta	32,4 ± 0,14
Cinzas	22,5 ± 3,11
Fibra bruta	7,4 ± 1,0
Carboidratos	30,0 ± 2,3
Calorias (kcal)	255,8 ± 9,76

*Analisadas em triplicata, com a média e o desvio-padrão.

Análises Químicas

Após homogeneização, realizaram-se as seguintes determinações em triplicata: Umidade: determinada pela perda de peso em estufa regulada a 105°C, segundo AOAC¹⁷. Cinzas: obtidas por incineração de uma quantidade conhecida da amostra, em mufla a 550°C, até obtenção de peso constante AOAC¹⁷. Proteínas: determinadas pelo método Kjeldhal, que consiste na determinação do nitrogênio total. Para converter o resultado em proteína bruta foi utilizado o fator 6,25 AOAC¹⁷. Os carboidratos foram determinados por diferença. O valor calórico foi estimado através dos fatores de conversão de Atwater: 4kcal.g⁻¹ para proteínas, 4kcal.g⁻¹ para carboidratos e 9kcal.g⁻¹ para lipídeos¹⁸. Lipídeos totais: extraídos a frio pelo método de Folch et al.¹⁹ utilizando 2 extrações com clorofórmio:metanol (2:1), lavagem do resíduo (clorofórmio:metanol – 2:1), adição de KCl 0,88% em H₂O, separação das fases, adição de metanol: H₂O (1:1), evaporação de clorofórmio em rota-evaporador, fração lipídica ressuspendida em clorofórmio. Alíquotas foram tomadas para determinações gravimétricas. (Tabela 2)

Para a determinação de colesterol uma alíquota de 2,5ml do extrato lipídico obtido pelo método de Folch foi tomada para análise, segundo o procedimento de Bohch et al.²⁰, através de saponificação, extração da matéria insaponificável, reação de cor, leitura da absorbância em espectrofotômetro a 490nm, contra um branco. A curva de calibração para colesterol foi elaborada segundo Searcy e Bergquist²¹, utilizando-se 0,06g de colesterol (Sigma P. A., St. Louis, MO) diluído em 100mL da solução acetona/etanol (1:1) (50mL de acetona P. A. e 50mL de etanol). De acordo com a curva padrão obteve-se a equação $\hat{y} = 1,1608x$; $R^2 = 0,9948$, passando pela origem e cobriu a faixa de concentração das amostras.

O perfil de ácidos graxos foi determinado inicialmente com a extração lipídica feita através do método Folch et al.¹⁹. Os lipídeos totais foram esterificados segundo Hartman e Lago²². Os ésteres metílicos foram analisados no Laboratório de Produtos Naturais do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, utilizando-se um cromatógrafo a gás Shimadzu, modelo GC-17A, equipado com uma coluna capilar DB-5, série us 1352151h, com 30m de comprimento, 0,25µm de espessura e 0,25mm de diâmetro interno. Foi utilizado Hélio (He) como gás de arraste a um fluxo de 1mL.min⁻¹ e pressão de 50kPa. A temperatura inicial foi de 50°C que permaneceu constante durante 2min, em seguida sofreu um aumento de temperatura até atingir 250°C a uma velocidade de 4°Cmin⁻¹ permanecendo constante durante 15min. O tempo total de análise foi de 67min. As temperaturas do injetor e da interface foram mantidas a 250°C e 310°C respectivamente. O modo de controle de injeção foi o Split, com razão de 30:1. Foram obtidos os espectros de massas por impacto eletrônico (IE) a 70eV. Para a identificação dos ácidos graxos foram utilizados padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos puros, comparando-se o tempo de retenção dos ésteres metílicos das amostras e dos padrões. A quantificação dos ácidos graxos foi feita por normalização de área.

A qualidade nutricional da fração lipídica foi avaliada por três índices a partir dos dados de composição em ácidos graxos, através dos seguintes cálculos: Índice de Aterogenicidade (IA) = [(C12:0 + (4 X C14:0) + C16:0)] / (ΣAGMI + Σn6 + Σn3); Índice de Trombogenicidade (IT) = (C14:0 + C16:0 + C18:0) / [(0,5 X Σ AGMI) + (0,5 X Σn6 + (3 X Σn3) + (Σn3/Σn6)], segundo Ulbricht e Southgate²³; e razão entre ácidos graxos hipocolesterolêmicos e hipercolesterolêmicos (HH) = (C18:1n9 + C18:2n6 + C20:4n6 + C18:3n6 + C20:5n3 + C22:5n3 + C22:6n3) / (C14:0 + C16:0), segundo Santos-Silva et al.²⁴. Em que: AGMI = todos os ácidos monoinsaturados.

Análise Estatística

Foram observadas as pressuposições paramétricas de normalidade (teste de Lilliefors) e homogeneidade das variâncias dos resíduos (teste de Levene), ambos com >0,05. Assim, realizou-se análise de variância para verificar a existência ou não de diferença significativa. Para a comparação múltipla entre as médias dos tratamentos utilizou-se o teste *Post-hoc* de Tukey-HSD. Adotou-se como nível de significância valores menores que 5% de probabilidade para o erro experimental.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período experimental a qualidade da água permaneceu estável sendo que os valores médios dos parâmetros físico-químicos apresentados na Tabela 3, encontram-se dentro dos recomendados para o cultivo da Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* LINNAEUS, 1857), de acordo Kubitzka²⁵.

Tabela 3. Valores médios dos parâmetros de qualidade da água, durante o período experimental de 90 dias (amostragens a cada sete dias), da criação de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1857)

Parâmetros Ambientais Monitorados	Média *
Potencial hidrogeniônico (pH)	7,2 ± 0,2
Temperatura (°C)	26,6 ± 1,1
Nitrato (N-NO ₃) (mg/L)	0,05 ± 0,008
Oxigênio dissolvido (mg/L)	6,7 ± 0,5
Amônia total (NH ₃ + NH ₄ ⁺) (mg/L)	0,004 ± 0,0003

*Analisadas em triplicada, com a média e o desvio-padrão.

Os resultados apresentados na Tabela 4 demonstram que ao final do cultivo, houve diferença significativa na análise do peso médio final nas diferentes densidades populacionais testadas, levando a diferença significativa no ganho de peso total, observa-se que os maiores valores obtidos para o ganho de peso foi quando a densidade de estocagem foi de 75peixes/m³. Resultados contrários foram obtidos por Silva et al.²⁶ para desempenho produtivo da tilápia em diferentes densidades (90, 120 e 150peixes/m³) e trocas de água em "raceway" com variação de 419,41 a 497,03. Os resultados obtidos no experimento mostram que a limitação de espaço imposta a tilápia implicou na diminuição do ganho de peso com o aumento da densidade de estocagem.

A pior conversão alimentar aparente (p<0,05) foi encontrada para os animais criados na mais alta densidade (3,53), sendo que para as outras densidades não houve diferenças (p<0,05), valores semelhantes foram às outras densidades estudadas foram detectados por Sampaio e Braga²⁷ (1,54 e 1,53) para densidades de 150 e 200peixes/m³ respectivamente, na fase de engorda de tilápia em tanque-rede.

Tabela 4. Parâmetros zootécnicos de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1857) em diferentes densidades de estocagem

Parâmetros	Densidades de Estocagem (peixes/ m ³)				
	50	75	100	125	CV (%)
Peso final (g)	22,75 ^a	46,90 ^b	33,08 ^c	12,35 ^d	18,19
Ganho de peso (%)	17,91 ^a	41,98 ^b	28,72 ^c	9,10 ^d	21,39
Conversão alimentar aparente	1,59 ^a	1,31 ^a	1,51 ^a	3,53 ^b	31,76
Taxa de crescimento específico (%pv/dia)	1,72 ^a	2,49 ^b	2,23 ^b	1,45 ^a	10,01
Índice de massa de filé	7,66 ^a	15,2 ^b	8,2 ^a	2,66 ^c	16,31
Rendimento de filé	33,70 ^a	32,56 ^a	24,77 ^b	21,58 ^a	6,12
Rendimento de carcaça eviscerada	92,35 ^{ab}	96,67 ^c	94,72 ^{bc}	90,54 ^a	2,45

Valores na mesma linha com letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste *Post-hoc* de Tukey-HSD.

CV= coeficiente de variação.

Para a taxa de crescimento, os resultados demonstram que houve diferença ($p < 0,05$), onde os melhores valores foram aqueles para as densidades de criação entre 50 e 75 peixes/m³, cujos valores foram maiores do que aqueles encontrados para a maior e menor densidade (1,72 e 1,42 respectivamente). (Tabela 4)

O rendimento de filé da tilápia depende de fatores diversos, entre eles: condição corporal e tamanho do peixe, método de filetagem e habilidade técnica do filetador (Kubitza, 2000)²⁵. Na literatura são encontrados rendimentos de filé sem pele de tilápia do Nilo variando de 25,4 a 42%²⁷. Neste estudo, a maior média para rendimento de filé foi encontrada na densidade de 50 peixes/m³. (Tabela 4)

Os teores de umidade, lipídeos totais, cinzas, proteína bruta, carboidratos e valor calórico dos filés nas diferentes densidades, estão apresentados na Tabela 5. Nesta, observa-se diferença ($p < 0,05$) para a composição corporal dos animais criado nas diferentes densidades.

Para os teores de umidade, apenas os animais criados na mais alta densidade (125 peixes/m³) apresentou a menor taxa ($p < 0,05$) de umidade (68,33%). Os resultados encontrados para a umidade são semelhantes àqueles relatados por Ogawa e Maia²⁸, quando descrevem que o músculo do pescado contém teores de umidade variando de 60 a 85%. Leonhardt et al.²⁹ apresentaram a composição

do filé de duas espécies (tilápia vermelha e tilápia do Nilo) demonstrando valores de 79,20 e 78,43%.

No que diz respeito aos teores de proteína bruta houve diferença ($p < 0,05$) entre as densidades, destacando-se a densidade de 125 peixes/m³. Leonhardt et al.²⁹ encontraram teores variando de 18,47 a 19,33%. Segundo Kirk e Sawyer³⁰, quando o método de Kjeldhal é empregado, a composição centesimal total pode ultrapassar os 100%, devido a multiplicação do nitrogênio por 6,25, o que foi observado no presente trabalho. (Tabela 5)

Com relação aos lipídeos totais (BU) houve uma variação de 1 a 3%, observa-se que à medida que a densidade aumentou esta variável também foi incrementada, demonstrando que uma maior população de animais leva a um aumento na quantidade de gordura corpórea. Porém segundo Penfield e Campbell³¹, os peixes deste presente trabalho podem ser classificados quanto ao teor de gordura em magros (abaixo de 5% de gordura). Omena et al.³² estudando níveis diferentes de farelo de coco em tilápias detectaram uma variação de 1,15 a 1,81%. (Tabela 5)

No que diz respeito às cinzas, as densidades de 75 e 125 peixes/m³ apresentaram o maior percentual (2,0%), em base úmida, havendo similaridade estatística ($p < 0,05$) em base seca para as duas espécies. As amostras estiveram dentro da faixa de 1,0 a 2,0% referidas na literatura^{33,34}. Minozzo³⁵ ao estudar a composição centesimal de tilápia

Tabela 5. Composição centesimal e valor calórico do filé de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1857) em diferentes densidades de estocagem

Composição Centesimal (g/100g de porção comestível)*	Densidades de Estocagem				CV (%)
	50 (Peixes/m ³)	75 (Peixes/m ³)	100 (Peixes/m ³)	125 (Peixes/m ³)	
Umidade	74,00 ± 0,8 ^a	73,66 ± 0,8 ^a	73,00 ± 0,9 ^a	68,33 ± 0,6 ^b	0,89
Proteína bruta (BU)	20,00 ± 0,2	21,33 ± 0,3	22,33 ± 0,5	25,33 ± 0,3	2,25
Proteína bruta (BS)	76,66 ± 2,7 ^a	81,33 ± 1,4 ^{ab}	83,00 ± 1,5 ^b	80,00 ± 0,7 ^{ab}	2,47
Lípideos totais (BU)	1,00 ± 0,1	1,00 ± 0,1	2,00 ± 0,2	3,00 ± 0,2	0,0
Lípideos totais (BS)	3,00 ± 0,2 ^a	5,00 ± 0,3 ^b	7,00 ± 0,3 ^c	8,66 ± 0,3 ^d	4,88
Carboidratos (BU)	3,66 ± 0,5	1,66 ± 0,2	1,00 ± 0,4	1,33 ± 0,5	26,09
Carboidratos (BS)	15,66 ± 1,5 ^a	5,66 ± 0,6 ^b	3,66 ± 1,3 ^b	5,00 ± 1,4 ^b	16,33
Cinzas (BU)	1,00 ± 0,2	2,00 ± 0,2	1,66 ± 0,2	2,00 ± 0,2	17,32
Cinzas (BS)	4,66 ± 0,5 ^a	7,00 ± 0,8 ^b	6,00 ± 0,6 ^{ab}	7,00 ± 0,4 ^b	12,39
Valor calórico (kcal)	101,66 ± 3,0 ^a	102,33 ± 1,4 ^a	111,00 ± 3,4 ^b	132,00 ± 2,7 ^c	1,93

*Analisadas 36 amostras com 3 repetições por densidades, com a média e o desvio-padrão. Valores na mesma linha com letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste *Post-hoc* de Tukey-HSD. BU = Base úmida; BS = Base seca e CV = Coeficiente de Variação.

do Nilo observou variações nos teores de cinzas de 0,7 a 3,1%. (Tabela 5)

O maior valor calórico foi encontrado na densidade de 125peixes/m³ (132kcal) e o menor na densidade de 50peixes/m³ (101,66kcal). (Tabela 6)

Esses resultados permitiram classificar os filés por densidades estudadas na categoria D (gordura < 5,0%; proteína > 20,0%)³⁶. Portanto, sob o ponto de vista nutricional, o valor desses filés é excepcional, visto que podem ser utilizados na elaboração de dietas para pacientes obesos, diabéticos e que apresentem doenças crônicas, como câncer e problemas cardiovasculares, além de serem eficazes cardioprotetores, têm apresentado bons resultados no tratamento de pessoas com distúrbios depressivos e psíquicos.

Os resultados obtidos referentes ao teor de colesterol em base úmida para os filés nas diferentes densidades de estocagem estão apresentados da Tabela 6. Observa-se diferença ($p < 0,05$) entre as densidades. A densidade de 50peixes/m³ apresentou o menor teor de colesterol (41,33mg/100g) e o maior nível foi detectado na densidade de 125peixes/m³ (79,33mg/100g). Os resultados encontrados são superiores àqueles relatados por Ferreira

et al.³⁷ que encontrou o teor de colesterol de 33mg/100g para o filé de tilápia do Nilo *in natura* criada em tanque de terra e alimentada com ração comercial. Omena et

Tabela 6. Teores de colesterol em filé de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1857) em diferentes densidades de estocagem

Densidades de Estocagem	Teores (mg/100g)*
50 peixes/m ³ (BU)	41,33 ± 3,5
50 peixes/m ³ (BS)	160,20 ± 17,2 ^a
75 peixes/m ³ (BU)	55,33 ± 3,5
75 peixes/m ³ (BS)	211,64 ± 15 ^b
100 peixes/m ³ (BU)	69,00 ± 3,5
100 peixes/m ³ (BS)	251,3 ± 5,1 ^c
125 peixes/m ³ (BU)	79,33 ± 3,5
125 peixes/m ³ (BS)	250,83 ± 9,5 ^d

*Analisadas 36 amostras com 3 repetições por densidades, com a média e o desvio-padrão. Valores na mesma coluna com letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste *Post-hoc* de Tukey-HSD. BU = Base úmida; BS = Base seca.

al.³² detectou teores superiores com variação de 91,06 a 162mg/100g para filé de tilápia do Nilo alimentadas com rações contendo diferentes níveis de farelo de coco. Apesar do acréscimo do colesterol com o aumento da densidade de estocagem, os teores de colesterol para ambas as densidades estudadas estão abaixo do limite recomendado pela literatura que é de 300mg/dia para dieta humana.

A Tabela 7 apresenta o perfil de ácidos graxos encontrados nas diferentes densidades de estocagem. Dentre os ácidos graxos saturados (AGS) houve predominância do ácido graxo esteárico (C18:0), em relação aos demais AGS. Luzia et al.³⁸ observando a influência do verão e inverno, verificaram para tilápia no verão e no inverno teores de 14,1% e 13,1% respectivamente. Omena et al.³² detectaram valores inferiores a este estudo em tilápias alimentadas com diferentes níveis de farelo de coco. Denke e Grund³⁹ mostraram que a gordura rica em ácido esteárico não eleva os níveis de colesterol total em comparação com a dieta rica em ácido oleico.

O ácido graxo palmítico (C16:0) foi detectado em baixa concentração não havendo diferença ($p < 0,05$) entre as densidades (Tabela 7). Teores mais elevados deste ácido foram encontrados por Nova et al.⁴⁰ para a tilápia (22,0%), Menezes et al.⁴¹ em espécies de peixes da Lagoa Mundaú (tainha 12,97% e camurim 14,38%) e por Omena et al.³² com uma variação de 18,76 a 20,59% em tilápias alimentadas com rações contendo diferentes níveis de farelo de coco. Acredita-se que esse ácido graxo seja um dos principais responsáveis pelo aumento do colesterol sérico⁴², visto que a concentração deste esteróide dobra quando o consumo de ácidos graxos saturados é maior que o de ácidos graxos poli-insaturados⁴³. Isto evidencia, portanto, que os peixes deste estudo apresentaram vantagens em relação às espécies de água doce mencionadas.

Os ácidos graxos láurico (C12:0) e o mirístico (C14:0) foram detectados em pequenas concentrações em ambas as densidades estudadas demonstrando um fator positivo destes filés pois, tal ácido graxo promove hipercolesterolemia⁴⁴. Teores elevados foram observados por Menezes et al.⁴¹ e por Omena et al.³².

Os ácidos graxos monoinsaturados foram mais abundantes na menor densidade (52,9), particularmente o palmitoléico e oléico na densidade de 75peixes/m³, sendo esse último considerado importante sob o ponto de vista nutricional devido aos seus efeitos benéficos citados na revisão de Lira et al.⁴². Omena et al.³² detectaram valores inferiores em

tilápias alimentadas com rações contendo diferentes níveis de farelo de coco. Os ácidos graxos monoinsaturados têm efeito hipocolesterolêmico intermediário⁴⁵.

Quanto aos ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), os níveis de ácido α -linolênico (C18:3 ω -3) detectados em ambas as densidades foram mais elevados que os encontrados por Omena et al.³² em tilápias alimentadas com rações contendo diferentes níveis de farelo de coco. O (C18:3 ω -3) é importante na modulação do metabolismo do ácido araquidônico (C20:4 ω -6), com conseqüente redução da agregação plaquetária⁴⁶.

Levando em consideração os benefícios conhecidos à saúde humana atribuída à ingestão de ácido eicosapentaenóico (20:5n-3, EPA) e o DHA (Ácido docosahexaenóico), determinou-se a soma desses dois ácidos visando uma avaliação da qualidade nutricional das espécies estudadas. SU et al.⁴⁷, relataram que os ácidos graxos poli-insaturados da família ômega-3 (EPA e DHA), além de serem eficazes na prevenção de doenças coronarianas, tem apresentado bons resultados no tratamento de pessoas com distúrbios depressivos e psíquicos. O somatório de EPA e DHA encontrado para as densidades estudadas foram na faixa de 4,06% a 6,85% com destaque para a densidade de 50peixes/m³. Valor superior foi detectado por Menezes et al.⁴¹ em tainha da Lagoa Mundaú (10,47).

A qualidade nutricional do perfil lipídico avaliada por diferentes índices encontra-se descrita na Tabela 8. Alimentos que apresentam a razão de ácidos graxos poli-insaturados e saturados (P/S) abaixo de 0,45 têm sido considerados como indesejáveis à dieta pelo Department of Health and Social Security⁴⁸, por sua potencialidade na indução do aumento de colesterol sanguíneo. Nas densidades estudadas esta razão variou de 1,15 na densidade de 125peixes/m³ e 11,76 na densidade de 100peixes/m³. Menezes et al.⁴¹ detectaram valores inferiores em peixes de água salgada, no entanto, o índice P/S avaliado isoladamente tem recebido restrições, uma vez que não considera os efeitos metabólicos dos ácidos graxos monoinsaturados⁴⁶.

Considerando a razão n-6/n-3, valores abaixo de 4,0 sugerem quantidades desejáveis à dieta para a prevenção de riscos cardiovasculares⁴⁸. A relação n-6/n-3 encontrado nesta pesquisa ficou acima do preconizado pela literatura, os resultados encontrados promovem as densidades estudadas à categoria de potencialmente saudáveis destacando-se a de 100peixes/m³. A razão n-6/n-3 observada no presente estudo é inferior a de outras espécies de água doce relatadas por Moreira et al.⁴⁹

Tabela 7. Perfil dos ácidos graxos presentes nos filés de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1857) em diferentes densidades de estocagem, valores expressos em porcentagem de área relativa

Tipos de Ácidos Graxos	Teores (% por área) – Densidades de Estocagem*			
	50	75	100	125
A. Saturados				
C12:0	0,54 ± 0,04 ^a	0,97 ± 0,86 ^a	0,78 ± 0,13 ^a	0,40 ± 0,18 ^a
C14:0	2,04 ± 0,35 ^a	0,46 ± 0,26 ^b	0,87 ± 0,13 ^b	1,09 ± 0,06 ^b
C15:0	0,99 ± 0,12 ^a	0,38 ± 0,21 ^b	0,32 ± 0,06 ^b	0,62 ± 0,06 ^a
C16:0	2,31 ± 1,56 ^a	1,50 ± 1,25 ^a	1,63 ± 0,14 ^a	2,04 ± 0,05 ^a
C17:0	0,19 ± 0,08 ^a	1,13 ± 0,45 ^a	1,35 ± 0,09 ^a	0,85 ± 0,98 ^a
C18:0	14,66 ± 0,16 ^a	10,22 ± 1,24 ^a	0,36 ± 0,11 ^a	16,28 ± 1,13 ^a
C20:0	0,52 ± 0,04 ^a	1,76 ± 0,95 ^a	1,10 ± 0,18 ^a	0,62 ± 0,06 ^a
Total	21,25	15,18	6,41	21,9
B. Monoinsaturados				
C14:1 n-7	0,45 ± 0,1 ^a	1,86 ± 0,22 ^b	2,01 ± 0,47 ^b	0,28 ± 0,11 ^a
C16:1 n-7	24,76 ± 6,16 ^a	27,71 ± 0,47 ^a	3,44 ± 0,49 ^b	20,91 ± 1,84 ^a
C17:1 n-7	0,48 ± 0,08 ^a	0,27 ± 0,02 ^a	1,08 ± 0,17 ^b	0,43 ± 0,08 ^a
C18:1 n-9	21,62 ± 0,13 ^a	16,98 ± 3,69 ^a	13,45 ± 1,03 ^a	19,60 ± 0,45 ^a
C20:1 n-9	5,59 ± 0,04 ^a	2,31 ± 2,27 ^a	0,45 ± 0,11 ^b	6,39 ± 0,08 ^a
Total	52,9	48,58	20,43	47,61
C. Poli-insaturados				
C16:2 n-7	1,24 ± 0,04 ^a	21,65 ± 0,74 ^b	27,93 ± 0,12 ^c	21,13 ± 0,3 ^b
C18:2 n-6	5,44 ± 0,08 ^a	17,04 ± 2,69 ^b	22,81 ± 1,92 ^b	5,71 ± 0,47 ^a
C18:3 n-3	5,86 ± 0,65 ^a	6,54 ± 2,08 ^a	6,45 ± 1,22 ^a	7,09 ± 0,42 ^a
C18:4 n-3	0,87 ± 0,24 ^a	8,10 ± 0,47 ^b	5,19 ± 1,92 ^b	1,11 ± 0,02 ^a
C20:2 n-6	0,90 ± 0,04 ^a	6,13 ± 0,56 ^b	5,57 ± 0,76 ^b	0,75 ± 0,04 ^a
C20:3 n-3	2,21 ± 0,36 ^a	0,95 ± 0,19 ^b	0,69 ± 0,16 ^b	2,02 ± 0,05 ^a
C20:4 n-6	0,38 ± 0,13 ^a	1,96 ± 0,32 ^a	1,14 ± 0,06 ^b	0,27 ± 0,03 ^a
C20:5 EPA n-3	0,87 ± 0,04 ^a	0,70 ± 0,19 ^a	0,63 ± 0,11 ^a	0,89 ± 0,03 ^a
C22:5 n-3	1,23 ± 0,21 ^a	0,89 ± 0,05 ^a	1,01 ± 0,02 ^a	0,83 ± 0,08 ^a
C22:6 n-3 DHA	5,98 ± 0,76 ^a	4,32 ± 0,47 ^a	3,97 ± 1,09 ^a	5,47 ± 0,04 ^a
Total	24,98	68,28	75,39	25,27
I/S	3,66	7,7	14,95	3,33
M/S	2,49	3,2	3,19	2,17
P/S	1,18	4,5	11,76	1,15
Razão n-6/n-3	1,22	2,12	3,13	1,34
Somatório de EPA + DHA	6,85	5,02	4,60	6,36
Rel. Hiper/Hipo*****	0,06	0,03	0,03	0,05

*Analisadas 36 amostras em duplicata por densidade, com a média e o desvio-padrão.

Valores na mesma linha com letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste *Post-hoc* de Tukey-HSD. I/S = Insaturados/Saturados; M/S = Monoinsaturados/Saturados; P/S = Poli-insaturados/Saturados; Rel. Hiper/Hipo***** = Relação ácido graxo hipercolesterolêmico / hipocolesterolêmico = ácido graxo hipercolesterolêmico (C14:0 + C12:0 + C16:0) / ácido graxo hipocolesterolêmico (monoinsaturado + poli-insaturados).

Tabela 8. Índices de qualidade nutricional da fração lipídica nos filés de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1857) em diferentes densidades de estocagem

Densidades de Estocagem	P/S	n-6/n-3	HH	IA	IT
50 peixes/m ³	1,18	1,22	9,51	0,15	0,30
75 peixes/m ³	4,50	2,12	24,71	0,04	0,14
100 peixes/m ³	11,76	3,13	19,78	0,09	0,05
125 peixes/m ³	1,15	1,34	12,73	0,10	0,31

P/S = Poli-insaturados/Saturados; n-6/n-3 = Σ da série Ômega 6 / Σ a série Ômega 3; HH = Σ hipocolesterolêmicos / Σ hipercolesterolêmicos; IA = índice de aterogenicidade e IT = índice de trombogenicidade¹².

variação de 1,14 a 8,79. Menezes et al.⁴¹ encontraram em peixes de água salgada uma variação de 0,43 e 0,66.

O cálculo da razão Σ ácidos graxos hipocolesterolêmicos / Σ ácidos graxos hipercolesterolêmicos, índice (HH) relacionado mais especificamente com o metabolismo do colesterol, resultou em valores elevados destacando-se 24,71 na densidade de 75peixes/m³(Tabela 8). Testi et al.⁵⁰ encontraram valores entre 2,03 a 2,46 pra peixes de água doce ou salgada. Menezes et al.⁴¹ detectaram valores inferiores para peixes de água salgada. Valores altos para essa relação são desejáveis sob o ponto vista nutricional⁴⁹.

O índice de aterogenicidade (IA), que relaciona os ácidos pró e antiaterogênicos foi encontrado em baixa concentração em ambas as densidades (Tabela 8). Valores maiores foram descritos por Ramos et al.⁵¹ para quatro espécies de água doce variando de 0,49 no pintado e 0,86 para o pacu. Em contraste à relação HH, valores mais baixos para IA são desejáveis.

Dentre as considerações para avaliação da qualidade dietética de alimentos é incluída a razão n-6/n-3 menor que 10⁴⁹. Ambas as densidades possuem conteúdo recomendado para a razão n-6/n-3.

CONCLUSÃO

Tendo como base os resultados obtidos, nas condições em que os experimentos foram realizados, pode-se concluir que: O aumento da densidade de estocagem influenciou no crescimento dos peixes, sendo que o número de 50peixes/m³ proporcionou maior valor de rendimento de filé. A densidade de 125peixes/

m³ apresentou teores mais elevados de proteínas, lipídeos totais, cinzas, calorias e quando comparada a outras densidades. Os teores de colesterol para ambas as densidades estão abaixo do limite recomendado de 300mg/dia para dieta humana. Os principais ácidos graxos encontrados em destaque foram: saturados (palmítico e esteárico) na densidade de 50peixes/m³, monoinsaturados (palmitoléico) na densidade de 75peixes/m³ e (oléico) na menor densidade. Já em relação aos ácidos graxos poli-insaturados da família n-6 (linoléico) na densidade de 100peixes/m³ e n-3 (-linolênico) e (EPA) na densidade de 125peixes/m³ e (DHA) na menor densidade de estocagem. Os filés apresentam-se como fonte de ácidos graxos hipocolesterolêmicos e a razão encontrada entre os ácidos graxos n-6:n-3 estão dentro dos padrões recomendados. Os dados contidos neste estudo são muito importantes no ponto de vista nutricional e econômico e poderão contribuir para difundir o consumo de tainha para adultos, gestantes e crianças devido ao seu valor biológico e a presença de EPA e DHA. Esperamos que estes resultados contribuam para bancos de dados que auxiliarão na melhor estimativa de consumo de nutrientes em inqueritos dietéticos.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro e a Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba (Codevasf) pela doação dos peixes.

REFERÊNCIAS

1. Meurer F, Hayashi C, Boscolo WR. Influência do Processamento da Ração no Desempenho e Sobrevivência da Tilápia do Nilo Durante a Reversão Sexual. *R. Bras. Zootec.* 2003; 32(2): 262-7.
2. Brandão FR, Gomes LC, Chagas EC, Araújo LD. Densidade de estocagem de juvenis de tambaqui durante a recria em tanques-rede. *Pesq. Agropec. Brás.* 2004; (39/4): 357-62.
3. Jobling M. *Fish Bioenergetics*. London: Chapman e Hall, 1994. 294p.
4. Gomes LC, Baldisserotto B, Senhorini JA. Effect of stocking density on water quality, survival, and growth of larvae of matrinxã, *Brycon cephalus* (Characidae), in ponds. *Aquaculture* 2000; (183): 73-81.
5. El-Sayed A. Effects of stocking density and feeding levels on growth and feed efficiency of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) fry. *Aquaculture Research* 2002; (33): 621-6.
6. Iguchi K, Ogawa K, Nagae M, Ito F. The influence of rearing density on stress response and disease susceptibility of ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Aquaculture* 2003; (202): 515-23.
7. Cavero BAS, Pereira-Filho M, Roubach R, Ituassú DR, Gandra AL, Crescêncio R. Efeito da densidade de estocagem na homogeneidade do crescimento de juvenis de pirarucu em ambiente confinado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 2003; (38): 103-07.
8. Campos-Ramos R, Harvey SC, McAndrew BJ. An investigation of sex determination in the Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*, using synaptonemal complex analysis, fish, sex reversal and gynogenesis. *Aquaculture* 2003; (221):125-40.
9. Desprez D, Géraz E, Hoareau MC *et al.* Production of a high percentage of male offspring with a natural androgen, 11b-hydroxyandrostenedione (11bOHA4), in Florida red tilapia. *Aquaculture* 2003; (216): 55-65.
10. Meurer F, Hayashi C, Boscolo WR *et al.* Lipídeos na alimentação de alevinos revertidos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.). *Revista Brasileira de Zootecnia* 2002; (31/2): 566-73.
11. Boscolo WR, Hayashi C, Soares CM. Desempenho e características de carcaça de machos revertidos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagens tailandesa e comum, nas fases iniciais e de crescimento. *Revista Brasileira de Zootecnia* 2001; (30/5): 1391-6.
12. Vila Nova CMVM, Godoy HT, Aldrigue ML. Composição química, teor de colesterol e caracterização dos lipídios totais de tilápia (*Oreochromis niloticus*) e pargo (*Lutjanus purpureus*). *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 2005; (25/3): 430-6.
13. Roos NM, Siebelink E, Botts ML, Van Tol A, Schouten EG, Katan MB. Trans monounsaturated fatty acids and saturated fatty acids have similar effects on postprandial flow-mediated vasodilation. *Eur J Clin Nutr Basingstoke*. 2002;56(7):674-9.
14. Lima MF, Henriques CA, Santos FD, Andradre PMM, Tavares do Carmo MG. Ácido graxo ômega 3 docosahexaenóico (DHA:C22:6 n-3) e desenvolvimento neonatal: aspectos relacionados à sua essencialidade e suplementação. *Nutrire: Rev Soc Bras Alim Nutr = J Brazilian Soc Food Nutr*. 2004; 28: 65-77.
15. Ramos Filho MM, Ramos MIL, Hiane PA, Souza EMT. Perfil lipídico de quatro espécies de peixes da região pantaneira de Mato Grosso do Sul. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 2008; (28/2): 361-5.
16. Gomes LC, Chippari-Gomes AR, Lopes NP, Roubach R, Araújo-Lima CARM. Efficacy of benzocaine as anesthetic for tambaqui juveniles (*Colossoma macropomum*). *Journal of the World Aquaculture Society* 2001; (31): 426-31.
17. Association of official analytical chemists (AOAC). Horwitz, Washington. *Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists*. 17 ed. Arlington: AOAC Inc., 2000.
18. Watt B, Merrill AL. *Composition of foods: raw, processed, prepared*. Washington DC: Consumer and Food Economics Research. Division/Agricultural Service, 1963.
19. Folch J, Lees M, Sloane SGH. A simple method for the isolation and purification of total lipide from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, 1957; (226): 497-509.
20. Bohac CE, Rhee KS, Cross HR, Ono K. Assesment of methodologies for colorimetric cholesterol assay of meats. *J. Food Sci.* 1988; (53): 1642-4.
21. Searcy RL, Bergquist LMA. New color reaction for the quantitation of serum cholesterol. *Clin. Chimica Acta.*, 1960; (5): 192-9.
22. Hartman L, Lago BCA. Rapid preparation of fatty methyl esters from lipids. *Lab Pract.* 1973; (22): 475-7.
23. Ulbricht TLV, Southgate DAT. Coronary heart disease: seven dietary factors. *Lancet* 1991; (338/8773): 985-92.
24. Santos-Silva J, Bessa RJB, Santos-Silva F. Effect of genotype, feeding system and slaughter weight on the quality of light lambs. II. Fatty acid composition of meat. *Livestock Production Science* 2002; (7723): 187-94.
25. Kubitz F. *Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial*. Jundiaí: Fernando Kubitz, 2000.
26. Silva PC, Kronka SN, Tavares LHS, Souza VL. Desempenho produtivo da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) em diferentes densidades e trocas de água em "raceway". *Acta Scientiarum*, 2002; (24/4):935-41.
27. Sampaio JMC, Braga LGT. Cultivo de tilápia em tanques-rede na barragem do Ribeirão de Saloméa – Floresta Azul – Bahia. *Rev. Bras. Saúde Prod. Na.* 2005; (6/2): 42-52.
28. Ogawa M, Maia EL. *Manual de Pesca: Ciência e Tecnologia do Pescado*. 1999; São Paulo: Varela; (1), 430p.
29. Lichtenstein AH, Mitch WE, Mullis R, Robinson K, Tosett JW, Jeor SS, Suttie J, Tribble DL, Bazzarre TL. Dietary guidelines: revision 2000: a statement for healthcare professionals from the nutrition committee of the American heart Association. *Circulation* 2000; (102/18): 2284-99.
30. Kirk RS, Sawyer R. *Pearson's composition and analysis of foods*. 9th, ed. Harlow Essex, Longman; 1981; 504-18.
31. Penfield MP, Campbell AM. *Experimental Food Science*. 3. ed. San Diego: Academic Press, 1990.
32. Omena, CMB. Reflexo da utilização de farlo de côo na alimentação de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1857). [Dissertação de Mestrado] Maceió, Alagoas: Universidade Federal de Alagoas. 2008. 95 p.
33. Bruschi FLF. *Rendimento, composição centesimal e perfil de ácidos graxos de pescados e seus resíduos monografia [Graduação em Oceanografia]*. Itajaí, Santa Catarina. Centro de Ciências Tecnológicas da Terra e do Mar, Universidade do Vale do Itajaí. 2001. 134p.
34. Morais C. *Rendimento cárneo e composição química da ictiofauna acompanhante na captura do camarão-sete-barbas (Xiphopenaeus kroyeri Heller, 1862)*. *Colet. ITAL.*, v.22, n.1, p.6-72, 1992.
35. Minozzo MG. *Elaboração de patê cremoso a partir de filé de tilápia do Nilo (Oreochromis niloticus) e sua caracterização físico-química microbiológica e sensorial*. [Dissertação de Mestrado]. Curitiba, Paraná: Universidade Federal do Paraná, 2005. 127pp.

36. Stansby ME. Polynsaturates and fat in fish flesh. *J. Am. Diet. Ass.*,1973; (63): 625-30.
37. Ferreira MW, Bressan MC, Souza XR, Vieira JO, Faria PB, Andrade PL. Efeito dos métodos de cocção sobre a composição química e perfil lipídico de filés de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1757). *Ciênc. Agrotec.*, 2007; (31/3): 798-803.
38. Luzia LA, Sampaio GR, Castellucci CMN, Torres EAFS. The influence of season on the lipid profiles of five commercially important species of Brazilian fish. *Food Chemistry* 2003; (83): 93-7.
39. Denke MA, Grundy SM. Effects of fats hing in stearic acid on lipid and lipoprotein concentrations in men. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1991; (54):1036-40.
40. Nova, CMVMV, Godoy HT, Aldrigue ML. Composição química, teor de colesterol e caracterização dos lipídeos totais de tilápia (*Oreochromis niloticus*) e pargo (*Lutjanus purpureus*). *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 2005; (25/3): 45-9.
41. Menezes MES. Valor nutricional de espécies de peixes (água salgada e estuário) do estado de Alagoas. [Dissertação de Mestrado]. Maceió, Alagoas: Universidade Federal de Alagoas, 2006. 113.
42. Lira GM, Mancini Filho J, Torres RP, Oliveira AC, Vasconcelos AMA, Omena CMB, Almeida MCS. Composição centesimal, valor calórico, teor de colesterol e perfil de ácidos graxos da carne de búfalo (*Bubalis bubalis*) da cidade de São Luiz do Quitunde-AL. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2005; 64(1): 31-8.
43. Sabarense CM. Avaliação do efeito dos ácidos graxos *trans* sobre o perfil dos lipídeos teciduais de ratos que consumiram diferentes teores de ácidos graxos essenciais [Tese de Doutorado]. São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2003. 130 pp.
44. Nova CMVMV, Godoy HT, Aldrigue ML. Composição de ácidos graxos dos lipídeos totais de tilápia (*Oreochromis niloticus*) e pargo (*Lutjanus purpureus*). XVII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2004, Fortaleza: p.45.
45. Kris-Etherton P, Yu S. Individual fatty acids effects on plasma lipids and lipoproteins: human studies. *Am J Clin Nutr*. 1977; Supp. 1628-44.
46. Lira GM, Mancini Filho J, Santana LS, Torres R P, Oliveira AC, Omena CMB, Silva Neta ML. Perfil de ácidos graxos, composição centesimal e valor calórico de moluscos crus e cozidos com leite de coco da cidade de Maceió-AL. *Rev. Brasileira de Ciênc. Farmacêuticas* 2004; 40(4): 529-37.
47. Su K, Huang S, Chiu C, Shen WW. Omega-3 fatty acids in major depressive disorder. A preliminary double-blind, placebo-controlled trial. *European Neuropsychopharmacology*.2003;(1): 267-71.
48. Department os Health and Social Security. Diet and cardiovascular disease. Report on Health and Social Subjects, n.28. London:HMSO, 1984.
49. Moreira AB et al. Fatty acids profile and cholesterol contents of three brazilian *Brycon* freshwater fishes. *Journal of Food Composition and Analysis* 2001; 14(6):565-74.
50. Testi et al. Nutritional traits of dorsal and ventral fillets from three farmed fish species. *Food Chemistry* 2006; 98(1):104-11.
51. Ramos Filho MM, Ramos MIL, Hiane PA, Souza EMT. Perfil lipídico de quatro espécies de peixes da região pantaneira de Mato Grosso do Sul. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 2008; 28(2): 361-5.

Avaliação das condições higiênico-sanitárias em serviços de alimentação

Evaluation of the hygienic-sanitary conditions in food services

RIALA6/1236

Naira POERNER^{1*}, Eliseu RODRIGUES¹, Antônio Lauri PALHANO², Ângela Maria FIORENTINI³

*Endereço para correspondência: Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, caixa postal 6121, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brasil. Tel: 55 19 32890298
e-mail: nairapoernersa@gmail.com

¹Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP
Campinas, SP, Brasil.

²Departamento de Biologia e Química, Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul - UNIJUI, Santa Rosa, RS, Brasil.

RESUMO

Este trabalho apresenta o diagnóstico das condições higiênico-sanitárias dos serviços de alimentação do município de Santa Rosa, RS. Em cada estabelecimento foi aplicado um *checklist* (lista de verificação) constituído de cinco requisitos fundamentais para a manipulação higiênica dos alimentos. Além disso, foram realizadas análises microbiológicas do ambiente, equipamentos, utensílios e nos manipuladores de alimentos. A avaliação do *checklist* mostrou que 36% dos itens não estavam em conformidade com a legislação vigente. As análises microbiológicas do ar em dois ambientes demonstraram elevadas contagens de fungos e leveduras e de micro-organismos aeróbios mesófilos. Os equipamentos e utensílios avaliados apresentaram resultados semelhantes, sendo que 100% e 86% das amostras apresentaram, respectivamente, contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos e de coliformes totais acima dos padrões estabelecidos pela *American Public Health Association* (APHA), os quais indicam condições higiênicas insatisfatórias. Na avaliação dos manipuladores foram previamente definidas as faixas de contagens para coliformes totais, sendo que 57,1% das amostras apresentaram valores entre 10.001 a 100.000 UFC/mão, a maior faixa de contagem observada, o que indica ineficiência nos procedimentos de higiene pessoal. Assim, os serviços de alimentação de Santa Rosa (RS) apresentam condições higiênico-sanitárias insatisfatórias, que podem colocar em risco os consumidores que frequentam tais estabelecimentos.

Palavras-chave. serviços de alimentação; *checklist*; condições higiênico sanitárias.

ABSTRACT

A diagnosis on hygienic-sanitary conditions in food services located at municipality of Santa Rosa, RS was performed in the present study. A checklist (verification list) including five fundamental requisites for hygienic food manipulation was applied on each establishment. In addition, the microbiological analyses were carried out in the environment, equipments, utensils and food manipulators. The assessment of checklist showed that 36% of items were not in compliance with the current legislation. Microbiological analysis of the air from two environments showed a high counts for molds and yeasts and mesophilic aerobics microorganisms. Equipments and utensils evaluated showed similar results, with 100% and 86% of samples resulted in mesophilic aerobics microorganisms and total coliforms counts above the standard limits established by the American Public Health Association (APHA), which indicate unsatisfactory hygienic conditions. For assessing the food manipulator, the ranges for total coliforms counting were previous established, and in the present analysis, 57.1% of samples presented values ranging from 10.001 to 100.000 cfu per hand, which were the highest range of counting observed in this study. These findings indicate the inefficiency on the personal hygiene procedures. Thus, the food services at Santa Rosa (RS) showed the unsatisfactory hygienic-sanitary conditions, bringing at risk the persons who frequent these food establishments.

Key words. food services; checklist; hygienic-sanitary conditions.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento econômico e as necessidades de se enquadrar no mercado atual trouxeram mudanças no perfil alimentar da comunidade. Esta mudança é percebida pelo aumento da procura pelos serviços de alimentação, os quais atendem a preferência dos consumidores que procuram refeições convenientes no que se refere à facilidade de aquisição e preparo ou consumo fora do domicílio¹. Segundo a Associação Brasileira de Bares e Restaurantes (Abrasel) o hábito de alimentação fora de casa é crescente e corresponde a, aproximadamente, 25% dos gastos dos brasileiros com alimentos². Esta linha de crescimento é diagnosticada pela Associação Brasileira de Refeições Coletivas (ABERC), a qual registrou que o mercado de refeições coletivas forneceu 8,3 milhões de refeições por dia em 2008 representando um valor de 9,5 bilhões de reais por ano³.

Com frequência pessoas especialmente vulneráveis utilizam estes serviços, como crianças, anciãos e doentes com deficiência imunológica. Aliado a este fator, sabe-se que as operações dos serviços de comidas em larga escala são especialmente perigosas em função da forma em que os alimentos devem ser armazenados e manipulados^{4,5,6}. Segundo dados epidemiológicos, grande número de epidemias associadas ao consumo de alimentos contaminados são causadas por alimentos preparados para a alimentação coletiva. De acordo com dados do Sistema de Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos (VE-DTA), 18,8% dos surtos de origem alimentar ocorreram em restaurantes, abrangendo todo o país, no período de 1999 a 2004⁷.

Esta realidade indica a necessidade de os serviços de alimentação implantarem a RDC nº 216 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)⁸, a qual prevê a aplicação das Boas Práticas de Fabricação (BPF) nestes estabelecimentos a fim de garantir as condições higiênico-sanitárias do alimento preparado⁸. A qualidade da matéria-prima, a arquitetura dos equipamentos e das instalações, as condições higiênicas do ambiente de trabalho, as técnicas de manipulação dos alimentos, a saúde dos funcionários são fatores importantes a serem considerados na produção de alimentos seguros e de qualidade⁹.

Considerando a necessidade de aplicação das BPF nos serviços de alimentação com a finalidade de minimizar os riscos associados à manipulação de alimentos em grande escala, este trabalho teve como objetivo avaliar as

condições higiênico-sanitárias dos serviços de alimentação situados no município de Santa Rosa, RS.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

A partir dos dados da Vigilância Sanitária do município de Santa Rosa (RS) verificou-se o cadastro de 20 estabelecimentos designados como serviços de alimentação, incluindo restaurantes e pizzarias, em um total de 18 estabelecimentos em funcionamento. Realizou-se o processo de amostragem estratificada utilizando-se um espaço amostral de sete estabelecimentos, sendo cinco restaurantes (codificadas como 1, 3, 4, 5 e 7) e duas pizzarias (codificadas como 2 e 6).

Lista de verificação

Aplicou-se uma lista de verificação elaborada a partir da lista de verificação descrita na RDC nº 275 de 21 de outubro de 2002 da ANVISA¹⁰ e a partir da legislação específica para serviços de alimentação, a RDC nº 216 de 14 de setembro de 2004 da ANVISA⁸. A lista de verificação é composta de cinco requisitos com 114 itens: requisitos gerais do estabelecimento (55), requisitos de higiene dos estabelecimentos (24), higiene pessoal e requisito sanitário (13), requisitos de higiene na produção (10), e requisitos da área de exposição dos alimentos (12).

Análises microbiológicas

Em cada serviço de alimentação foram coletadas amostras do ambiente em dois locais – um na área de manipulação e outro na área de exposição dos alimentos; amostras dos equipamentos – uma mesa na área de manipulação; amostras dos utensílios – um garfo exposto no bufê; e amostras de um manipulador. Todas as amostras, após a coleta, foram analisadas em duplicata e transportadas sob refrigeração ao laboratório para a realização das análises microbiológicas.

As amostras do ar do ambiente foram analisadas pela técnica de sedimentação simples¹¹. Placas de Petri contendo meios de cultura foram expostas, por 15 minutos, na área de manipulação e na área de exposição dos alimentos. Utilizou-se o ágar para contagem total (ACT) para a determinação do número de micro-organismos aeróbios mesófilos e ágar batata dextrose (BDA) para contagem de fungos filamentosos e leveduras. As placas de ACT foram incubadas a 35 °C, por 48 horas e as placas de BDA foram incubadas a 25 °C, por 72 horas¹¹.

A amostra dos equipamentos foi coletada na superfície de uma mesa na área de manipulação; a amostra dos utensílios foi representada por um garfo exposto no bufê; também foi coletada amostra das mãos de um manipulador. A técnica do *swab*¹¹ foi empregada na coleta das amostras dos equipamentos, utensílios e manipuladores. As amostras dos equipamentos e utensílios foram analisadas pela técnica de profundidade em ACT para a determinação do número de micro-organismos aeróbios mesófilos e analisadas pela técnica de superfície em ágar vermelho violeta bile (VRB) para contagem de coliformes totais. Para as duas análises as placas foram incubadas a 35 °C, por 48 horas¹¹.

As amostras dos manipuladores foram analisadas pela técnica de superfície em VRB e pela técnica de semeadura em superfície em ágar Baird-Parker (BPA), para contagem de estafilococos coagulase positiva. Para as duas análises as placas foram incubadas a 35 °C, por 48 horas¹¹. Nas placas em que havia colônias negras circundadas por um halo de clarificação foi realizado o teste coagulase.

Os resultados foram comparados com as recomendações e especificações estabelecidas pela *American Public Health Association* (APHA)¹¹. Na avaliação das mãos dos manipuladores, devido à inexistência de padrões para contagem microbiana, foram estabelecidas faixas de contagens para servir de orientação na definição das condições higiênico-sanitárias. Portanto, foram determinadas faixas de contagens de acordo com Andrade et al.¹⁷, sendo estas: até 100; entre 101 e 1.000; entre 1.001 e 10.000; entre 10.001 e 100.000, expressas em UFC/mão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atendimento aos requisitos de boas práticas de fabricação

Na Figura 1 é apresentada a porcentagem de conformidades dos cinco principais itens avaliados por meio da aplicação da lista de verificação nos serviços de alimentação. Constatou-se que 64% dos itens estavam em conformidade com a legislação.

O item requisitos gerais do estabelecimento apresentou a menor porcentagem de conformidades, apenas 61% (Figura 1). Neste item, o requisito lavatórios na área de produção apresentou 21% de conformidade, pois apenas três estabelecimentos possuíam lavatórios exclusivos para a higiene das mãos na área de manipulação.

Apesar destes estabelecimentos possuírem lavatórios, os mesmos não apresentavam o material necessário para realizar a higienização correta das mãos, como exigido pela legislação⁸, o que compromete a limpeza adequada das mãos ou causa a sua recontaminação durante a secagem em “panos de prato”. Outro requisito importante refere-se ao abastecimento de água, em que todos os estabelecimentos apresentaram o sistema de abastecimento de água ligado à rede pública. No entanto, quatro estabelecimentos não apresentavam reservatório de água, fator este preocupante considerando que pode ocorrer falhas no abastecimento de água pela rede pública o que pode levar à ocorrência de contaminações de difícil controle.

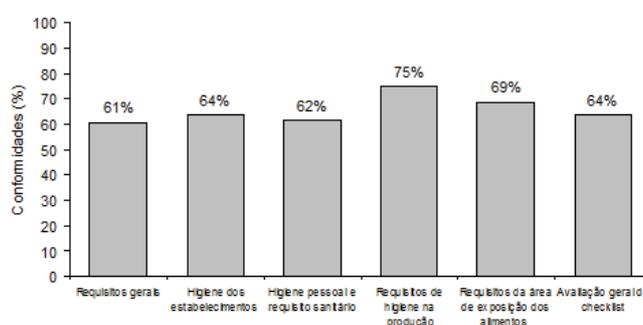


Figura 1. Porcentagem de conformidades dos cinco requisitos avaliados no checklist, de 7 estabelecimentos do município de Santa Rosa, RS, 2006.

Quanto ao fluxo de produção, quatro estabelecimentos não apresentavam locais de pré-preparo, isolados da área de preparo por barreira física ou técnica. Também não havia um fluxo de produção ordenado e sem cruzamentos, resultados estes preocupantes. O *Codex Alimentarius* descreve a necessidade de prédios e instalações serem projetados de maneira a permitir a separação, por meio de divisões, localização ou outros meios eficazes, entre os diferentes tipos de operações que possam levar à contaminações cruzadas, que são consideradas uma das principais causas da ocorrência de doenças de origem alimentar⁶. Outro fator agravante foi a inexistência da aplicação de procedimentos de higienização corretos dos equipamentos. Durante as visitas aos estabelecimentos constatou-se a manipulação de produtos crus e produtos prontos na mesma mesa, a qual não passava por um processo de higienização entre estes dois processos. Souza et al.¹² também observaram,

ao realizarem a aplicação de uma lista de verificação em uma Unidade de Alimentação e Nutrição hoteleira, a utilização das mesmas facas e tábuas em diversos tipos de preparações. Similarmente, Panza et al.¹³ verificaram o emprego da mesma faca para o corte de carnes e verduras, sem a realização do processo de higienização entre o uso, em um restaurante universitário o que leva a ocorrência de contaminação cruzada.

O item requisitos de higiene dos estabelecimentos apresentou 64% de conformidade (Figura 1), entretanto observou-se o emprego de procedimentos inadequados de higienização das instalações, equipamentos, móveis e utensílios considerando que nenhum dos estabelecimentos segue as instruções do fabricante no que se refere à diluição dos produtos de higienização, tempo de contato e modo de uso. De acordo com Giova e Silva Jr.⁵ as superfícies e os demais ambientes de contato com os alimentos devem ser limpos e desinfetados com a finalidade de contribuir para o controle microbiano. Apesar disso, nos estabelecimentos não foi verificada a realização da desinfecção dos equipamentos com exceção de um dos estabelecimentos que utiliza água sanitária pura, sem diluição. Este procedimento, no entanto, também é incorreto considerando que um dos fatores que influenciam a eficácia dos desinfetantes é a sua concentração⁵. Dados semelhantes foram encontrados por Genta et al.¹⁴ ao avaliarem seis restaurantes do tipo *self-service* no município de Maringá, no estado do Paraná. Esses autores relataram que dentre os restaurantes, cinco não realizavam a etapa de desinfecção de instalações, equipamentos e utensílios, e um deles utilizava produtos de limpeza sem registro no Ministério da Saúde.

Quanto ao aos itens higiene pessoal e requisito sanitário foi verificado que os manipuladores de cinco estabelecimentos não estavam com o vestuário necessário, e alguns não utilizavam calçados fechados. No item asseio pessoal dos manipuladores constatou-se 86% de não conformidades. Foi observado manipuladores com adornos como anéis e brincos, unhas compridas e lesões visíveis nos dedos. Oliveira et al.¹⁵ avaliaram cozinhas de 5 creches públicas e filantrópicas no município de São Paulo e constataram 37,5% de inadequações quanto ao item higiene dos manipuladores e 6,2% de inadequação no item saúde dos manipuladores, que manipulavam os alimentos com cortes ou lesões na mãos. De acordo com a literatura e a legislação pertinente, toda pessoa que tenha um corte ou ferimento na pele deve deixar de

participar do processamento de alimentos, considerando que feridas de pele supuradas estão normalmente infectadas por *Staphylococcus* ou *Streptococcus*, portanto podem ser transferidas aos alimentos durante a manipulação^{6,8,16}.

O item requisitos de higiene na produção apresentou a maior porcentagem de conformidades, 75% (Figura 1). Apesar disso, os estabelecimentos não realizavam o controle da temperatura nas etapas de recepção e armazenamento das matérias-primas e ingredientes que necessitam de condições especiais de conservação. Verificou-se, também, que quatro estabelecimentos realizavam as operações de recepção da matéria-prima na própria área de manipulação dos alimentos em função das características físicas dos prédios, que não apresentavam uma entrada lateral a fim de evitar a contaminação do alimento preparado com a matéria-prima e com o pessoal que vem trazê-la.

O item área de exposição dos alimentos apresentou porcentagem de não conformidades considerável nos parâmetros referentes ao piso (29%), tetos (57%), paredes e divisórias (43%) associado, principalmente, a fatores como estética. Alguns estabelecimentos apresentavam tetos em cor escura, revestimento das paredes com material permeável, presença de lonas na decoração, as quais propiciam o acúmulo de poeira.

Quanto aos equipamentos de exposição dos alimentos foram avaliadas, nas pizzarias, as bandejas nas quais as pizzas eram servidas. Nas duas pizzarias as bandejas utilizadas eram de madeira. Diversos autores e as normas do *Codex Alimentarius* deixam claro que se deve evitar o uso de qualquer equipamento ou utensílio de madeira. A madeira é bastante absorvente e difícil de manter higiênica, ficando marcada, riscada e rachada durante o uso normal, o que leva ao acúmulo de bactérias prejudiciais à saúde, associadas a casos e surtos de intoxicação e contaminações cruzadas. Entre os materiais mais apropriados estão o aço inoxidável, os materiais sintéticos e os derivados de borracha^{5,6,9}.

De acordo com a legislação⁸, os alimentos preparados após serem submetidos à cocção devem ser mantidos em condições de tempo e temperatura que não favoreçam a multiplicação microbiana. Para a conservação a quente, os alimentos devem ser submetidos à temperatura superior a 60 °C por, no máximo, seis horas. Dentre os estabelecimentos avaliados apenas um não apresentou a temperatura ideal da água do equipamento de exposição dos alimentos.

Análises microbiológicas

Na Tabela 1 estão demonstrados os resultados das análises microbiológicas da microbiota do ar em dois ambientes: na área de manipulação dos alimentos (cozinha) e na área de exposição dos alimentos (bufê) nos sete serviços de alimentação. De acordo com as recomendações da APHA¹¹, que estabelece uma contagem máxima de 30 UFC/cm²/semana para micro-organismos aeróbios mesófilos, os ambientes de todas as cozinhas estavam em condições higiênicas insatisfatórias. Considerando esta mesma recomendação são encontrados resultados similares para fungos e leveduras. Em trabalho desenvolvido por Andrade et al.¹⁷, que avaliaram 12 restaurantes industriais localizados em Minas Gerais apenas 18,5% e 32,28% dos ambientes encontravam-se de acordo com os padrões para micro-organismos aeróbios mesófilos e contagem de fungos e leveduras, respectivamente.

Constatou-se que o grau de contaminação do ar na área da cozinha é semelhante ao da área do bufê (Tabela 1). Assim, todos os ambientes em que os alimentos são expostos estavam em condições higiênicas insatisfatórias quanto ao número de micro-organismos aeróbios mesófilos e fungos e leveduras.

As amostras coletadas nas superfícies das mesas em todos os estabelecimentos apresentaram contagens de micro-organismos aeróbios mesófilos e de coliformes totais acima do recomendado pela APHA¹¹, de 2 UFC/cm²

de superfície (Tabela 2). Dessa forma, as mesas em que os alimentos eram manipulados apresentavam condições higiênicas insatisfatórias considerando que a coleta das amostras foi realizada no início do trabalho, ou seja, quando as mesas estavam higienizadas. O autor Silva Jr.⁹ traz como valor de referência um máximo de 50 UFC/cm². Considerando este valor como parâmetro, 86% e 100% dos estabelecimentos apresentam contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos e de coliformes totais acima deste valor, respectivamente. A higienização correta das superfícies em que os alimentos são manipulados é de extrema importância para a redução dos riscos de contaminação cruzada¹⁸.

Uma amostra de utensílio (garfo) considerado higienizado também foi avaliada. Nos restaurantes estes estavam dispostos no bufê, enquanto que nas pizzarias os mesmos se encontravam nas mesas. Neste caso os valores recomendados pela APHA¹¹ são os mesmos encontrados em bibliografias brasileiras que corresponde a 100 UFC/unidade. Apenas o estabelecimento codificado com o número 2 apresentou o garfo em condições higiênicas adequadas, representando 14% dos estabelecimentos que atenderam ao padrão recomendado para a contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos e de fungos e leveduras (Tabela 2).

A avaliação dos manipuladores foi realizada após higienização das mãos (Tabela 3). Considerando o fato

Tabela 1. Contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos e fungos filamentosos e leveduras (UFC/cm²/semana) nas áreas da cozinha e do bufê em sete estabelecimentos do município de Santa Rosa, RS, 2006

Estabelecimento	Área da cozinha		Área do bufê	
	Micro-organismos aeróbios Mesófilo	Fungos filamentosos e Leveduras	Micro-organismos aeróbios mesófilos	Fungos filamentosos e Leveduras
1	2,0x10 ²	1,1x10 ²	1,5x10 ²	5,1x10 ²
2	4,3x10 ²	2,8x10 ²	2,9x10 ²	2,1x10 ²
3	2,0x10 ²	1,4x10 ²	2,7x10 ²	1,4x10 ²
4	1,3x10 ²	2,8x10 ²	3,0x10 ²	1,4x10 ²
5	4,1x10 ²	3,3x10 ²	5,5x10 ²	5,5x10 ²
6	3,7x10 ²	7,6x10 ²	2,4x10 ²	6,9x10 ²
7	8,5x10 ¹	3,0x10 ²	1,2x10 ²	2,6x10 ²

Tabela 2. Contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos e coliformes totais de amostras coletadas na superfície de mesa de manipulação localizada na cozinha e de garfo exposto no bufê em sete estabelecimentos do município de Santa Rosa, RS, 2006

Estabelecimentos	Mesa da cozinha ¹		Garfo exposto no bufê ²	
	Micro-organismos aeróbios mesófilos	Coliformes totais	Micro-organismos aeróbios mesófilos	Coliformes totais
1	< 1,0x10 ¹ estimado	2,1x10 ²	6,7x10 ⁶	1,3x10 ⁷
2	1,8x10 ²	2,3x10 ³	< 1,0x10 ¹ estimado	< 1,0x10 ¹ estimado
3	4,3x10 ²	1,5x10 ⁵	1,0x10 ³	1,7x10 ³
4	5,3x10 ²	4,9x10 ³	1,0x10 ³	2,4x10 ⁵
5	9,9x10 ³	7,9x10 ⁵	1,1x10 ⁵	6,3x10 ⁴
6	2,3x10 ³	2,2x10 ⁴	1,3x10 ⁴	1,3x10 ⁶
7	2,0x10 ⁶	2,5x10 ⁵	2,4x10 ⁵	8,1x10 ⁵

¹ Valores expressos em (UFC/cm²)

² Valores expressos em (UFC/unidade)

Tabela 3. Faixa de contagem de bactérias do grupo coliformes totais em mãos de manipuladores de sete estabelecimentos do município de Santa Rosa, RS, 2006

Coliformes Totais (UFC/mão)	Manipulador (%)	Trabalho (%)*
0 a 100	28,6	54,4
101 a 1.000	0,0	26,5
1.001 a 10.000	14,3	13,2
10.001 a 100.000	57,1	5,9

* Faixas de contaminação de acordo com parâmetros de Andrade et al.¹⁷

de não haver especificações a respeito da contagem de coliformes totais nas mãos dos manipuladores realizou-se a comparação com um trabalho semelhante, que utilizou a mesma técnica do *swab* de acordo com a metodologia descrita pela APHA¹¹.

Os dados são preocupantes considerando que mais da metade das amostras (57,1%) tiveram contagem de coliformes totais entre 10.001 a 100.000 UFC/mão, ou seja, a maior faixa de contagem encontrada. Andrade et al.¹⁷ constataram apenas 5,9% das amostras nesta faixa. *Staphylococcus* coagulase positiva não foi detectado em nenhuma das amostras coletadas de mãos de manipuladores.

CONCLUSÃO

Considerando o alto grau de não conformidades constatado concluiu-se pela necessidade de investimentos por parte dos estabelecimentos no sentido de adequar e atender as exigências da legislação com os objetivos de melhorar a qualidade dos serviços e produtos e proteger a saúde do consumidor.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos estabelecimentos que contribuíram com a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS)

1. Lima JX, Oliveira LF. O crescimento do restaurante self-service: aspectos positivos e negativos. *Rev Hig Alim.* 2005; 19 (128): 45-53.
2. Associação Brasileira de Bares e Restaurantes. Gastos com refeições fora do lar devem chegar a 30% em 2012. ABRASEL; 2009. Disponível em: http://www.abrasel.com.br/index.php/Atualidade/item/gastos_com_refeicoes_fora_do_lar_devem_chegar_a_30_em_2012/
3. Associação Brasileira de Refeições Coletivas. Mercado Real. ABERC; 2009. Disponível em: <http://www.aberc.com.br/mercadoreal.asp?IDMenu=21>
4. Organização Pan-Americana da Saúde - OPAS.. Organização Mundial da Saúde - OMS. 126ª Sessão do Comitê Executivo. Resolução CE126.R7 Proteção dos Alimentos. Washington, D.C., 26 a 30 de jun. 2000. Disponível em: http://www.paho.org/portuguese/gov/cd/cd42_03-p.pdf
5. Giova AT, Silva Jr. EA. APPCC na qualidade e segurança microbiológica de alimentos: análise de perigos e pontos críticos a qualidade e a segurança microbiológica de alimentos. São Paulo: Varela; 1997.
6. Codex Alimentarius. CAC/RCP 39 de 1993. Code of Hygienic Practice for Precooked and Cooked Foods in Mass Catering. Disponível em: http://www.codexalimentarius.net/web/standard_list.jsp
7. Carmo GMI, Oliveira AA, Dimech CP, Santos DA, Almeida MG, Berto LH, Alves RMS, Carmo EH. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999 - 2004. *Boletim Eletrônico Epidemiológico.* 2005; 5 (6): 1-7.
8. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004. Dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, p. 25, 16 set. 2004. Seção 1.
9. Silva Jr. EA. Manual de Controle Higiênico-sanitário em Alimentos. São Paulo: Varela; 2002.
10. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 275, de 21 de outubro. 2002 do. Dispõe sobre Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores-Industrializadores de Alimentos e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores-Industrializadores de Alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, p. 4-21, 06 nov. 2002. Seção 1.
11. Sveum WH, Moberg LJ, Rude RA, Frank JF. Microbiological monitoring of the food processing environment. In: Vanderzant C, Splittstoesser DF, Speck ML, editors. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods.* 3rd ed. Washington: APHA; 1992. p. 51-74.
12. Souza CH, Sathler J, Jorge MN, Horst RFML. Avaliação das condições higiênico-sanitárias em uma Unidade de Alimentação e Nutrição hoteleira, na cidade de Timóteo - MG. *Nutrir Gerais* 2009; 3 (4): 312-29.
13. Panza SGA, Brotherhood R, Andreotti A, Rezende C, Baleroni FH, Paroschi VHB. Avaliação das condições higiênico-sanitárias durante a manipulação dos alimentos, em um restaurante universitário, antes e depois do treinamento dos manipuladores. *Rev Hig Alim.* 2006; 20 (138): 15-9.
14. Genta TMS, Maurício AA, Matioli G. Avaliação das Boas Práticas através de check-list aplicado em restaurantes *self-service* da região central de Maringá, Estado do Paraná. *Acta Sci. Health Sci.* 2005; 27 (2): 151-6.
15. Oliveira MN, Brasil ALD, Taddei JAAC. Avaliação das condições higiênico-sanitárias das cozinhas de creches públicas e filantrópicas. *Cien Saude Colet.* 2008; 13 (3):1051-60.
16. Benenson AS. Manual para el control de las enfermedades transmisibles. 16nd ed. [s.l.]: OPAS; 1997.
17. Andrade NJ, Silva RMM, Brabes KCS. Avaliação das condições microbiológicas em unidades de alimentação e nutrição. *Cienc Agrot.* 2003; 27 (3): 590-6.
18. Montville R., Schaffner DW. Statistical distributions describing microbial quality of surfaces and foods in food service operations. *J. Food Prot.* 2004; 67 (1): 162-7.

Parâmetros físico-químicos de qualidade de peixe salgado e seco (bacalhau) comercializado em mercados varejistas

Physical-chemical quality parameters of salted and dried fish (codfish) traded by retail markets

RIALA6/1237

Eliane Teixeira MÁRSICO¹, Carla da SILVA^{1*}, Viviane Brandão BARREIRA¹, Samira Pirola Santos MANTILLA¹, Ismar Araujo de MORAES²

*Endereço para correspondência: Rua Vital Brasil Filho, 64, 24230-340, Niterói, Rio de Janeiro, Brasil.

e-mail: carlavet.s@gmail.com

¹Departamento de Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói-RJ.

²Departamento de Fisiologia Veterinária, Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói-RJ.

Recebido: 04.05.2009 – Aceito para publicação: 04.10.2009

RESUMO

Foram avaliados os parâmetros físico-químicos de qualidade em amostras de peixe salgado e seco (bacalhau) comercializado no mercado varejista da Cidade do Rio de Janeiro/RJ. Das 20 amostras analisadas, 75% apresentaram valores de umidade acima do limite máximo permitido pela legislação. Os valores de Aa variaram entre 0,70 e 0,84. A faixa predominante do pH foi de 5,7 a 6,0 e apenas uma amostra se destacou das demais por apresentar pH 7,1. Os valores de Bases Voláteis Totais (BVT) variaram de 1,76 a 10,58mg N/100g. A quantidade de resíduo mineral fixo total foi maior do que o limite estabelecido em 25% das amostras analisadas. Em todas as amostras analisadas, o índice de cloretos foi superior ao valor mínimo estabelecido. Em 14 das 20 amostras coletadas, foi realizada a determinação do ranço oxidativo, e quatro apresentaram resultados positivos. Observou-se a ocorrência de fraude, pela adição de sulfito de sódio em uma amostra e pela presença de histamina em quantidade de 2 a 5 mg/100g em uma outra amostra. De modo geral, a qualidade do bacalhau disponível ao consumo apresentou-se insatisfatória, em função do percentual de amostras que mostraram não conformidade com os padrões oficiais para alguns parâmetros e pela presença de ranço, sulfito e histamina, que além de sugerirem perda de qualidade do produto, esses podem comprometer a saúde do consumidor.

Palavras chave. bacalhau, qualidade, controle físico-químico.

ABSTRACT

Physical-chemical quality parameters in samples of salted and dried fish (codfish) traded in retail markets at the city of Rio de Janeiro/RJ was evaluated. Of 20 analyzed samples, 75% showed the humidity rates above the maximum limit permitted by legislation. The rates of Aa varied from 0.70 to 0.84, and the pH value was predominantly on average from 5.7 to 6.0, and only one sample had pH 7.1. The total volatile bases (TVB) values varied from 1.76 to 10.58mg N/100g, and the total quantity of fixed mineral residue exceeded the limit in 25% of analyzed samples. All of analyzed samples had chloride contents higher than that established minimum limit. In 14 out 20 collected samples, the oxidative rancidity was determined, and four samples showed positive result. =

Key words. codfish, quality, physical-chemical control.

INTRODUÇÃO

O pescado é um alimento de excelente valor nutricional, com proteínas de alto valor biológico e lipídios insaturados, além de vitaminas e sais minerais que complementam uma dieta saudável. O bacalhau é um peixe comercializado salgado e seco, consumido por grande parte da população. Entretanto, vários fatores podem influenciar a qualidade desse produto, tais como: obtenção da matéria-prima, transporte, desembarque, processamento, armazenamento e o modo de exposição na área de vendas.

A elevada atividade de água (Aa), a composição química, o teor de gorduras insaturadas facilmente oxidáveis e, principalmente, o ponto de hidrogênio iônico (pH) próximo da neutralidade, tornam o pescado um dos alimentos mais suscetíveis à deterioração¹.

A realização da salga em peixes é um antigo e tradicional método de conservação². O objetivo dessa operação é diminuir a Aa do produto para aumentar sua estabilidade microbiana, química, bioquímica e também contribuir para o desenvolvimento de características desejáveis de aroma e sabor nos produtos³. Produtos com altos teores de sal, como o pescado salgado e seco, são considerados de fácil conservação, apesar de não estarem livres de sofrer deterioração⁴, decorrente de ação enzimática e/ou bacteriana, resultando na produção de vários compostos nitrogenados, cujo conjunto é denominado bases voláteis totais (BVT), sendo que a sua quantificação é considerada um parâmetro de frescor⁵.

Outro importante parâmetro de qualidade para este tipo de alimento é o teor de resíduos minerais fixos (cinzas), que expressam o conteúdo de sais minerais presente no pescado. No entanto, nesse tipo de alimento, o percentual de cinzas será influenciado pela quantidade de cloreto de sódio adicionada durante o seu processamento tecnológico.

O bacalhau quando dessalgado contém em média 1,3% de gordura sendo a distribuição de ácidos graxos saturados, equivalente a de ácidos graxos insaturados⁶. A fração de ácidos graxos insaturados está altamente propensa a rancidez oxidativa⁷. E esta pode significar a ingestão de substâncias potencialmente tóxicas que contribuem para a ocorrência de processos como arteriosclerose e o câncer⁸.

O uso de conservantes e outros aditivos alimentares em diferentes países é limitado por legislações específicas, em função do efeito tóxico de muitas dessas substâncias.

A legislação brasileira estabelece que o uso de aditivos deve ser limitado a alimentos específicos, em condições específicas e ao menor nível para alcançar o efeito desejado⁹.

Mais um aspecto relevante a ser ressaltado é que, na deterioração dos peixes são formadas aminas biogênicas através da descarboxilação de aminoácidos por enzimas bacterianas e, dentre essas, destaca-se a histamina pelo potencial alergênico, mas que tem seu efeito potencializado pela presença de outras aminas como a putrescina e a cadaverina, provenientes da descarboxilação da lisina e da arginina^{10,11,12,13}.

Sendo assim, neste trabalho objetivou-se avaliar através de parâmetros físico-químicos, a qualidade do peixe salgado seco (bacalhau) comercializado na Cidade do Rio de Janeiro, propondo-se sugerir através dos resultados, possíveis falhas no processamento tecnológico deste produto e/ou no controle de qualidade do mercado varejista, onde o mesmo é exposto à venda.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 20 amostras de bacalhau (*Gadus morhua*) salgado seco, coletadas em estabelecimentos varejistas localizados na Cidade do Rio de Janeiro por ação da Vigilância Sanitária Municipal (VISA-RJ), durante o período de agosto a dezembro de 2007. Após a obtenção, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Controle Físico-Químico de Alimentos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, para a realização dos procedimentos analíticos.

Segundo métodos analíticos oficiais descritos pelo Laboratório Nacional de Referência Animal (LANARA)¹⁴, foram realizadas análises físico-químicas de umidade, pH, cinzas, cloretos e BVT. Para a realização das análises de BVT, as amostras foram dessalgadas, de acordo com a metodologia preconizada pela cartilha orientativa sobre pescado salgado e pescado salgado seco da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA)¹⁵. Ainda seguindo a referência analítica do LANARA, foi realizada a prova de "Kreiss" para a determinação do ranço oxidativo, mas esta foi realizada em 14 das 20 amostras devido à insuficiente quantidade de gordura obtida em 6 das 20 amostras. A atividade de água (Aa) foi determinada utilizando o aparelho "Pawkit®" (Decagon Devices, Inc., USA). A determinação de sulfito de sódio foi realizada segundo o Instituto Adolfo Lutz¹⁶ e o teor de histamina

pelo método de Cromatografia em Camada Delgada, proposto por Schutz, Chang e Bjeldanes¹⁷.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios de umidade, Aa, pH, BVT, cinzas e cloretos das amostras de bacalhau salgado e seco, assim como, desvio padrão, valores mínimos e máximos obtidos, os valores legais de referência e os percentuais de amostras fora do padrão legal vigente, podem ser observados na Tabela 1.

Verificou-se que, entre as 20 amostras analisadas, 15 (75%) apresentaram valores de umidade acima de 45%, que é valor máximo estabelecido pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Peixe Salgado e Peixe Salgado Seco¹⁸, para espécies de pescados consideradas magras, categoria na qual está inserido o bacalhau. Em trabalho realizado por Souza et al.¹⁹, 100% das 15 amostras de bacalhau analisadas encontravam-se com a umidade acima do valor especificado pelo Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA)²⁰, que estabelece como limite máximo 35% de umidade. Neste mesmo estudo, foi encontrado valor de umidade média em torno de 46,3%, sendo esse valor menor do que o valor médio encontrado nas amostras analisadas no presente trabalho, que foi de 47,21%.

Com relação ao armazenamento e a exposição em estabelecimentos comerciais, a umidade relativa do ambiente interferirá na absorção de água pelo bacalhau. Sendo assim, cuidados devem ser tomados no intuito de evitar o aumento da umidade e também da Aa neste produto, pois em alimentos com maiores teores de água a proliferação de micro-organismos, dentre eles os patogênicos, ocorre mais facilmente¹.

Os valores de Aa das amostras de bacalhau variaram entre 0,70 e 0,84. Não há um padrão proposto pela legislação para este parâmetro neste produto. Falhas no processo de salga ou até mesmo no armazenamento e exposição do bacalhau nos estabelecimentos comerciais, podem interferir no aumento da umidade e da Aa. O efeito osmótico decorrente da salga é representado pela penetração do sal e saída da água livre existente na carne do pescado. Falhas neste processo respondem pelo aumento dos teores de umidade e Aa do bacalhau.

Com relação ao pH das amostras analisadas, a faixa predominante em 15 amostras (75 %) foi de 5,7 a 6,0. Nesta faixa de pH estão classificados os alimentos de baixa acidez, os quais requerem cuidados especiais de armazenamento devido à possibilidade de crescimento de bactérias patogênicas¹. Uma amostra se destacou das demais por apresentar pH de 7,1, sugerindo possível degradação de aminoácidos e da ureia, a desaminação da creatina do pescado, ou ainda, fraude por adição de

Tabela 1. Resultados das análises de umidade, Aa, pH, BVT, cinzas e cloretos realizadas nas amostras de bacalhau

Análises	Resultados				Valores Legais de Referência	%Fora do Padrão Legal
	Valor Médio	Desvio Padrão	Valor Mínimo	Valor Máximo		
Umidade (%)	47,21%	±5,16	32,11%	56,73%	45% ^a	75%
Aa	0,73	±0,02	0,70	0,84	---	---
pH	6,0	±0,31	5,7	7,1	---	---
*BVT (mg N/100g)	3,17	±2,10	1,76	10,58	30 mg N/100g ^b	Nenhuma
Cinzas (%)	23,26%	±3,23	17,22%	31,21%	25% ^c	25%
Cloretos (%)	19,43%	±2,87	14,67%	25,53%	10% ^a	Nenhuma

^a Portaria N° 52 de 2000 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA)¹⁸

^b Portaria N° 185 de 1997 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA)²²

^c Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA)²⁰

--- Não há padrão estabelecido pela legislação atual para pescado salgado seco.

* Esta análise foi realizada com as amostras dessalgadas e os valores obtidos foram comparados com os valores legais vigentes para peço fresco.

polifosfato, que neste estudo não foi objeto de avaliação. Os resultados obtidos para pH se apresentaram, em média, inferiores aos encontrados por Lauritzsen et al.²¹. Segundo estes autores, em peixes como o *Gadus morhua*, o pH pode variar de 6,8 a 6,9 em um a dois dias após sua morte, sendo que no bacalhau após 28 dias de cura pelo sal, o pH pode declinar para 6,2.

Como relatado anteriormente, as análises BVT foram realizadas nas amostras de bacalhau após a completa retirada do sal. O objetivo da dessalga foi o de poder comparar os valores obtidos nesta análise com os propostos pela legislação, que são instituídos para peixes frescos, visto que, se bem conservado pelo sal, após dessalgado o peixe deve conter os mesmos valores de BVT que possuía antes da realização da salga, que por sua vez, deve ter sido realizada com o peixe ainda fresco. Os resultados de BVT obtidos nas amostras dessalgadas, variaram de 1,76 a 10,58mg N/100g. Estes valores estão abaixo do limite máximo de 30mg N/100g, estipulado para peixes frescos e não elasmobrânquios, pela Portaria N° 185 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA)²².

Com relação aos valores de resíduo mineral fixo, cinco amostras (25%), excederam o limite máximo de 25% estabelecido pelo RIISPOA²⁰ e, o teor de cloreto de sódio, estava acima do limite mínimo estabelecido pela legislação brasileira para pescado salgado e seco¹⁸, que é de 10%, em todas as amostras analisadas. O teor de sal observado variou entre 14,67 e 25,53% (média=19,43%), sugerindo não haver problemas tecnológicos com relação a este parâmetro. Porém, vale ressaltar que a quantidade de sal presente na amostra influencia no teor de resíduo mineral fixo, e os valores bem acima do limite mínimo, podem ter contribuído para o excesso de resíduo mineral fixo detectado em algumas amostras.

Os peixes são boas fontes de ácidos graxos poli-insaturados, e quando esses alimentos são processados e armazenados, como é caso do pescado salgado seco, ficam mais propensos à oxidação²³. Nesta pesquisa a presença de ranço oxidativo ocorreu em quatro das 14 amostras analisadas. A velocidade de oxidação depende de diversos fatores como: grau de saturação dos ácidos graxos, temperatura, umidade e a presença de outras substâncias que favoreçam reações de oxidação⁷. A salga não evita a degradação química, pelo contrário, o sal acelera a oxidação lipídica por se tratar de um elemento pró-oxidante da gordura. Dessa forma quanto mais gordo e salgado for o bacalhau, mais propenso estará à rancidez¹.

Deve-se ressaltar que essa alteração é um fator de risco à saúde do consumidor, visto que os peróxidos e muitos de seus produtos de degradação apresentam propriedades citotóxicas⁸.

Das 20 amostras analisadas em uma constatou-se adição de sulfito de sódio, sendo caracterizada ação fraudulenta. Este fato é bastante preocupante, pois este aditivo possui efeitos tóxicos quando ingerido. A legislação brasileira não permite o uso de sulfito de sódio como conservante em pescado, com exceção de camarões e lagosta logo após a captura para prevenir o escurecimento enzimático²⁴. Segundo Ring et al.²⁵, as reações alérgicas por alimentos representam um problema atual e crescente na medicina clínica. Os sintomas de alergias originárias dos alimentos incluem: reações de pele, respiratória, gastrointestinais e sintomas cardiovasculares, tendo como a manifestação mais relevante o choque anafilático.

Uma das amostras apresentou teor de histamina entre 2 a 5 mg/100g. Apesar de não ser uma análise de rotina nesse produto, a presença de aminas biogênicas sugere degradação de aminoácidos, portanto perda de qualidade. A presença de histamina em produtos salgados pode ocorrer, pois bactérias como a *Morganella morganii*, são capazes de se desenvolver mesmo em alimentos com alto teor de sal, e por ação de suas enzimas ocorre a descarboxilação do aminoácido histidina com a formação de histamina²⁶. O perigo da histamina em pescado é intensificado pela sua característica de não volatilidade e resistência ao tratamento térmico, além disto, ela pode conferir toxicidade ao produto mesmo antes deste ser considerado deteriorado ou sensorialmente inaceitável⁹. Inúmeras reações adversas têm sido atribuídas às aminas biogênicas provenientes da dieta. Vários sintomas foram alegados em função da ingestão de histamina, dentre eles, urticária, dores de cabeça, diminuição da pressão sanguínea, rubor, espirros e angústia respiratória e gastrointestinal²⁷.

CONCLUSÃO

O teor de umidade acima do máximo permitido e os valores de resíduo mineral fixo acima do padrão oficial caracterizam perda de qualidade do bacalhau. A presença de ranço oxidativo também interfere na qualidade e está relacionada com risco à saúde do consumidor, assim como a presença de sulfito de sódio e de histamina. O sulfito, além de possuir efeitos tóxicos, também caracteriza fraude

no comércio deste produto. A detecção de histamina e de ranço oxidativo, juntamente com os outros resultados obtidos e citados acima, demonstram que é necessário um maior controle na qualidade do bacalhau salgado e seco comercializado em mercados varejistas da Cidade do Rio de Janeiro.

REFERÊNCIAS

1. Franco DBGM, Landgraf M. *Microbiologia dos Alimentos*. 2nd ed. São Paulo: Ed Atheneu; 1996.
2. Thorarinsdottir KA, Arason S, Geirsdottir M, Bogason SG, Kristbergsson K. Changes in myofibrillar proteins during processing of salted cod (*Gadus morhua*) as determined by electrophoresis and differential scanning calorimetry. *Food Chem* 2002; 77: 377-85.
3. Chiralt A, Fito P, Barat JM. Use of vacuum impregnation in food salting process. *J. Food Eng* 2001; 49: 141-51.
4. Aiura FS, Carvalho MRB, Viegas EMM, Kirschnik PG, Lima TMA. Conservação de filés de tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*) em salga seca e salga úmida. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2008; 60 (6): 1531-7.
5. Pereira WD, Athayde AH, Pinto KP. Avaliação da qualidade de peixes comercializados na cidade de Maceió-AL. *Rev Hig Alim* 2001; 15 (84): 67-74.
6. TACO. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. [acesso em 08 de jul. 2008] Available: <http://www.unicamp.br/nepa/taco/tabela.php?ativo=tabela&PHPSESSID=4a4ec0be7817bae5eeb9263a112ba1e5>.
7. Bressan MC, Perez JRO. *Tecnologia de Carnes e Pescados*. Lavras:UFLA; 2001.
8. Kraemer FB. Análise Micológica e determinação físico-química de amostras de camarão salgado-seco comercializados no Estado do Rio de Janeiro [Dissertação de mestrado]. Niterói, Rio de Janeiro: Universidade Federal Fluminense 2000. 79p.
9. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) Portaria nº 540 de de outubro de 1997 da do. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 27 out. 1997.
10. Bover-Cid S, Izquierdo-Pulidom, Vidal-Carou MC. Relationship between biogenic amine contents and the size of dry fermented sausages. *Meat Science* 1999; 51:305 - 11.
11. Soares VF M, Vale SR, Junqueira RG, Glória M A. Teores de Histamina e Qualidade Físico-Química e Sensorial de Filé de Peixe Congelado. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 1998; 18 (4): 462-70.
12. Moreno RB. Avaliação dos níveis de histamina em sardinhas frescas comercializadas na CEAGESP de São Paulo [Dissertação de mestrado]. São Paulo, São Paulo: Universidade de São Paulo, 2001. 66p.
13. Judite LG. Aminas biogênicas, aminas voláteis, triptofano livre e ureia como índices químicos de qualidade e frescor de pescado [Tese de doutorado]. Campinas, São Paulo: Universidade Estadual de Campinas, 2005. 125p.
14. Brasil. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. Portaria nº 001 de 7 de outubro de 1981. Aprova os métodos analíticos para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. II. Métodos físicos e químicos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 1981.
15. Cartilha orientativa sobre comercialização de pescado salgado e pescado salgado seco. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) (2007). Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/cartilha_bacalhau.pdf> Acesso em 08 jan. 2008.
16. Instituto Adolfo Lutz (IAL). Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Ed. São Paulo-SP, 1985.
17. Schutz DE, Chang GW, Bjeldanes L F. Rapid thin layer chromatographic method for the detection of histamine in fish products. *Journal of the AOAC* 1976; 59 (6): 1224-1225.
18. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 52. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Peixe Salgado e Peixe Salgado Seco. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 29 dez. 2000.
19. Souza VG, Mano SB, Pardi HS. Avaliação comparativa de metodologias para determinação de umidade em produtos salgados secos (charque e bacalhau). *Rev Hig Alim* 2000; 14 (78/79): 55-8.
20. Brasil. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA) Decreto nº 30.691 de 29 de março de 1952, alterado pelos Decretos nº 1255 de 25 de junho de 1962, 1236 de 02 de setembro de 1994, 1812 de 08 de fevereiro de 1996 e 2244 de 04 de junho de 1997 da do. Aprova o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 1997.
21. Lauritzsen K, Akse L, Johansen A, Joensen S, Sorensen NK, Olsen RL. Physical and quality attributes of salted cod (*Gadus morhua* L.) as affected by the state of rigor and freezing prior to salting. *Food Research International* 2004; 37 (4): 677-88.
22. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº185 de 1997 Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade de peixe fresco (inteiro e viscerado). Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 13 mai. 1997.
23. Sampaio GS. Ocorrência de óxido de colesterol e análise do perfil lipídico em camarão salgado-seco [Dissertação mestrado]. São Paulo, São Paulo: Universidade de São Paulo 2004. 105p.
24. Brasil. Ministério da Saúde Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) Resolução nº 4 1988 da do. Aprova revisão das Tabelas I, III, IV e V referente a Aditivos Intencionais, bem como os Anexos I, II, III e VII, todas do Decreto n. 55.871, de 26 de março de 1965. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 24 nov. 1988.
25. Ring J, Brockow K, Behrendt H. Adverse reactions to foods. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 2001; 756: 3-10.
26. Huss HH. Garantia da qualidade dos produtos da pesca. Roma: FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations); 1997.
27. Jansen SC, Van Dusseldorp M, Bottema KC, Dubois AEJ. Intolerance to dietary biogenic amines: a review. *Ann. Allergy. Asthma. & Immunology* 2003; 91: 233-41.

Características físico-químicas, microbiológicas e perfil de ácidos graxos de queijos de leite de cabra comercializados

Goat milk cheese analysis on physical-chemical characteristics, fatty acids microbiological quality and profile aspects

RIALA6/1238

Rita de Cássia Ramos do Egypto QUEIROGA^{1*}, Suéllen Maria Gonçalves MATIAS¹, Marcela Marreiro dos SANTOS¹, Ilsa Cunha BARBOSA¹, Estefânia Fernandes GARCIA¹, Evandro Leite de SOUZA¹, Carlos Eduardo Vasconcelos de OLIVEIRA², Heloisa Maria Holtz SOUSA¹

*Ender eço para correspondência: Departamento de Nutrição - Universidade Federal da Paraíba. Campus I, João Pessoa-PB CEP: 58091-100, e-mail: rcqueiroga@uol.com.br

¹Departamento de Nutrição - Universidade Federal da Paraíba. Campus I, João Pessoa-PB

²Departamento de Nutrição – Universidade Federal de Pernambuco

Recebido: 01.09.2009 – Aceito para publicação: 07.12.2009

RESUMO

Este estudo teve a finalidade de identificar as características físico-químicas, o perfil de ácidos graxos e a qualidade microbiológica dos queijos de leite de cabra comercializados no Estado da Paraíba. As amostras de queijo de leite de cabra analisadas apresentaram os seguintes valores médios nas análises físico-químicas: umidade 41,14 %; proteínas 25,39 %; lipídeos 28,66 %; acidez 0,05 % e cinzas 3,95 %. Quanto ao perfil de ácidos graxos, os valores percentuais médios foram, de ácidos mirístico (C14:0) 11,95; palmítico (C16:0) 27,96; e oléico (C18:1) 15,41. Os queijos analisados apresentaram-se dentro dos limites da legislação vigente em relação aos aspectos microbiológicos, contudo, a elevada contagem de micro-organismos psicrótrófilos, fungos filamentosos e leveduras sugerem que há necessidade de adoção de melhores condições higiênico-sanitárias ao longo de seu processamento. As características dos queijos apresentaram-se satisfatória, porém, maior adequação das etapas que envolvem o transporte e beneficiamento da matéria-prima poderia garantir a maior qualidade do produto final.

Palavras-chave: leite de cabra, queijo, controle de qualidade.

ABSTRACT

This study assessed the physical-chemical characteristics, the fatty acids profile and the microbiological quality of goat cheese samples marketed in Paraíba state, Brazil. The analyzed goat cheese samples showed the following average values for physical-chemical aspects: moisture 41.14 %; proteins 25.39 %; fat 28.66 %; acidity 0.05 %; and ashes 3.95 %. Regarding to the fatty acids profile, the highest average percentage values were found for miristic (C14:0) 11.95 %; palmitic (C16:0) 27.96 %; and oleic acid (C18:1) 15.41 %. All of cheese samples were in accordance to the current legislation concerning the microbiological aspects. Nevertheless, on account of high psychrotrophic bacteria counting, moulds and yeasts, it is recommended an implementation of hygienic and sanitary conditions along the cheese processing. All in all the quality of analyzed goat cheese samples showed to be satisfactory, although, a better adequacy on raw food manufacturing and shipping could be improved to guarantee high quality of the final product.

Key-words: goat milk, cheese, quality control.

INTRODUÇÃO

A grande parte da produção mundial de leite de cabra é destinada à fabricação de queijos, se constituindo o subproduto de maior interesse tecnológico e econômico. Conforme Lopes et al.¹, a produção e a comercialização de queijo mostraram-se mais rentáveis que a comercialização do leite *in natura*, representando uma alternativa para o incremento da renda do produtor de leite. Na França, um dos países com maior produção de leite de cabra, aproximadamente 80% da produção é transformado em queijos, sendo que este valor é de 57% na Espanha e 63% na Itália.

No Brasil, a produção de queijos a partir do leite de cabra ainda é restrita, o que torna a sua comercialização difícil, limitando-se apenas as regiões aonde eles são produzidos. A participação no mercado de produtos lácteos caprinos industrializados no Brasil é de apenas 3%, sendo que 95% da produção é comercializado na forma de leite fluido, e 2% na forma de leite em pó^{2,3}. No mercado nacional, o elevado preço do queijo de leite de cabra faz com que esse produto seja consumido, geralmente, por indivíduos de alto poder aquisitivo, tendo em vista que até algum tempo atrás seu consumo era praticamente mantido por produtos importados.

Segundo Katiki et al.⁴ há cerca de 30 anos somente encontrava-se queijos de leite de cabra importados no país. O *marketing* e a divulgação, promovendo os queijos de leite de cabra, são de grande importância na popularização do seu consumo, dando ênfase nas suas características nutricionais, explorando as suas vantagens em relação aos outros produtos como hipoalergenicidade, alta digestibilidade, alto teor em ácidos graxos de cadeia curta, proteínas, cálcio, dentre outros atributos nutricionais.

Um dos grandes entraves para a comercialização de produtos derivados de leite de cabra refere-se a sua baixa qualidade microbiológica devido à falta de manejo adequado do leite por parte dos pequenos produtores. Sendo o leite extremamente susceptível à contaminação por micro-organismos, em face às inúmeras fontes de contaminação desde a ordenha até o seu processamento, tal produto pode causar prejuízos tanto à saúde do consumidor quanto ao processamento industrial.

Os queijos produzidos com leite de cabra na Região Nordeste são, em sua maioria, queijos coalho ou frescal. De modo geral, o uso do leite pasteurizado juntamente com o emprego de fermento láctico, no Brasil, tem contribuído de forma significativa para a melhoria da

qualidade dos queijos⁵. Entretanto, tal fato não ocorre de forma uniforme em todo o Nordeste brasileiro, em relação aos produtores de queijo de coalho, observando-se, desta forma, diferenças na qualidade do desenvolvimento do sabor e nas características microbiológicas destes queijos, o que indica uma não padronização das características dos queijos desta região.

Diante do exposto, com este trabalho objetivou-se analisar a qualidade nutricional dos queijos comercializados no Estado da Paraíba por meio da caracterização físico-química, microbiológica e avaliação do perfil de ácidos graxos, gerando informações que contribuam para a melhoria da qualidade e expansão dos conhecimentos sobre este produto, e subsidiando assim o seu potencial de comercialização.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de execução e amostragem

Após submissão do projeto de pesquisa ao Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde/UFPB e conforme aprovação do mesmo (Protocolo nº 103/06/07) iniciou-se o experimento.

A coleta das amostras foi realizada periodicamente em supermercados e demais locais distribuidores no Estado da Paraíba. As amostras coletadas apresentavam-se devidamente embaladas e dentro dos prazos de validade, sendo acondicionadas em recipiente de isopor com gelo para serem transportadas até a Universidade Federal da Paraíba – UFPB, onde foram armazenadas sob refrigeração até o momento das análises. Amostras denominadas de A e B foram obtidas em supermercados e padarias, enquanto que, as do grupo C foram provenientes de feiras livres. O estudo foi subdividido em seis experimentos representando cada localidade produtora. Para cada procedência foram coletados 5 queijos, por vez, totalizando 30 amostras, analisando-as em triplicata.

Os ensaios físico-químicos, microbiológicos e perfil lipídico foram realizados no Laboratório de Bromatologia, no Laboratório de Microbiologia dos Alimentos, Laboratório de Técnica Dietética DN/CCS/UFPB e Laboratório de Cromatografia Instrumental CT/DEQ/UFPE, respectivamente.

Análises físicas e químicas

Nas avaliações físico-químicas foram determinados: Proteína – realizada seguindo-se o método Micro-Kjedahl, método 467/IV – Instituto Adolfo Lutz (IAL)⁶;

Lipídeos – Utilizando-se butirômetro de Gerber para queijo⁷; Umidade – Procedendo-se secagem até obtenção de peso constante, método 012/IV Cinzas – Mediante carbonização seguida de incineração à temperatura de 550°C, método 018/IV; Extrato seco desengordurado – Obtido da subtração da porcentagem de lipídeos do extrato seco total, método 431/IV e Acidez – Mediante titulação, sendo utilizado a acidez em ácido láctico, método 463/IV, IAL⁶.

As amostras foram submetidas às análises de determinação de ácidos graxos, conforme metodologias a seguir. Inicialmente, os lipídeos foram extraídos das amostras de queijo segundo método descrito por Folch, Less e Stoane-Stanley⁸. Do extrato lipídico, tomou-se uma alíquota de 5 mL para a execução do processo de preparação dos ésteres metílicos, seguindo-se o método descrito por Hartman e Lago⁹.

As amostras transmetiladas foram analisadas em Cromatógrafo a Gás injetando-se uma alíquota de 1 µL do extrato esterificado e a identificação dos ácidos graxos foi feita pela comparação dos tempos de retenção e as percentagens dos ácidos graxos foram calculadas mediante o software – Peaksimple (SRI Instruments – USA). Os ácidos graxos foram quantificados por normalização das áreas dos ésteres metílicos e os resultados foram expressos em percentual de área (%).

Análises Microbiológicas

As análises microbiológicas foram realizadas segundo metodologia descrita por Vanderzant; Splittstoesser¹⁰: Número Mais Provável de Coliformes Totais e Fecais - o número mais provável de coliformes totais e fecais foi determinado por meio da técnica dos tubos múltiplos, utilizando-se caldo CLVBV com incubação a 37 °C por 24-48 horas e caldo EC com incubação a 45 °C por 24 horas para a análise de coliformes totais e fecais, respectivamente. Contagem de Bactérias Psicotrófilas - A contagem de Bactérias Psicotrófilas (log UFC/g) se realizou por meio da técnica de plaqueamento em superfície utilizando-se ágar contagem padrão e incubação a 7 °C por cinco dias. Contagem de fungos filamentosos e leveduriformes - A contagem de fungos filamentosos e leveduriformes (log UFC/g) foi realizada através da técnica de plaqueamento em superfície utilizando-se Ágar Sabouraud e incubação a 25 °C por três a cinco dias. Pesquisa de *Salmonella* - Para a pesquisa de *Salmonella* – Inicialmente, realizou-se um pré-enriquecimento da amostra com Caldo Lactosado,

em seguida ocorreu a etapa de enriquecimento seletivo utilizando-se Caldo Tetracionato e Caldo Selenito Cistina. A terceira etapa consistiu em realizar o plaqueamento de alíquotas dos caldos de enriquecimento seletivo em Ágar Bismuto Sulfito e Ágar Entérico de Hektoen. As colônias com características típicas de *Salmonella* foram isoladas em Ágar Nutriente para, posteriormente, serem realizados os testes bioquímicos confirmatórios. Contagem de *Staphylococcus* spp. e detecção de *S. aureus* coagulase positivo - A contagem de *Staphylococcus* spp. (log UFC/g) foi executada por meio da técnica de plaqueamento em superfície utilizando-se o Ágar Baird-Parker adicionado de telurito de potássio a 1% e emulsão de gema de ovo como meio de contagem. Após a contagem, foram selecionadas colônias características de *Staphylococcus* coagulase positivo (circulares, pretas, pequenas, lisas, convexas, com bordas perfeitas, rodeadas por uma zona opaca e/ou halo transparente), sendo estas cepas submetidas aos testes de confirmação: coloração de Gram, catalase, coagulase e DNase.

Análises estatísticas

Na análise estatística a avaliação das médias das diferentes marcas de queijo foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA) univariada. Os tratamentos estatisticamente diferentes foram comparados através do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. A análise estatística foi elaborada no programa estatístico *SigmaStat* versão 3.1¹¹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios (%) e desvios-padrão dos parâmetros físico-químicos das amostras de queijos de leite de cabra estão apresentados na Tabela 1. Machado et al.¹², em pesquisa com queijos minas artesanal, relatam valores médios de cinzas (3,79%); acidez (0,28%); proteínas (17,06%) e gordura (29,22%) que se apresentaram abaixo dos valores médios encontrados. Camacho et al.¹³ estudando as características químicas e físicas de diversos tipos de queijo de cabra obtiveram a seguinte composição média: umidade 43,9%, cinzas 2,87 a 3,9%, proteínas totais 18,64% a 23%, e lipídeos de 25,20 a 27,00 %, que diferiram dos resultados obtidos apresentando-se na sua maioria, abaixo da média.

Considerando-se ainda que Cavalcante et al.¹⁴, ao avaliarem queijos de coalho regionais em diferentes tempos de maturação, encontraram uma composição média de

37,95 a 42,57% de umidade; 28 a 34,30% de lipídeos; 23,12 a 27,70 % de proteínas; e 3,99 a 4,33 % de cinzas, permanecendo assim os resultados obtidos no presente estudo, acima dos valores dos demais. Possivelmente, estas variações aparecem em função de diversas variáveis como o tipo da raça caprina, dieta animal, o modo de fabricação, diferentes concentrações e espécies de micro-organismos na cultura láctica, tempo de maturação, entre outros, que interferem diretamente na composição físico-química de queijos produzidos com leite de cabra.

No Brasil, não existe legislação específica para queijos produzidos com leite de cabra. A Portaria nº 146/96 e Instrução Normativa nº 20/2001 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento¹⁵, determinam os padrões legais para Queijo Coalho produzido com leite bovino. Esta Portaria preconiza que o teor de umidade deve apresentar-se entre 36 e 54,9% (média a alta umidade) e gordura variável entre 35 e 60%. Atentando-se para o universo das amostras analisadas no presente estudado, constatou-se que os resultados apresentaram-se de acordo com o estabelecido pela legislação para umidade e abaixo da média para gordura, como dispostos na Tabela 2.

O perfil de ácidos graxos das amostras de queijo de leite de cabra, em valores médios percentuais de área, estão listados na Tabela 3. Foram identificados 17 ácidos graxos, dos quais 12 são saturados, 3 monoinsaturados e 2 poliinsaturados. Dos saturados, destacaram-se os ácidos mirístico (C14: 0) e palmítico (C 16:0), com valores médios expressos em área percentual (%), de 11,95 e 27,96, respectivamente. Já dos monoinsaturados, registrou-se o ácido oléico (C 18:1), com valor médio de 15,41%. Foi observada também, a predominância dos ácidos graxos saturados (80,56%) seguido dos monoinsaturados (5,6%).

Em relação às amostras de diferentes procedências analisadas, observou-se que as amostras de origem C apresentaram menor percentual de ácidos graxos saturados (AGS) e maior percentual de ácidos graxos monoinsaturados (AGM) em comparação as de A e B. No entanto, as amostras de B obtiveram percentual maior de ácidos graxos poliinsaturados (AGP) em comparação as de A e C. Especificamente, as amostras de C apresentaram menor percentual (11,40%) de ácido mirístico e maior percentual de ácido oléico (17,30%) em relação às demais

Tabela 1. Valores médios (%) e desvios-padrão dos parâmetros físico-químico de amostras de queijos de leite de cabra comercializados no Estado da Paraíba

Variável (%)	Queijos		
	A ¹	B ¹	C ²
Umidade	45,85 ^a ± 0,23	45,60 ^a ± 0,79	31,97 ^b ± 0,25
Proteína	26,27 ^b ± 0,69	22,00 ^c ± 0,26	27,90 ^a ± 0,14
Lipídeos	24,75 ^c ± 0,46	26,75 ^b ± 0,46	34,50 ^a ± 0,71
Acidez	0,06 ^a ± 0,01	0,06 ^a ± 0,01	0,04 ^b ± 0,00
Cinzas	4,02 ^a ± 0,11	3,65 ^a ± 0,51	4,19 ^a ± 0,01

¹ Queijos comerciais ² Queijos artesanais

Tabela 2. Frequência de amostras de queijos de leite de cabra comercializados no Estado da Paraíba em relação à legislação específica

Micro-organismo	Padrão *	N	De acordo		Em desacordo	
			n	%	n	%
Umidade	36- 54,9	30	30	100	0	0
Lipídeos	35- 60	30	0	0	30	100

*Portaria nº 146/96 e Instrução Normativa nº 20/2001 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento¹⁵

marcas. Já as coletadas em B registraram maior percentual de ácido palmítico (29,00%) em comparação as A e C.

As gorduras que contêm ácidos graxos saturados, em geral, elevam os níveis de LDL no sangue humano, quando comparadas com proteínas, carboidratos ou ácidos graxos insaturados em substituições isoenergéticas. O efeito hipercolesterolêmico dos AGS está associado aos ácidos láurico, mirístico e palmítico. Os ácidos monoinsaturados, oléico, e os poliinsaturados, linoléico e α -linoleico, reduzem os níveis de LDL colesterol e consequentemente, o risco de obesidade, câncer e doenças cardiovasculares¹⁶.

Os teores de ácidos graxos determinados apresentam algumas diferenças em relação aos valores descritos por Soryal et. al.¹⁷ e Lucas et. al.¹⁸, que analisaram diferentes tipos de queijos de cabra. As principais diferenças são

evidenciadas nos teores de ácidos palmítico e mirístico, os quais foram inferiores, enquanto que os valores de ácido oléico foram mais elevados que os determinados nesta pesquisa. Possivelmente, essas diferenças são decorrentes de complexos processos metabólicos de bio-hidrogenação ruminal, ocasionados por possíveis variações no tipo e na quantidade do volume de alimento ingerido pelas cabras que interferiram diretamente na produção do leite, e, por conseguinte, nos queijos, o que podem ter originado diferenças no perfil de ácidos graxos determinados nesta pesquisa. Cabe ressaltar, que o tipo de processo de manufatura dos queijos constitui-se de etapa decisiva no perfil de ácidos graxos do produto final.

Os resultados das análises microbiológicas para as amostras de queijo de leite de cabra “tipo coalho” comercializados no estado da Paraíba estão apresentados

Tabela 3. Valores médios e desvios-padrões do perfil de ácidos graxos dos queijos de leite de cabra comercializados no estado da Paraíba

Ácido Graxo (%)	Queijos		
	A	B	C
Caprónico (C6:0)	2,95 ^b ± 0,07	3,58 ^a ± 0,17	2,85 ^b ± 0,21
Caprílico (C8:0)	4,63 ^a ± 0,38	4,15 ^{ab} ± 0,13	3,80 ^b ± 0,28
Cáprico (C10:0)	16,73 ^a ± 0,47	15,20 ^c ± 0,30	13,35 ^b ± 0,07
Undecílico (C11:0)	0,40 ^a ± 0,01	0,30 ^b ± 0,01	0,30 ^b ± 0,01
Láurico (C12:0)	6,60 ^a ± 0,00	6,10 ^b ± 0,10	5,65 ^c ± 0,07
Tridecílico (C13:0)	3,55 ^a ± 0,35	2,77 ^{bc} ± 0,12	3,15 ^{ac} ± 0,07
Mirístico (C14:0)	12,50 ^a ± 0,00	11,95 ^c ± 0,21	11,40 ^b ± 0,00
Pentadecílico (C15:0)	1,05 ^b ± 0,07	1,20 ^a ± 0,00	1,00 ^b ± 0,00
Palmítico (C16:0)	26,00 ^b ± 0,57	29,00 ^a ± 0,36	28,90 ^a ± 0,28
Margárico (C17:0)	0,65 ^a ± 0,07	0,65 ^a ± 0,06	0,60 ^a ± 0,00
Esteárico (C18:0)	6,00 ^{bc} ± 0,28	6,47 ^{ac} ± 0,21	6,95 ^a ± 0,07
Araquídico (C20:0)	0,65 ^a ± 0,07	0,30 ^b ± 0,05	0,35 ^b ± 0,07
Miristoleico (C14:1)	0,30 ^b ± 0,01	0,30 ^b ± 0,01	0,70 ^a ± 0,00
Palmitoleico (C16:1)	0,85 ^b ± 0,07	0,85 ^b ± 0,06	1,15 ^a ± 0,07
Oléico (C18:1)	14,75 ^b ± 0,50	14,20 ^b ± 0,14	17,30 ^a ± 0,00
Linoleico (C18:2) - ω 6	1,90 ^b ± 0,14	1,65 ^c ± 0,06	2,30 ^a ± 0,00
Linolênico (C18:3) - ω 3	0,10 ^b ± 0,00	1,70 ^a ± 0,42	0,30 ^b ± 0,00

Valores em uma mesma linha, para cada média, seguidos de diferentes letras minúsculas diferem estatisticamente ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

na Tabela 4. Segundo a ANVISA – Resolução RDC nº 12 de 02/01/01 do Ministério da Saúde¹⁹, queijos de alta umidade, estando incluído o coalho que foi analisado, nesta pesquisa, devem apresentar valores de coliformes a 45 °C (termotolerantes) de até 5×10^2 NMP/g, ausência de *Salmonella* spp. em 25 g e até 2,7 log UFC/g de *Staphylococcus* coagulase positiva. Comparando os dados da legislação com os encontrados neste estudo, os queijos apresentam-se de acordo com os padrões de qualidade microbiológica vigentes.

A contagem de *Staphylococcus* spp. neste estudo obteve média máxima de 6,43 log UFC/g. Nenhuma colônia típica foi confirmada como sendo de *Staphylococcus* coagulase positiva. Esse resultado pode estar relacionado com o fato de serem os *Staphylococcus* coagulase negativa os agentes mais encontrados na glândula mamária dos caprinos^{20,21,22}. Katiki et al.⁴ em estudo com queijos de leite de cabra também não evidenciaram a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva, estando as contagens de *Staphylococcus* spp. inferiores a 3 log UFC/g. Já Bessa et al.²³ verificaram a presença de *S. aureus* em queijos caprinos numa média de 1,64 log UFC/g. A importância da pesquisa de *S. aureus* coagulase positiva em alimentos se dá pelo fato destas bactérias serem capazes de produzir enterotoxinas em quantidades suficientes e necessárias para a ocorrência de surtos de intoxicação alimentar estafilocócica²⁴.

Quanto ao número de coliformes totais nos queijos analisados, houve uma variação na média de > 0,3 e 4,6 NMP/g. Em outros estudos com queijos caprinos evidenciaram-se altas contagens de coliformes totais como no caso de Bessa et al.²³, 7,5 a 8,75 log

NMP/g, Picoli et al.²⁵, 4,81 a 5,48 log NMP/g e Leuthier et al.²⁶, 6,38 a 9,38 log NMP/g. A presença de coliformes termotolerantes foi evidenciada em todas as amostras analisadas, representando uma média de 0,09 a 0,15 NMP/g, contudo, estes resultados encontram-se inferiores aos limites estabelecidos pela Legislação vigente. A presença de coliformes termotolerantes é um indicativo de qualidade higiênica insatisfatória da matéria-prima e do processamento.

Vários tipos de micro-organismos são responsáveis pela deterioração de queijos, principalmente fungos filamentosos e leveduras que se desenvolvem em condições ótimas nesse alimento. A contagem destes micro-organismos no presente estudo foi considerada alta com médias variando entre 5,89 e 6,92 log UFC/g. Leuthier et al.²⁶ em suas pesquisas encontraram valores que variaram de < 1,48 a 8,74 log UFC/g. Já, Gutierrez et al.²⁷, que pesquisando a microflora do queijo de leite de cabra Valdeteja, durante 5, 10, 17 e 27 dias de armazenamento, observaram diferença de 4,36 a 6,38 log UFC/g. A legislação não especifica valores para este grupo de micro-organismos, porém, segundo Siqueira²⁸, a detecção de contagens elevadas de bolores e leveduras em alimentos indica condições higiênicas deficientes dos equipamentos, multiplicação no produto em decorrência de falhas no processamento e/ou estocagem, além de matéria-prima com contaminação excessiva.

Como já mencionado neste estudo, não foi verificada a presença de *Salmonella* spp. em nenhuma das amostras analisadas. Resultados semelhantes foram verificados no estudo de Bessa et al.²³ que analisaram

Tabela 4. Análise microbiológica do queijo de cabra “tipo coalho” comercializado no Estado da Paraíba

Variável	Queijos		
	A	B	C
Col. Totais (NMP/g)	>0,30 ± 0,10	>0,30 ± 0,58	4,60 ± 0,10
Col. Termotolerantes (NMP/g)	0,09 ± 0,01	0,13 ± 0,15	0,15 ± 0,01
Bolores e Leveduras (log UFC)	6,19 ^a ± 0,64	5,89 ^b ± 0,45	6,92 ^a ± 0,01
Psicrófilas (log UFC)	7,35 ^a ± 0,48	5,31 ^b ± 1,20	7,50 ^a ± 0,10
<i>Staphylococcus</i> spp (log UFC)	5,59 ± 0,63	5,50 ± 1,23	6,43 ± 0,01
Pesquisa de <i>Salmonella</i> (Aus/Pres)	Aus	Aus	Aus

Valores em uma mesma linha, para cada média, seguidos de diferentes letras minúsculas diferem estatisticamente ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

Tabela 5. Frequência de amostras de queijo de leite cabra “tipo coalho” comercializado no Estado da Paraíba em relação à legislação específica

Micro-organismo	Padrão *	N	De acordo		Em desacordo	
			n	%	n	%
Coliformes	5 x 10 ² (NMP/g)	30	24	80	6	20
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	2,7 (log UFC/g)	30	30	100	0	0
<i>Salmonella</i> spp.	Ausência em 25g	30	30	100	0	0

*RDC nº 12 de 02/01/01 (Brasil¹⁹).

12 amostras de queijo caprino, nas quais detectaram a ausência desse micro-organismo em todas as amostras. A pesquisa de micro-organismos psicrotrófilos em queijos se deu pelo fato destes produtos serem conservados em refrigeração, e por muitos dos micro-organismos inseridos nestes grupos apresentarem-se envolvidos na deterioração de queijos. A contagem micro-organismos psicrotrófilos nas amostras analisadas variou de 3,36 a 8,15 log UFC/g.

Do ponto de vista do crescimento e da resistência ao calor, os micro-organismos de maior importância na indústria de laticínios podem ser agrupados em: mesófilos e psicrotrófilos. Os psicrotrófilos são capazes de crescer sob refrigeração, embora a maioria encontre condições ótimas de crescimento em temperaturas maiores que 20 °C. É um grupo importantíssimo em produtos que são conservados sob refrigeração por períodos entre 1-4 semanas. Além disso, com o uso intensivo de refrigeração no manuseio do leite e seus derivados, espécies mesófilas têm sofrido adaptação seletiva, tornando-se psicrotróficas²⁹. Na indústria de queijos, os produtores têm sérios problemas com relação ao rendimento durante a produção, devido à atuação de bactérias, principalmente psicrotróficas, sobre a proteína do leite³⁰.

CONCLUSÃO

De um modo geral, os queijos de leite de cabra “Tipo Coalho” produzidos e comercializados no Estado da Paraíba se apresentaram em conformidade com a legislação prevista para umidade, no entanto, estavam em desacordo quanto ao teor lipídico, como também, continha teores elevados de proteínas, cinzas e ácido láctico.

Quanto ao perfil de ácidos graxos, há uma diferenciação em relação às procedências e quando comparadas com outros estudos, possivelmente, decorrente de variações na dieta dos animais, como também no processamento dos queijos.

Apesar da fundamental importância do queijo de leite de cabra na dieta, como significativa fonte de proteínas e cálcio, não existe padronização no seu processo de fabricação, sendo necessário o desenvolvimento de padrões de uniformidade e de uma legislação específica que contemple o processo de fabricação industrial e artesanal para produtos oriundos de matéria-prima caprina, garantindo assim, qualidade e segurança ao consumidor.

Portanto, as condições de processamento e de maturação dos queijos são imprescindíveis para a obtenção de produtos qualidade, visto que essas variáveis interferem diretamente nas características físico-químicas e no perfil de ácidos graxos desses produtos.

Quanto a qualidade microbiológica, os produtos situaram-se nos limites determinados pela legislação vigente, evidenciando característica aceitável. No entanto, a elevada contagem de micro-organismos psicrotrófilos, bolores e leveduras sugerem que de fato há uma necessidade de adoção de melhores condições higiênico-sanitárias. Ressalta-se, ainda a importância de implementação de uma Legislação Oficial para queijos de leite de cabra, permitindo uma comparação fidedigna dos resultados. Assim, a qualidade microbiológica do queijo de cabra “Tipo Coalho” apesar de situa-se dentro dos padrões preconizados, poderia vir a oferecer risco à saúde do consumidor, além de acarretar uma menor vida de prateleira ao produto

AGRADECIMENTOS

A professora Maria Lúcia da Conceição, do Laboratório de Microbiologia dos Alimentos, pela disponibilização da estrutura do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Nutrição da, Universidade Federal da Paraíba; a Vitória Regina Rodrigues Jacob pelo auxílio nos ensaios microbiológicos. Ao Prof. Alexandre Schuler, do Laboratório de Cromatografia Instrumental, da Universidade Federal de Pernambuco pelo apoio e presteza nas análises cromatográficas e ao CNPq e a UFPB pela concessão da bolsa de iniciação científica.

REFERÊNCIAS

1. Lopes MA, Carmo EA, Lima ALR, Carvalho FM. Análise de rentabilidade de uma empresa com opção de comercialização de queijo ou leite. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 2006; 58(4): 642-7.
2. Silva RR. Agrobusiness do leite de cabra. Salvador: SEBRAE, p. 63, 1998.
3. Cordeiro PRC. Opções de Mercado do Leite de Cabra e Derivados Perspectivas de desenvolvimento, industrialização e comercialização. [Acesso em: 3 fev. 2008]. Disponível em: <http://www.caprítec.com.br/art06.htm/>.
4. Katiki LM, Bonassi IA, Roça RO. Aspectos físico-químicos e microbianos do queijo maturado por mofo obtido da coagulação mista com leite de cabra congelado e coalhada congelada. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 2006; 26: 740-3.
5. Oliveira JS. Como fazer queijos: fundamentos tecnológicos. Rio de Janeiro: Tecnoprint, 1987.
6. 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.
7. Pereira DB, Silva PHF, Costa Júnior LCG, Oliveira LL. Físico-química do leite e derivados: métodos analíticos. 2 ed. Juiz de Fora: EPAMIG, 2001. p.234.
8. Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J. Biol. Chem.* 1957; 226: 497-509.
9. Hartman L, Lago RCA. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practice.* 1973; 22 (suppl 1): 475-6.
10. Vanderzant C, Spiltstoesser DF. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3 ed. Washington: APHA; 1992. p. 1219.
11. Sigmastat (programa de computador). Versão 3.1; 2009.
12. Machado EC, Ferreira CLLF, Fonseca LM, Soares FM, Pereira Júnior FN. Características físico-químicas e sensoriais do queijo minas artesanal produzido na região do Serro, Minas Gerais. *Ciênc. Tec. Aliment.* 2004; 24(4): 516-21.
13. Camacho L, Sierra C, Jarpa J, Retamal E. Avaliação de tecnologias apropriadas para elevar a qualidade sanitária y los rendimientos de queso de cabra de minifúndios. *ALAN.* 1991; 41(1): 80-91.
14. Cavalcante JFM, Andrade NJ, Furtado MM, Ferreira CLLF, Pinto CLO, Elard E. Processamento do queijo coalho regional empregando leite pasteurizado e cultura láctica endógena. *Ciênc. Tec. Aliment.* 2007; 27: 205-14.
15. Brasil. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria nº 352 1997 . Aprova o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de Queijo de Coalho. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 1997. [Acesso em 21 jun. 2008]. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2194>
16. Williams C. Dietary fatty acids and human health. *INRA Annales Zootech.* 2000; 49: 165-180.
17. Soryal K, Beyene FA, Zeng B, Bah B, Tesfaic K. Effect of goat bread and milk composition on yield, sensory quality, fatty acid concentration of soft cheese during lactation. *Small Rumin. Res.* 2005; 58: 275-81.
18. Lucas A, Rock's C, Agabriel L, Chilliard Y, Coulon JB. Relationships between animal species (cow versus goat) and some nutritional constituents in raw milk farmhouse cheeses. *Small Rumin. Res.* 2008; 74(1-3): 243-8.
19. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Resolução nº 12, de 2 de jan. de 2001 do. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2 jan. de 2001.
20. Contreras, A. et al. Persistence of subclinical intramammary pathogens in goats throughout lactation. *Journal of Dairy Science.* 1997; 80: 2815-9.
21. Murici RF, Sella A, Silva LE, Schmidt V, Cardoso MI. Identificação de pontos de contaminação do leite produzido em uma propriedade de caprinos no município de Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil. *Rev. Fac. Zootec. Vet. Agron.* 2002; 9: 111-7.
22. Santos AR, Scherer S, Schmidt V. Validação da contagem de células somáticas e do califórnia mastitis test como método diagnóstico da mamite subclínica em caprinos. *Rev. Ciênc. Agrovet.* 2004; 3: 50-5.
23. Bessa R, Alves M, Ravasco F, Vital A, Duthoit M, Miranda R, Assis G, Barbosa M. Queijo de Cabra Transmontano. Aprofundamento da caracterização do leite de cabra Serrana, ecotipo transmontano e do respectivo queijo DOP. [Acesso em: 17 fev. 2009]. Disponível em: <http://www.ancras.pt/pdf/2-2%20Manuela%20Barbosa.pdf>.
24. Almeida Filho ES, Nader Filho A. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo "frescal". *Rev. Saúde Pública.* 2000; 34: 578-80.
25. Picoli SU, Bessa MC, Castagna SMF, Gottardi CPT, Schmidt V, Cardoso M. Quantificação de coliformes, *Staphylococcus aureus* e mesófilos presentes em diferentes etapas da produção de queijo frescal de leite de cabra em laticínios. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 2006; 26: 64-9.
26. Leuthier SMF, Trigueiro INS, Rivera F. Condições higiênico-sanitárias do queijo de leite de cabra "tipo coalho", artesanal elaborado no curimataú paraibano. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 1998; 18: 176-8.
27. Gutierrez LM, Carballo J, Vidal I. Evolución de los principales grupos de micro-organismos durante la elaboración y maduración del queso de Valdeteja. *Anais Fac. Vet.* 1988; 34: 119-126.
28. Siqueira RS. Manual de microbiologia de alimentos. Brasília: EMBRAPA, 1995.
29. Perry KSP. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. *Quim. Nova.* 2004; 27: 293-300.
30. Silveira IA, Carvalho EP, Teixeira D. Influência de micro-organismos psicotróficos sobre a qualidade do leite refrigerado. Depto de Ciências dos Alimentos - Universidade Federal de Lavras - MG. *Rev. Hig. Aliment.* [Acesso em: 17 fev. 2009]. Disponível em: <http://www.bichoonline.com.br/artigos/ha0005.htm>.

Composição nutricional da carne da tartaruga-da-Amazônia (*Podocnemis expansa*) criada em cativeiro e em idade de abate

Nutritional composition of meat from tartaruga-da-Amazônia (Amazonian turtle) *Podocnemis expansa* bred in captivity and at slaughter age

RIALA6/1239

Arlene GASPAR¹, Teófilo José Pimentel SILVA²

*Endereço para correspondência: UFRRJ-IT-DTA - BR 465, Km 7 - 28890-000 - Campus Universitário - Seropédica - RJ - Tel: (21) 3787-5831

e-mail: arlene@ufrj.br

¹Departamento de Tecnologia de Alimentos - UFRRJ

²Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal Fluminense - UFF

Recebido: 20.10.2008 - Aceito para publicação: 07.12. 2009

RESUMO

O consumo de carne de animais silvestres que há muito tempo é realidade entre a população rural, atualmente tem-se tornado como uma opção crescente nos grandes centros urbanos, e a carne de Tartaruga-da-Amazônia tem acompanhado esse crescimento. No entanto, pouco se conhece sobre a qualidade nutricional da carne de tartaruga-da-Amazônia (*Podocnemis expansa*) criada em cativeiro. Elaborou-se um experimento em parceria com o CENAQUA (Centro Nacional de Quelônios do Amazonas) e a Pró-fauna (localizada em Iguape - SP) com o objetivo de estudar a composição a, os teores de ácidos graxos, de colesterol e de minerais da carne dessa espécie, que são criadas em cativeiro na região do centro-oeste brasileiro. Avaliou-se a carne de 14 animais (sete fêmeas e sete machos). A carne apresentou coloração semelhante à da carne de frango. Quanto à composição química, os resultados foram: o teor protéico variou de 16,68 a 18,02%; lipídeos de 2,61% a 1,88; colesterol de 49,86 a 50,71 mg/100g; valor calórico de 88,92 a 89,30 Kcal/100g, respectivamente para animais fêmeas e machos. A carne de tartaruga-da-Amazônia mostrou ser rica em ácidos graxos w9 (ácido oléico e araquidônico) e em cálcio, fósforo e potássio.

Palavras-chave. tartaruga-da-Amazônia; composição nutricional, colesterol, carne de tartaruga.

ABSTRACT

The human beings require the protein sources for their organisms, which usually are provided by animal origin. For this purpose, the consumption of wild animal meat has been an option, usually at rural regions. Lately, the consumption of these types of meat has been increasing by people living in urban centers, including the turtle meat. Nevertheless, there is no records on the quality of the meat of turtles bred in captivity conditions. Thus, an experiment was carried out in a joint work with CENAQUA (Centro Nacional de Quelônios do Amazonas - National Center for Amazonian Chelonian) and Pro-fauna (Iguape - São Paulo) with the objective to study the meat quality of Amazon turtle bred in captivity. The study was performed in two groups of animals (seven female and seven male). The turtle meat had the similar coloration to chicken meat. Protein contents ranged from 16.68 to 18.02%, lipid contents from 2.61 to 1.88%, cholesterol amount from 49.86 to 50.71 mg/100g, caloric value from 88.92 to 89.30 Kcal/100g for females and males, respectively. The turtle meat was rich in fat acids (oleic and arachidonic acid), as well as in calcium, phosphate and potassium contents.

Key words. nutritional composition, turtle, meat.

INTRODUÇÃO

A carne de animais silvestres, em diversos países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, tem sido uma das principais fontes proteicas, e foi a principal fonte de carne na era pré-histórica. Entretanto especialistas em alimentos desconhecem, em grande parte, a importância do consumo desse tipo de carne, por dificuldades em se encontrar dados sobre qualidade, captura, mercado e consumo desse tipo de carne.

Não somente com o objetivo de se obter proteínas, os animais silvestres, muitas vezes são levados à beira da extinção por caças predatórias, com intuito de se obter peles e couros para exportação, e também pelo tráfico de animais vivos, exportados para outros países através de contrabandistas. Esses traficantes exploram os caçadores e trabalhadores rurais, principalmente os das comunidades mais pobres, pagando-os preços irrisórios, ficando os maiores lucros para os comerciantes poderosos e os exportadores. Esse comércio ilegal não leva nenhuma melhoria de vida à área rural e coloca em risco de extinção várias espécies.

A fauna brasileira constitui-se uma fonte importante de alimentos, diversas espécies como aves, pacas, cervos, capivaras, tatus, tartarugas, etc., são citadas como fonte proteica para as populações rurais. Em regiões onde não é permitido o desmatamento para plantio e para criação de animais domésticos (bovino e suíno), pois trariam danos ao meio ambiente, a criação de animais silvestre é uma alternativa.

As tartarugas pertencem ao Filo: Cardados; Sub-filo: Vertebrados; Superclasse: Tetrápodos; Sub-classe: Anapsia; Classe: dos Répteis; Ordem: Quelônios; Sub-ordem: Pleurodiros; Família: Pelomedusidae; Espécie: *Podocnemis expansa*¹. As espécies *Podocnemis expansa* e *Podocnemis unitilis*, são encontradas na bacia do rio Amazonas, incluindo o Brasil, Colômbia, Peru, Amazônia Boliviana e na bacia do rio Orinoco incluindo a Colômbia e Venezuela^{2,3}.

O objetivo desse experimento foi avaliar e comparar a composição centesimal, o teor de ácidos graxos, colesterol e minerais presentes na carne de tartarugas-da-Amazônia, fêmeas e machos, criadas em cativeiros, abatidas com idades variando de 2 a 3 anos.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizou-se carne de 14 tartarugas, sendo 7 fêmeas e 7 machos, com idade aproximada de 2 a 3 anos e peso

médio de 1,5 a 2,5kg, escolhidas aleatoriamente, oriundas de criatórios registrados no IBAMA, localizados em Diorama - Goiás. Os animais foram criados em lagoas artificiais, e alimentados à base de vegetais e legumes, e complementação com ração para peixes.

As amostras foram trituradas, homogeneizadas e analisadas em triplicatas. Para determinação do teor de umidade, cinzas e proteína seguiram-se metodologia de Brasil⁴. Para o teor de lipídeos seguiu-se metodologia descrita por Bligh e Dyer⁵. O valor calórico total foi obtido segundo Brasil⁶ e expresso em Kcal/100g.

A determinação do teor de ácidos graxos seguiu metodologia proposta por Hartmann e Lago⁷, a quantificação foi por cromatografia gasosa, com detector de ionização em chama, injetor Splitter splitterless, coluna capilar de sílica fundida (CP-SIL 88) com 100 m x 0,25 mm de diâmetro interno e 0,20 µm de espessura, temperatura inicial da coluna: 170 °C e final de 210 °C; Tempo inicial: 10 min e final 70 min; taxa de programação (Ratio): 2 °C/min; razão de divisão de fluxo em 1:100; temperatura do injetor: 280 °C; temperatura do detector: 280 °C; vazão da fase móvel (H₂): 1,0 mL/min; vazão do gás auxiliar (N₂): 30,0 mL/min e vazão do ar: 300 mL/min. A identificação dos ácidos graxos foi realizada através da comparação de tempo de retenção dos ésteres metílicos das amostras com um padrão de ácidos graxos contendo 37 ácidos graxos (SUPELCO).

Para extração do colesterol utilizou-se metodologia proposta por Kovacs et al.⁸. A quantificação foi por cromatografia gasosa, utilizando-se coluna capilar de sílica fundida (CP - SIL 8) com 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura; temperatura isotérmica da coluna: 270 °C; razão de divisão de fluxo de 1:100; temperatura do injetor: 280 °C; temperatura do detector: 280 °C; vazão da fase móvel (H₂): 1,0 mL/min; vazão do gás auxiliar (N₂): 30,0 mL/min; vazão do ar: 300 mL/min; vazão do H₂: 30,0 mL/min; volume injetado: 1µL. A identificação do colesterol foi através de padronização interna utilizando como padrão o 5 α colestano-3-ona (SIGMA), e a quantificação por comparação de tempo de retenção do colesterol padrão (SIGMA) com o tempo de retenção do colesterol da amostra.

A determinação de Manganês (Mn), Potássio (K), Sódio (Na), Zinco (Zn), Cobre (Cu), Cobalto (Co), Ferro (Fe), Magnésio (Mg) foi segundo metodologia descrita por Nishikawa⁹. Para Cálcio (Ca) e Fósforo (P) seguiu-se a metodologia descrita em Brasil⁴.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste t, com 1 % e 5% de significância, utilizando o software Sisvar 4.3¹⁰.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios da composição centesimal, teor de colesterol e do valor calórico da carne de tartaruga-da-amazônia estão descritas na Tabela 1. A carne dos machos apresentou maior teor de umidade, proteína e cinzas e menor teor de lipídeos ($p < 0,01$). O valor calórico não apresentou diferença significativa entre os sexos. Cada 100g da carne de tartaruga fornece em média 89 kcal.

Quanto ao teor de colesterol na carne dos machos foi mais elevado, porém esses resultados não deferiram significativamente ($p > 0,01$). Uma porção de 100g de carne de tartaruga pode suprir em média 34% das necessidades diárias de proteínas e 2,5% de gordura total, para uma dieta de 2.000 kcal.

O depósito de gordura na carne de tartaruga encontra-se principalmente entre os músculos. Entretanto, maior depósito de gordura nesses animais foi observado na estrutura do casco e em compartimentos que existem entre a inserção do casco com o plastrão. A carne de tartaruga mostrou-se bem saborosa e macia, porém com menor suculência.

Comparando-se os resultados de proteínas e lipídeos (média entre os sexos de 17,35% e 2,3%, respectivamente) com os obtidos por Luz et al¹¹ (17,37% e 1,09%, respectivamente) observou-se resultados bem semelhantes. Análises realizadas por Gaspar & Rangel Filho¹² mostraram resultados também semelhantes aos obtidos nesse experimento, enfatizando que essa carne é magra, com coloração semelhante à carne de frango, e baixo valor calórico. Esses resultados também não diferem

dos resultados obtidos por Alian et al.¹³ que ao avaliaram a carne de tartaruga marinha (*C. Caretta*) obtiveram teores médios para umidade de 79%, proteína de 18,2% e lipídeos de 1%.

A carne da tartaruga-da-Amazônia tem em média 50 mg/100g de colesterol, esse teor corresponde a 17% do teor máximo recomendado para ingestão diária. Não foi observada diferença significativa entre os sexos. A carne de tartaruga-da-Amazônia apresentou teor de colesterol mais baixo quando comparado com os teores encontrados por Ruitter¹⁴ em truta (58 mg) e carpa (66 mg). Entretanto Challiol et al.¹⁵ ao estudaram a carne de tartaruga marinha (*C. mydas*) determinaram o colesterol na carne, no fígado e na gordura dos animais criados em cativeiro, obtendo resultados de 4 mg/100 g na carne e de 350 mg e 1200 mg/100 g para o fígado e a gordura, respectivamente. Este teor baixo de colesterol na carne se deve provavelmente ao tipo de alimentação, ao manejo e mesmo a diferença de espécie e habitat.

Avaliando os teores de ácidos graxos da gordura presente na carne das tartaruga-da-amazônia (Tabela 2) observou-se que a maioria dos ácidos graxos não apresentaram diferenças significativas entre os sexos. Somente os ácidos C₁₅, C_{20:4} e C₂₃ foram significativamente ($p < 0,05$) superiores para a carne dos machos. Ambos os sexos apresentaram teor elevado de gordura saturada.

Os ácidos graxos presentes em maior quantidade foram o palmítico, margárico, esteárico, oleico, linoleico e araquidônico. Entre os ácidos graxos de maior importância alimentar, observamos que a carne dos machos apresentou maior riqueza em ácido araquidônico. Quanto aos ácidos graxos Omega (ω) esta carne apresentou em média 11% de ω -6 e 20% de ω -9. Não foi detectado nenhum ácido graxo ω -3. Entre todos os ácidos graxos presentes o ácido palmítico é o que apresentou maior percentual.

Tabela 1. Valores médios da composição centesimal, teor de Colesterol e do valor calórico da carne de tartaruga-da-amazônia

Sexo	n	Umidade (%)	Proteína (%)	Lipídeos (%)	Cinzas (%)	Colesterol (mg/100g)	Valor calórico (kcal/100g)
Fêmea	7	78,65 ^b (±0,10)	16,68 ^b (±0,29)	2,61 ^a (±0,43)	0,80 ^b (±0,01)	49,86 ^a (±4,88)	88,92 ^a (±3,80)
Macho	7	78,91 ^a (±0,09)	18,02 ^a (±0,47)	1,88 ^b (±0,10)	0,91 ^a (±0,06)	50,71 ^a (±4,86)	89,30 ^a (±2,50)

^{a, b} Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna, indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p < 0,01$)

Segundo Vianni & Braz-Filho¹⁶ esse ácido é amplamente distribuído na natureza e ocorre praticamente em todos os óleos e gorduras de plantas e animais aquáticos e terrestres. Esse ácido funciona como precursor dos ácidos graxos saturados e insaturados de cadeia mais longa. O ácido margárico e esteárico também estão presentes em percentuais bem elevados. A presença dos ácidos palmítico e esteárico determina o ponto de fusão elevado nas gorduras, e a gordura de tartaruga-da-amazônia é sólida à temperatura ambiente. Apesar do elevado teor de ácido esteárico, este é considerado neutro em relação às concentrações plasmáticas de colesterol, pois segundo Schaefer & Brousseau¹⁷ ele é rapidamente convertido à ácido oleico pelo organismo. O ácido oleico é o segundo maior percentual presente na carne de tartaruga-da-amazônia. Dentre os ácidos monoinsaturados, este é o mais amplamente distribuído na natureza. Este ácido segundo Sinclair¹⁸ é um ácido

graxo hipocolesterolêmico. Pesquisas têm demonstrado que as concentrações de colesterol diminuem com a ingestão de ácidos graxos monoinsaturados *cis* (GRUNDY¹⁹). O ácido graxo linoleico é um ácido essencial e está presente na carne de tartaruga em percentual médio de 4%. O ácido araquidônico é encontrado em um percentual bastante elevado em torno de 7,5%, também considerado essencial. Esses ácidos são importantes na produção de energia, no desenvolvimento, no metabolismo celular e atividade muscular, e indispensável na produção de prostaglandina (UAUY et al.²⁰). O percentual de ácido araquidônico determinado na carne da tartaruga-da-Amazônia foi semelhante ao teor determinado em tartaruga marinha por Challiol et al.¹⁵. Esse teor elevado de ácido araquidônico concorda com trabalho realizado por Nair & Gopakumar²¹ que observaram teores mais elevados em pescado de águas mais quentes.

Tabela 2. Valores médios do teor de ácidos graxos (g/100g) presente na gordura da carne de 14 tartaruga-da-Amazônia

Ácidos graxos	Sexo	
	Fêmea	Macho
Ác. Mirístico C _{14:0}	3,46a (±0,28)	3,61a ±0,16)
Ác. Miristoleico C _{14:1}	0,58 a (±0,04)	0,55 a (±0,07)
Ác. Pentadenóico C _{15:0}	1,73b (±0,40)	2,17a ±0,35)
Ác. Palmítico C _{16:0}	33,15a (±1,45)	33,05a ±3,73)
Ác. Palmitoleico C _{16:1}	1,58a (±0,18)	1,68a ±0,16)
Ác. Margárico C _{17:0}	12,68a (±0,41)	12,50a (±0,18)
Ac. Margaricoleico C _{17:1}	0,85 a (±0,24)	0,92 a (±0,11)
Ác. Esteárico C _{18:0}	11,60 a (±0,67)	11,28 a (±0,90)
Ác. Oleico C _{18:1} ω9	19,90 a (±1,80)	19,78 a (±0,94)
Ác. Linoleico C _{18:2} ω6	3,97a (±0,89)	4,25a (±0,65)
Ác. Eicosenóico C _{20:1} ω9	0,62a (±0,05)	0,62a (±0,03)
Ác. Araquidônico C _{20:4} ω6	7,30b (±0,30)	7,67 a (±0,28)
Ac. Tricosanóico C _{23:0}	0,89b (±0,21)	1,18a (±0,23)
Ác. graxos saturados	63,51	63,79
Ac. graxos monoinsaturado	23,53	23,64
Ac. graxo poli-insaturado	11,27	11,92

^{a, b} Médias seguidas de letras diferentes entre colunas, indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey (p<0,05).

Os ácidos graxos encontrados nesse experimento foram em maior percentual de saturados (63%), seguido de monoinsaturados (23%) e de poli-insaturados (11%). Esses resultados podem ser comparados aos resultados obtidos por Challiol et al.¹⁵ comparando o teor de ácidos graxos na carne de *C. mydas* de vida selvagem e criada em cativeiro, sendo as de cativeiro, abatidas com 3 anos de idade, observaram um teor de gordura saturada de 39,5% e 35,9% e poli-insaturada de 50,4% e 51,4%, respectivamente. Detectaram teor de ácido araquidônico bem mais elevado em animais de vida livre. Os resultados obtidos para tartaruga-da-amazônia são concordantes aos obtidos por Alian et al.¹³ que detectaram teores de gordura saturada de 68,58% e poli-insaturada de 31,42%, observando também um teor de ácido oleico de 16,66%. O teor mais elevado de gordura saturada encontrada na tartaruga-da-amazônia (*P. expansa*), que são provenientes de águas com temperaturas mais elevadas, condizem com os resultados obtidos por Ruitter¹⁴ que demonstrou que animais provenientes de locais com temperaturas mais elevadas têm lipídeos com maior teor de gorduras saturadas. A carne da tartaruga-da-amazônia diferiu da carne de peixes, pois não foi identificado nenhum ácido graxo da família ω -3, seus ácidos graxos. Em pescado normalmente as cadeias são longas e compostas por ácidos graxos com quatro, cinco e seis duplas ligações. Segundo Ogawa &

Maia²² os lipídeos de pescado contêm ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa da família ω -3, sendo essa tendência mais clara em pescados marinhos do que de água doce. A composição de lipídeos não é fixa, podendo variar um pouco conforme a alimentação e a época do ano.

A carne da tartaruga-da-Amazônia apresentou-se como boa fonte de minerais (Tabela 3). Observou-se diferença significativa ($p < 0,01$) para os elementos: sódio, cobre, magnésio, cálcio e fósforo. Na carne das fêmeas o teor de sódio e magnésio foi mais elevado que a carne dos machos. Entretanto a carne dos machos apresentou-se com maiores teores de cobre, cálcio e fósforo.

A carne de tartaruga marinha (*C. Carretta*) apresentou teores elevados de sódio (478 mg/100g), cálcio (106 mg/100g), ferro (85 mg/100g), zinco (3 mg/100g), cobre (94 mg/100g), manganês (5 mg/100g) e magnésio (37 mg/100g) (ALIAN et al.¹³).

A carne de tartaruga-da-Amazônia tem teores de cálcio muito superior (média de 189 mg para fêmeas e 242 mg para os machos) aos encontrados na carne bovina (7 mg), de frango (12 mg), avestruz (8 mg), carpa (40 mg), truta (32 mg) e das tartarugas marinhas (106 mg) (USDA²³, 1976; ALIAN et al.¹³, 1986; RUITER¹⁴). Uma porção de 100g dessa carne suprem em até 24% e 30% respectivamente, da ingestão requerida para cálcio diariamente (BRASIL⁶).

Tabela 3. Teor médio de minerais (mg/100g) presente na carne de tartaruga-da-amazônia

Minerais	Sexo	
	Fêmea	Macho
Manganês (Mn)	0,24 ^a ±0,05	0,30 ^a ±0,06
Potássio (K)	1189,57 ^a ±6,58	1190,28 ^a ±7,94
Sódio (Na)	369,71 ^a ±4,35	351,00 ^b ±7,69
Zinco (Zn)	5,77 ^a ±0,30	5,60 ^a ±0,39
Cobre (Cu)	0,34 ^b ±0,13	0,56 ^a ±0,14
Cobalto (Co)	0,23 ^a ±0,05	0,23 ^a ±0,05
Ferro (Fe)	5,61 ^a ±1,00	6,10 ^a ±0,66
Magnésio (Mg)	65,86 ^a ±5,08	60,57 ^b ±2,66
Cálcio (Ca)	189,57 ^b ±6,16	242,00 ^a ±14,82
Fósforo (p)	524,14 ^b ±2,67	536,00 ^a ±11,49

^{a, b} Médias seguidas de letras diferentes entre colunas, indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p < 0,01$)

Diferentemente dos animais domésticos, os organismos aquáticos absorvem os minerais de suas dietas e da água circundante. Estudo realizado na Rússia, utilizando pescado oriundo de diferentes lagos, mostrou que a quantidade de manganês, ferro, cobre e zinco presente no músculo e no fígado, refletia as características geoquímicas da terra circundante ao lago. Geralmente se recomenda o consumo de pescado como fonte de zinco e ferro, pois o músculo escuro do pescado tem tanto ferro quanto à carne vermelha (RUITER¹⁴).

A ingestão de carne de tartaruga-da-amazônia pode ser recomendada a hipertensos, pois segundo Mc Carron et al²⁴ e Griffith et al.²⁵ o cálcio tem efeito benéfico sobre a pressão sanguínea, pois pessoas que consumiam menor teor de cálcio desenvolviam hipertensão. Com teor elevado de potássio, 100g da carne supre até 60% das necessidades diárias recomendadas pela Food and Nutrition Board²⁶, esta carne atende bem as necessidades dos hipertensos, pois segundo a American Heart Association²⁷ níveis dietéticos baixos de cálcio e potássio são uma das causas do desenvolvimento da hipertensão.

Com teor médio de 530 mg de fósforo 100g da carne de tartaruga-da-amazônia fornece ao organismo 66% da ingestão diária sugerida por Brasil⁶. O fósforo é essencial na constituição dos ossos e na contração muscular.

Apesar de ser uma carne branca, muito semelhante a carne de frango, ela tem um teor elevado de ferro (em média de 6 mg/100g), esse valor supre em 43% da ingestão diária (Brasil⁶). A carne de tartaruga-da-amazônia tem teor mais elevado de ferro que a carne de avestruz (2,3 mg), bovino (2,1 mg), frango (0,9 mg), carpa (1,1 mg) e truta (0,4 mg), porém teores menores que os descritos para tartarugas marinhas (85 mg) (USDA²⁴, 1976; ALIAN et al.¹³; RUITER¹⁴). Segundo Sandstead²⁸ baixo consumo de alimentos ricos em ferro e zinco como carne, particularmente vermelha, e consumo elevado de alimentos ricos em inibidores da absorção desses minerais, como certas fibras dietéticas e cálcio, pode levar a deficiência desses elementos no organismo.

O teor de sódio determinado supre em 15% da ingestão diária (Brasil⁶). Esta carne mostrou-se com teores mais elevados que a carne de avestruz, bovino, frango, truta e carpa. As tartarugas marinhas apresentaram carne de teores mais elevados de sódio, esse fato pode ser explicado pelas altas concentrações de sódio na água do mar.

O teor de zinco foi em média 5,6%, correspondendo a 37% da ingestão diária (Brasil⁶). A carne de tartaruga-da-amazônia pode ser considerada boa fonte de zinco. O zinco é considerado um elemento antioxidante e atua em funções cerebrais, e sua ingestão ajudaria a reduzir o teor de lipídeo e o LDL-colesterol sanguíneo (EL HENDY et al.²⁹). Esta carne contém mais zinco que a carne de avestruz (2 mg), bovino (4,3 mg), frango (1,5 mg), truta (0,5 mg), carpa (1,5 mg) e *C. carreta* (3 mg). A tartaruga *C. mydas* tem teor similar (5 mg) (USDA²³, 1976; ALIAN et al.¹³; RUITER¹⁴).

O teor de cobre foi detectado em menor quantidade na carne de fêmeas (0,34 mg) que dos machos (0,56 mg), sendo que esses teores suprem em média 15% das necessidades diárias. O cobre é essencial para imobilização do ferro na síntese de hemoglobina, mioglobina, citocromos, e atua também como antioxidante, e contribui na síntese de elastina e colágeno (PREZIOSI et al.³⁰).

O teor de magnésio é mais elevado nas fêmeas (65 mg), que supre em média 22% das necessidades diárias, e é maior que na carne de tartaruga *C. carreta*, porém inferior ao encontrado na carne de *C. mydas*.

CONCLUSÃO

A carne das tartarugas-da-amazônia (*P. expansa*) macho apresentou menor teor de lipídeos e maior teor proteico, baixo teor de colesterol e valor calórico. Apesar de ser uma carne rica em gordura saturada, apresenta um teor elevado de ácidos graxos $\omega 6$ e $\omega 9$, principalmente de ácido graxo oleico e araquidônico. Esta carne apresentou-se como boa fonte de minerais, rica em potássio, cálcio, fósforo, ferro, zinco, etc.

REFERÊNCIAS

1. Storer TI, Usinger R. Zoologia Geral. 5ª ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional; 1979. 230p.
2. Freiberg, MA. Turtles of South America. Neptune City: TFH Publications; 1981. 780p.
3. Pritchard PCH, Trebbau P. The turtles of Venezuela. Oxford: Society of the Study of Anplibians and Reptiles, 1984. p. 43-57.
4. Brasil. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 20, de 21 de julho 1999. Métodos analíticos físico-químicos para controle de produtos cárneos e seus ingredientes – sal e salmoura. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 1999.

- Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal Biochemistry and Physiology*, 1959. 57:59-65.
- Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Aprova Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 2003.
- Hartman L, Lago RCA. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practic*, 1973. 22(6):475-79.
- Kovacs MIP, Andersos WE Ackman RG. A simple method for the determination of cholesterol and some plant sterols in fishery-based food products. *Journal Food Science*, 1979. 44:1299-305.
- Nishikawa, AM. Preparação de amostras de produtos cárneos e pescado para análises de metais. Anais do IV Encontro Nacional sobre Contaminantes Inorgânicos, 1994. 46-
- Sisvar 4.3. 2003. Disponível em: <http://www.dex.ufpa.br/danielff/sisvar>. Acesso em 10/01/2006.
- Luz VLE, Stringhini JH, Bataus YS L, Fernandes ES, Paula WA, Novais MN, Reis IJ. Rendimento e composição química de carcaça da tartaruga-da-Amazônia (*Podocnemis expansa*) em sistema comercial. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 2003. 32(1):1-9.
- Gaspar A, Rangel-Filho FB. Utilização de carne de tartarugas da Amazônia (*Podocnemis expansa*), criadas em cativeiro, para consumo humano. *Higiene Alimentar*, 2001. 89(5):73-8
- Alian AM, Sallam YI, Dessouki TM, Atia AM. Evaluation and utilization of turtle meat: Physical and chemical properties of turtle meat. *Egyptian Journal. Food Science*, 1986. 14(2):341-50.
- Ruiter A. El pescado y los productos derivados de la pesca: Composición, propiedades nutritivas y estabilidad. Zaragoza, Espanha: Ed. Acribia S.A. 1999. 416p.
- Challiol J, Guerere M, Bonnet B, Pajaniaye A. Les lipids de la tortue verte *Chlonia mydas*: Comparación entre animaux sauvages et animaux d'élevage. *Ann. Fals. Exp. Chim.* 1983. 76(818):237-44.
- Vianni R, Braz-Filho R. Ácidos graxos naturais: Importância e ocorrência em alimentos. *Química Nova*, 1996. 19(4):400-7.
- Schaefer EJ, Brousseau ME. Diet, lipoproteins, and coronary heart disease. *Endocrin Metab Clin North American*, 1998. 27:711-32.
- Sinclair AJ. Dietary fat and cardiovascular disease: the significance of recent developments for the food industry. *Food Australia*, 1993. 45(5):226-31.
- Grundy SM. Comparison of monounsaturated fatty acids and carbohydrates for lowering plasma cholesterol. *New England Journal Medicine*, 1986. 314:745-8.
- Uauy R, Mena P, Valenzuela A. Essential fatty acids as determinants of lipids requirements in infants, children and adults. *European Journal Clinical Nutrition*, 1999. 53(1.1):66-7.
- Nair PGV, Gopakumar K. Fatty acid compositions of 15 species of fish from tropical waters. *Journal. Food Science*. 1978. 43:1162-4.
- Ogawa M, Maia EL. Manual de pesca. Ciência e tecnologia do pescado. V. I, São Paulo: Ed. Varela, 1999. 430p.
- USDA - United States Department of Agriculture. Composition of food: Poultry Products, Washington DC: USA: Agriculture Handbook, 1979. 8:5 - 8.
- Mc Carron DA, Morris CD, Cole C. Dietary calcium and human hypertension. *Science*, 1982. 217:267-9.
- Griffith L, Guyatt GH, Cook, RJ Bucher HC, Cook D J. The influence of dietary and nondietary calcium supplementation on blood pressure: an updated metaanalysis of randomized clinical trials. *American Journal Hypertens*, 1999. 12:84-92.
- Food and Nutrition Board. Recommended Dietary Allowances, 10th ed., Washington, D.C: National Academy Press, 1989. 230p.
- American Heart Association - AHA. Heart and Stroke Statistical Update, American Heart Association, Dallas, 2000. 135 p.
- Sandstead HH. Causes of iron and zinc deficiencies and their effects on brain. *Journal Nutrition*, 2000. 130:347-9.
- El Hendy HA, Yousef MI, El-Naga NIA. Effect of dietary zinc deficiency on hematological and biochemical parameters and concentrations of zinc, copper, and iron in growing rats. *Toxicology*, 2001. 167(2):163-70.
- Preziosi P, Prual A, Pilar G, Daouda H, Boureima H, Hercberg S. Effect of iron supplementation on the iron status of pregnant women: consequences for newborns. *American Journal Clinical Nutrition*, 1997. 66:1178-82.

Qualidade nutricional e aceitabilidade de barras de cereais adicionadas de frutos de murici-passa

Nutritional quality and acceptability of cereal bars added of murici dried fruits

RIALA6/1240

Marília Mendonça GUIMARÃES^{1*}, Maria Sebastiana SILVA²

*Endereço para correspondência: Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Goiás. Rua 227, Qd. 68, s/n. Setor Leste Universitário. CEP 74.605-080. Goiânia, GO, Brasil. mg.marilia@bol.com.br

¹Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil

²Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Faculdade de Educação Física da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil.

Recebido: 05.10.2009 – Aceito para publicação: 07.12.2009

RESUMO

As barras de cereais são produtos alimentícios obtidos da compactação de cereais, frutas secas, castanhas, aromas e ingredientes ligantes, que são utilizadas como opção de lanche rápido e saudável. Este trabalho teve como objetivo avaliar a aceitabilidade, aparência e qualidade nutricional de barras de cereais, adicionadas de diferentes concentrações de um fruto do cerrado processado como passa (murici-passa). Foram preparadas cinco formulações de barra de cereal com proporções crescentes de murici-passa em substituição à banana-passa [BCM₀ – 100% banana (controle), BCM₂₅ – 25% murici e 75% banana, BCM₅₀ – 50% murici e 50% banana, BCM₇₅ – 75% murici e 25% banana, BCM₁₀₀ – 100% murici]. As formulações foram analisadas quanto aos teores de umidade, cinzas, proteínas, lipídeos e carboidratos totais por diferença, fibra alimentar e aceitabilidade. As barras de cereais apresentaram em média 10,00% de umidade, 76,00% de carboidratos totais, 4,70% de lipídeos, 7,30% de proteínas e 1,20% de cinzas. A adição do murici-passa às barras de cereais aumentou o teor de fibras e favoreceu a análise de aparência, e a aceitabilidade foi satisfatória na proporção 75:25 de banana-passa e murici-passa. A adição de murici-passa proporcionou sabor diferenciado e incrementou a aparência e a qualidade nutricional das barras de cereais, contribuindo para valorização desse fruto regional na alimentação humana.

Palavras-chave. Barras de cereais, murici-passa, qualidade nutricional, aceitabilidade.

ABSTRACT

Cereal bars are prepared by compressing the cereals and adding dried fruits, chestnuts, flavorings and ligand components, which are taken as a fast and healthy snack option. The use of regional fruits in the formulation of cereal bars valorizes the fruit and the final product, but also it contributes for preserving the native fruit species and to regard respect to the local nourishment habits. The objective of this investigation was to evaluate the best concentrations of murici dried fruit added into cereal bars for improving the acceptability, appearance and nutritional quality. Five formulations of cereal bars were prepared, to which the dried banana was replaced by increasing portions of murici dried fruit [BCM₀ – 100% banana (control), BCM₂₅ – 25% murici and 75% banana, BCM₅₀ – 50% murici and 50% banana, BCM₇₅ – 75% murici and 25% banana, BCM₁₀₀ – 100% murici]. The formulations were analyzed on levels of moisture, ash, proteins, lipids and total carbohydrates by difference, total dietary fiber, and product acceptability. The cereal bars showed on average values of moisture of 10.00%, 76.00% of total carbohydrate, 4.70% of lipids, 7.30% of protein and 1.20% of ash. The addition of dried murici to cereal bars increased the fiber contents and improved the product appearance, while the acceptability was greater in cereal bars containing dried banana and dried murici in 75:25 proportion. In conclusion, the addition of dried murici into foods as cereal bars is suitable, considering that this fruit evidenced a differentiated flavor, appearance and nutritional quality, which will also highly regard the use of regional food for human nourishment.

Key-words. Cereal bars, murici dried, nutritional quality, acceptability.

INTRODUÇÃO

Durante muitos anos, os *snacks* foram considerados como alimentos de baixo valor nutricional. No entanto, devido ao crescente interesse do consumidor em alimentos benéficos à saúde, estão sendo produzidos, cada vez mais, *snacks* conceituados saudáveis, com adequado aporte de macro e micronutrientes¹. Como exemplo, destaca-se as barras de cereais.

Barras de cereais são produtos obtidos da compactação de cereais, contendo frutas secas, castanhas, aromas e ingredientes ligantes². São utilizadas como opção de lanche rápido e saudável, substituindo os *snacks* tradicionais, ricos em sódio e lipídeos, cujo consumo excessivo pode contribuir com o desenvolvimento de doenças crônicas.

Os ingredientes utilizados na formulação das barras de cereais são misturas de cereais, frutas secas e castanhas, xarope de milho, mel, açúcar ou lecitina e aromas². Dentre os cereais, a aveia (*Avena sativa L.*) é a mais amplamente utilizada na formulação de barras de cereais devido ao seu teor e qualidade proteica, predominância de ácidos graxos insaturados e composição de fibras alimentares³.

Por outro lado, a adição de frutas desidratadas às barras de cereais aumenta o seu teor de fibras, modifica o valor energético⁴ e realça o sabor destes produtos alimentícios, contribuindo para melhorar a aceitabilidade dos consumidores.

As práticas alimentares saudáveis devem ter como enfoque prioritário o resgate dos hábitos alimentares regionais, produzidos em nível local e de alto valor

nutritivo⁵. Assim, o uso de frutas regionais para a formulação de barras de cereais além de agregar valor ao fruto e ao produto, contribui para a preservação da espécie nativa e a valorização dos hábitos alimentares locais. O murici (*Byrsonima verbascifolia*) é um fruto do cerrado de amarelo intenso, sabor e aroma exótico, regionalmente consumido *in natura* ou sob a forma de sucos, sorvetes e geleias⁶. Este fruto, quando desidratado (murici-passa) e utilizado como ingrediente, evidencia um sabor diferenciado aos alimentos.

Desse modo, este trabalho teve por objetivo elaborar barras de cereais com diferentes concentrações de frutos de murici-passa e avaliar a contribuição do murici-passa na aceitabilidade, aparência e qualidade nutricional das barras de cereais.

MATERIAL E MÉTODOS

Formulação e elaboração das barras de cereais

Os ingredientes utilizados na elaboração das barras de cereais foram: glicose de milho (Yoki), flocos de arroz (Harald), farelo e flocos de aveia (Quaker), banana-passa (Banana-Brasil – Cauí), lecitina de soja (Bunge), goma guar (Doce Aroma), água e essência de amêndoa (Dr. Otter), adquiridos em comércio local, além do murici-passa. O murici-passa foi processado a partir do fruto de murici *in natura* coletados na região norte do estado de Goiás, Brasil. A proporção de cada ingrediente está apresentada na Tabela 1.

Para avaliar a contribuição do murici-passa no valor nutricional e aceitabilidade das barras de cereais foram preparadas cinco formulações com proporções

Tabela 1. Proporção dos ingredientes utilizados na manufatura das barras de cereais

Ingredientes	%
Cereais (flocos de arroz, farelo e flocos de aveia)	47,00
Açúcares (glicose de milho)	35,00
Frutas secas (banana-passa e/ou murici-passa)	12,00
Emulsificante (lecitina de soja)	2,00
Estabilizante (goma guar)	2,00
Água	2,00
Essência (baunilha)	q.s. ¹

¹q.s.: quantidade suficiente.

Tabela 2. Proporção de frutas secas nas formulações de barras de cereais

Formulação	Murici-passa (%)	Banana-passa (%)
BCM ₁₀₀	100,00	0,00
BCM ₇₅	75,00	25,00
BCM ₅₀	50,00	50,00
BCM ₂₅	25,00	75,00
BCM ₀ (controle)	0,00	100,00

crecentes de murici-passa em substituição à banana-passa (Tabela 2), sendo o controle elaborado apenas com banana-passa (BCM₀).

Os ingredientes foram pesados separadamente e em seguida, os flocos de arroz, goma guar, farelo e flocos de aveia foram misturados e aquecidos. Adicionou-se lecitina de soja dissolvida em água, frutas secas (Tabela 2) e glicose de milho, coccionando em calor seco (90°C) por 5 minutos até a obtenção de massa homogênea. A massa foi transferida para uma forma de alumínio (15 x 6 cm) previamente untada com lecitina de soja. A massa ainda quente foi prensada com espátula de polietileno até espessura aproximada de 1 cm com posterior corte com 3 cm de largura.

Análises químicas e físicas das barras de cereais

As barras de cereais foram analisadas quanto aos teores de umidade⁷, proteínas pelo método de microkjeldahl⁸, lipídeos totais⁹ e cinzas⁸. O conteúdo de fibra alimentar foi determinado pelo método enzimático-gravimétrico descrito no Instituto Adolfo Lutz⁷, sendo esta análise realizada apenas nas barras de cereais aceitas na análise sensorial. Os carboidratos foram estimados por diferença, subtraindo-se de cem os valores obtidos para umidade, proteínas, lipídios, fibra alimentar e cinzas. O valor energético total das barras de cereais foi estimado considerando-se os fatores de conversão de Atwater de 4 kcal/g de proteína, 4 kcal/g de carboidrato e 9 kcal/g de lipídeo¹⁰.

As dimensões das barras de cereais (largura, espessura e comprimento) foram determinadas utilizando-se Paquímetro Vernier Caliper Mitutoyo 150 mm x 6^{''}¹¹.

Análise sensorial

Os testes de aceitação e de aparência das barras de cereais foram realizados, 24 horas após a elaboração, por

trinta e dois julgadores não treinados, homens e mulheres com idade entre 18 e 60 anos, consumidores de barras de cereais. Esses testes foram realizados utilizando-se a escala hedônica de nove pontos¹², onde os provadores assinalaram o atributo que melhor refletiu o julgamento em relação à aceitação e aparência do produto, sendo que o valor um representou desgostei extremamente, dois desgostei muito, três desgostei moderadamente, quatro desgostei ligeiramente, cinco indiferente, seis gostei ligeiramente, sete gostei moderadamente, oito gostei muito, nove gostei extremamente. Consideraram-se aceitas as barras de cereais que obtiveram nota igual ou superior a seis pontos (gostei ligeiramente).

Análise estatística

Os dados das análises químicas, físicas e aceitabilidade das barras de cereais foram expressos por meio de média, desvio-padrão e submetidos à análise de variância (ANOVA). A análise comparativa dos resultados foi realizada por meio do teste de Tukey com nível de significância de 5%, utilizando-se o *software* Instat versão 2.01. Também foram realizadas análises de correlação de Pearson ($p \leq 0,05$) entre o valor energético e o conteúdo de fibras das barras de cereais e entre a concentração de murici-passa na barra de cereal e sua aceitabilidade, utilizando-se o programa Excel for Windows, versão 2003.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As barras de cereais elaboradas para este estudo tinham peso médio de 26,00±2,07g cada e suas dimensões foram em média 29,89 mm de largura, 15,47 mm de espessura e 97,47 mm de comprimento.

A caracterização nutricional das barras de cereais foi realizada considerando-se os teores de umidade, carboidratos, lipídeos, proteínas e cinzas (Tabela 3).

Tabela 3. Composição centesimal das barras de cereais (g.100g⁻¹)

	BCM ₀	BCM ₂₅	BCM ₅₀	BCM ₇₅	BCM ₁₀₀
Umidade	10,06±0,07 ^a	10,21±0,15 ^a	9,39±0,15 ^b	11,63±0,08 ^c	11,08±0,09 ^d
Carboidratos	75,56±0,05 ^a	76,92±0,50 ^{bc}	77,12±0,47 ^b	75,25±0,25 ^a	76,05±0,39 ^{ac}
Lipídeos	5,32±0,21 ^a	4,26±0,11 ^a	4,73±0,22 ^a	4,53±0,21 ^a	4,77±0,16 ^a
Proteínas	7,68±0,17 ^a	7,28±0,31 ^a	7,49±0,45 ^a	7,37±0,46 ^a	6,93±0,23 ^a
Cinzas	1,38±0,02 ^a	1,33±0,02 ^b	1,27±0,01 ^c	1,21±0,02 ^d	1,15±0,17 ^e

[†] Médias com letras iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si (p<0,05).

BCM0 – Barra de cereais com 0,00% de murici-passa e 100,00% de banana-passa.

BCM25 – Barra de cereais com 25,00% de murici-passa e 75,00% de banana-passa.

BCM50 – Barra de cereais com 50,00% de murici-passa e 50,00% de banana-passa.

BCM75 – Barra de cereais com 75,00% de murici-passa e 25,00% de banana-passa.

BCM100 – Barra de cereais com 100,00% de murici-passa e 0,00% de banana-passa.

Tabela 4. Teor de fibra alimentar total, carboidratos (g.100g⁻¹) e valor energético total (kcal. 100g⁻¹) das barras de cereais aceitas na análise sensorial

Macronutrientes	BCM ₀	BCM ₂₅	BCM ₅₀
Fibra alimentar total	4,77±0,48 ^a	6,38±0,42 ^b	7,40±0,59 ^b
Carboidratos	71,38±0,54 ^a	70,54±0,63 ^{ab}	69,72±0,26 ^b
Valor energético total	358,77±3,11 ^a	349,61±0,86 ^b	351,4±3,58 ^b

[†] Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si (p<0,05); BCM0 – Barra de cereais com 0,00% de murici-passa e 100,00% de banana-passa; BCM25 – Barra de cereais com 25,00% de murici-passa e 75,00% de banana-passa; BCM50 – Barra de cereais com 50,00% de murici-passa e 50,00% de banana-passa.

Os valores de umidade encontrados nas barras de cereais variaram entre 9,39 e 11,63% e apesar das diferenças encontradas, todas apresentaram resultados de umidade inferiores a 15,00%, limite estabelecido pela Resolução CNNPA nº 12 de 1978, no que se refere aos produtos à base de cereais¹³. Altos teores de umidade favorecem reações indesejáveis, como o escurecimento não-enzimático e o crescimento microbiano, este último particularmente importante em cereais adicionados de frutas secas. Além disso, umidades elevadas reduzem a crocância, atributo sensorial característico das barras de cereais¹⁴. Quando se trata de cereais, a crocância é sinônimo de frescor e qualidade do produto e sua perda, caracterizada pelo amolecimento, é uma das causas de rejeição de consumo^{15,16}.

Ainda, em comparação a outros estudos, vale dizer que o teor de umidade das barras de cereais contendo murici-passa e/ou banana-passa foi semelhante à barra de cereais com amendoim (7,64 a 10,02%), estudada por Escobar et al.¹⁴.

O conteúdo de carboidrato das barras de cereais (Tabela 3) oscilou entre 75 e 77 g.100g⁻¹ e foi o nutriente em maior concentração devido ao alto percentual de cereais utilizado nas formulações. É importante destacar que a alta concentração de cereais, seguida pela glicose de milho foram os principais contribuintes do valor energético das mesmas (Tabela 4).

A barra de cereal controle (BCM₀) apresentou maior concentração de lipídeos e proteínas, entretanto, não houve diferença significativa entre as formulações. O conteúdo de lipídeos foi superior a 3g.100g⁻¹, valor estabelecido pela Portaria nº 27 para alimentos sólidos com baixo teor de gorduras totais¹⁷. Apesar da pouca adição de lipídeos (lecitina de soja 8,00%) na formulação das barras de cereais, o conteúdo encontrado deste nutriente pode ser explicado pela alta concentração de aveia, cujo conteúdo de óleo varia entre 4,00 e 11,00%².

No que diz respeito à composição de ácidos graxos da aveia, destaca-se a proporção favorável entre poli-insaturados/saturados e alto conteúdo de ácidos oleico e

linoleico¹⁸, que possuem efeito positivo na prevenção de enfermidades cardiovasculares¹⁹.

A formulação BCM₀ apresentou maior valor de cinzas em relação às demais barras de cereais, sendo que todas diferiram significativamente entre si (Tabela 3). Os conteúdos de cinzas assemelharam-se aos encontrados na literatura para barras de cereais, cujos valores em g.100g⁻¹ foram 1,13²⁰; 1,40 a 1,61²¹; 1,18 a 1,21²². Segundo Cecchi²³ o conteúdo de cinzas totais em cereais pode variar de 0,3 a 3,3g/100g⁻¹, relacionando-se com o conteúdo de minerais no alimento.

Os teores de fibra alimentar total e carboidratos das barras de cereais elaboradas estão ilustrados na Tabela 4 e variaram entre 4,77 a 7,40g.100g⁻¹. A análise de fibra foi realizada apenas nas barras de cereais aprovadas no teste sensorial de aceitabilidade (Figura 1).

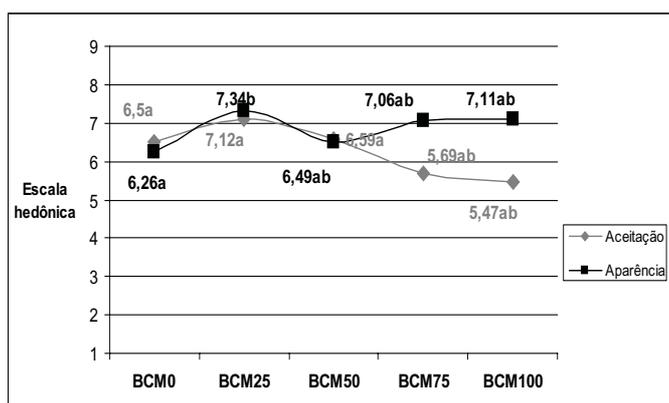


Figura 1. Valores médios dos atributos sensoriais das barras de cereais contendo murici-passa e banana-passa. BCM0 – Barra de cereais com 0,00% de murici-passa e 100,00% de banana-passa; BCM25 – Barra de cereais com 25,00% de murici-passa e 75,00% de banana-passa; BCM50 – Barra de cereais com 50,00% de murici-passa e 50,00% de banana-passa; BCM75 – Barra de cereais com 75,00% de murici-passa e 25,00% de banana-passa; BCM100 – Barra de cereais com 100,00% de murici-passa e 0,00% de banana-passa.

A BCM₀ apresentou o menor teor de fibra alimentar, entretanto, caracteriza-se como alimento fonte de fibras (mínimo de 3g.100g⁻¹), de acordo com a Portaria n° 27 de 13 de janeiro de 1998¹⁷. O resultado da análise estatística demonstrou que não houve diferença significativa entre a BCM₂₅ e BCM₅₀, cujos teores de fibra alimentar classificam-nas como alimentos ricos em fibra (mínimo de 6g.100g⁻¹)¹⁷. Os maiores teores de fibras na BCM₂₅ e BCM₅₀, em comparação à BCM₀ pode ser explicado pelo alto teor deste nutriente no murici-passa, que é quatro vezes maior que na banana-passa²⁴.

É importante destacar que o conteúdo de fibra de barras de cereais varia de acordo com os ingredientes utilizados no processamento. Bueno²² utilizando nêspera tostada seca na porção de 0,00 a 8,00%, em barras de cereais, encontrou conteúdos de fibra alimentar oscilando de 7,70 e 7,86 g.100⁻¹g, respectivamente. A utilização de prebióticos também aumenta o conteúdo de fibras em barras de cereais. Dutcosky et al.²¹, em estudos de otimização sensorial combinada para textura e sabor alcançou 22,65 g.100g⁻¹ de fibra alimentar, quando empregou 8,50% de inulina, 66,20% de oligofrutossacarídeo e 25,40% de goma acácia na formulação de barras de cereais. Por outro lado, Brito et al.²⁰, empregando como ingrediente principal biscoito de amido de milho em barras de cereais, obteve teores menores de fibras (3,44 g.100⁻¹g). Escobar et al.¹⁴ comparou o teor de fibras de três barras de cereais. A barra de cereal com amaranto tostado apresentou maior conteúdo de fibra bruta (2,27 g.100g⁻¹) quando comparada com as barras de cereais com amendoim (1,60g.100g⁻¹) e com amaranto expandido (1,09 g.100g⁻¹).

No que se refere ao valor energético estimado, a BCM₀ apresentou maior valor energético total, sendo que as BCM₂₅ e BCM₅₀ não apresentaram diferenças significativas (Tabela 4). Considerando-se que todas as barras de cereais possuíam a mesma formulação básica e que o ingrediente variável foi o conteúdo de murici-passa e/ou banana-passa, a diferença (p<0,05) entre seus conteúdos energéticos pode ser atribuída ao tipo de frutas desidratadas utilizadas. O valor energético estimado do murici-passa é de 231,35 kcal.100⁻¹g (24), enquanto, segundo informações obtidas do fabricante da banana-passa, seu conteúdo energético é de 262 kcal.100⁻¹g, fato que justifica o maior valor energético total encontrado na BCM₀.

Outro fator a ser considerado na estimativa do valor energético refere-se ao conteúdo de fibras das barras de cereais. A análise de correlação demonstrou que à medida que aumentou a concentração de fibra alimentar total na barra de cereais o valor energético decresceu (r = - 0,84) (Tabela 4). De acordo Benassi, Watanabe e Lobo²⁵, uma das formas de se obter redução no conteúdo energético em alimentos é a adição de fibras alimentares.

Bueno²², estudando barras de cereais com semente tostada e nêspera seca, contendo 7,70 e 7,86.100⁻¹ de fibra alimentar, obteve valor energético de 327,00 e 323,00 kcal.100g⁻¹, respectivamente. Dutcosky et al.²¹ encontraram valores entre 291,24 a 364,36 kcal.100g⁻¹, sendo que a barra de maior valor energético foi a barra controle, sem adição

de fibras, ou seja, a adição de fibras às barras de cereais reduziu o valor calórico de 18,00 a 20,00%.

Na Tabela 5 estão apresentados os valores nutricionais das barras de cereais formuladas neste trabalho e de duas barras de cereais comerciais (fonte de fibras), bem como a porcentagem de contribuição de energia, carboidratos, gorduras totais e fibra alimentar em relação à ingestão diária recomendada (IDR). Considerando-se as recomendações diárias de proteína e fibra, as barras de cereais com murici-passa e banana-passa alcançaram maior percentual das necessidades nutricionais de um adulto. As barras de cereais comerciais contribuíram para um maior percentual no valor diário recomendado de energia e gordura em relação às barras de cereais formuladas.

Os percentuais dos valores diários encontrados por Bueno²² em barras de cereais com 8,00% de semente tostada de nêspera, com base em 2000 kcal, alcançaram os mesmos percentuais para energia (4,00%) em relação às barras de cereais de murici-passa e banana-passa. O conteúdo de lipídeos atingiu 0,70% do valor diário e o teor de fibras, carboidratos e proteínas 8,00%, 7,00% e 1,00% respectivamente. As barras de cereais possuem como composição básica flocos de arroz e de aveia. Entretanto, as diferenças quanto à composição nutricional ocorre devido à quantidade e ingredientes de cada formulação²².

De acordo com Tettweiler (1), atualmente a produção de *snacks* está orientada na elaboração de produtos mais nutritivos, com aporte de carboidratos, lipídeos e proteínas balanceados conforme o teor energético do produto. Além disso, a revalorização dos

snacks, através da incorporação de cereais ricos de fibras, evidencia seu potencial como alimento com características funcionais¹⁴. O'Neill et al.²⁶ verificaram que barras de cereais administradas para pacientes hipercolesterolêmicos contribuem com a redução dos níveis do colesterol de baixa densidade (LDL-c).

Williams et al.²⁷ encontraram evidências de que barras tipo *snack* com maior conteúdo de proteína e fibra tem melhor influência, em curto prazo, nos parâmetros metabólicos e podem auxiliar no controle do apetite quando comparadas a barras convencionais com alto teor de lipídeos e carboidratos refinados. De acordo com o autor, a glicemia e a resposta insulínica após nove horas foram significativamente menores durante a intervenção com a barra de maior conteúdo proteico e de fibra, sendo que o consumo matinal desta barra reduziu a ingestão energética do almoço em 5,00%.

As barras de cereais elaboradas para este estudo tiveram peso médio de 26,00±2,07g cada e suas dimensões foram em média 29,89 mm de largura, 15,47 mm de espessura e 97,47 mm de comprimento.

Os resultados médios obtidos da avaliação sensorial em relação à aceitabilidade e aparência das barras de cereais estão apresentados na Figura 1. Quanto ao teste de aceitação, BCM₀, BMC₂₅ e BCM₅₀ obtiveram médias superiores a 6,00 (p<0,05), sendo consideradas aceitas para consumo. As barras de cereais com conteúdo de murici-passa acima de 75,00% não foram aceitas pelos provadores. A análise de correlação demonstrou que à medida que aumentou a concentração de murici-passa nas barras de cereais a aceitabilidade decresceu

Tabela 5. Composição química em 25g (1 unidade) e valor diário recomendado (VD) de barras de cereais com murici -passa e/ou banana-passa comparadas com as barras comerciais

Composição nutricional	BCM ₀	VD ¹	BCM ₂₅	VD ¹	BCM ₅₀	VD ¹	BA ⁴	VD ¹	FAM ⁴	VD ¹
Valor energético ²	90,00	4,00	87,00	4,00	88,00	4,00	110,00	5,00	98,00	5,00
Carboidratos ³	18,00	6,00	18,00	6,00	17,00	6,00	17,00	6,00	17,00	6,00
Proteínas ³	1,90	2,00	1,80	2,00	1,90	2,00	1,00	1,00	1,10	1,00
Gorduras totais ³	1,30	2,00	1,10	2,00	1,20	2,00	1,00	2,00	2,20	4,00
Fibra alimentar ³	1,20	5,00	1,60	6,00	1,80	7,00	1,00	4,00	1,10	4,00

BCM0 – Barra de cereais com 0,00% de murici-passa e 100,00% de banana-passa; BCM25 – Barra de cereais com 25,00% de murici-passa e 75,00% de banana-passa; BCM50 – Barra de cereais com 50,00% de murici-passa e 50,00% de banana-passa; BCM75 – Barra de cereais com 75,00% de murici-passa e 25,00% de banana-passa; BCM100 – Barra de cereais com 100,00% de murici-passa e 0,00% de banana-passa; ¹Porcentagem do valor diário de referência, com base em uma dieta de 2000 kcal; ²kcal; ³gramas; ⁴Barras de cereais comercial (BA – banana e aveia e FAM – farelo de aveia e mel).

($r = -0,81$). A BCM_{25} apresentou maior pontuação na escala hedônica, obtendo 87,50% de aceitação entre os avaliadores, seguida pela BCM_{50} e BCM_0 (81,00 e 75,00% de aceitabilidade, respectivamente). A BCM_{75} e BCM_{100} obtiveram pontuação equivalente a “não gostei, nem desgostei”, com aceitabilidade de 69 e 62,00%, respectivamente (Figura 1). Os valores hedônicos variaram de 5,47 a 7,12 (“não gostei, nem desgostei” a “gostei moderadamente”).

Estevez et al.²⁸, realizaram teste de aceitabilidade em barras de cereais com amendoim e obtiveram notas variando entre 5,50 a 7,10. Dutcosky et al.²¹, em um delineamento experimental com nove barras de cereais adicionadas dos prebióticos (inulina, oligofrutossacarídeo e goma acácia), avaliaram a aceitabilidade, cuja pontuação variou entre 5,46 a 7,22. Os resultados de aceitabilidade das barras de cereais apresentados pelos dois estudos foram semelhantes ao deste trabalho.

Quanto à aparência geral, todas as barras de cereais apresentaram pontuação superior a 6,00, variando entre 6,26 a 7,34, o que corresponde a “gostei pouco” a “gostei moderadamente” (Figura 1). As barras de cereais com conteúdo de murici-passa igual ou superior a 75,00% apresentaram melhores resultados quanto à aparência em relação às barras com 0,00 e 50,00%. Os julgadores apontaram a BCM_{25} como a barra de cereal de melhor aparência. Os valores hedônicos das barras de cereais para aceitação e aparência foram semelhantes para a adição de até 50,00% de murici-passa. A partir de 50,00% de murici-passa, as barras de cereais apresentaram melhor aparência, entretanto, os valores de aceitabilidade decresceram.

CONCLUSÃO

Apesar da BCM_{75} e BCM_{100} não terem sido aceitas, foi possível introduzir o murici em barras de cereais. A combinação de banana-passa e murici-passa na proporção de 75:25, propiciou os melhores resultados de aparência e aceitação, incrementando o sabor da banana, tradicional em barras de cereais. Além disso, a adição do murici-passa às barras de cereais proporcionou nomeá-las como ricas em fibras, caracterizando-as como um produto de melhor qualidade nutricional frente às barras de cereais comerciais. Assim, a inserção do murici em produtos alimentícios pode contribuir para evidenciar sabor diferenciado, aparência e qualidade nutricional, valorizando o uso dos alimentos regionais na alimentação humana.

REFERÊNCIAS

1. Tettweiler P. Snack food worldwide. *Food technol.* 1991; 45 (2): 58 – 62.
2. Sarantópoulos CIGL, Oliveira LM, Canavesi, E. Requisitos de conservação de alimentos em embalagens flexíveis. Campinas: CETEA / ITAL, 2001.
3. Karam LB, Grossmann MVE, Silva RSSF, Misturas de farinha de aveia e amido de milho com alto teor de amilopectina para produção de snacks. *Cienc. tecnol. aliment.* 2001; 21 (2)158 – 3.
4. Grigelmo-Miguel N, Martín-Belloso, O. Comparison of dietary fibre from by-products of processing fruits and greens and from cereals. *Food sci. technol.* 1999; 32: (8) 503 – 508.
5. Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica, Coordenação-Geral da Política de Alimentação e Nutrição. Guia Alimentar para a População Brasileira. Brasília, 2006. 210p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).
6. Alves GL, Franco MRB. Headspace gas chromatography–mass spectrometry of volatile compounds in murici (*Byrsonima crassifolia* L. Rich). *J. chromatogr. A.* 2003; 985: (4) 297–301.
7. 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.
8. Association of Official Agricultural Chemists (AOAC). Official methods of analysis. 10ª ed. Washington, 1992.
9. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. j. biochem. physiol.* 1959; 37: (8) 911 – 7.
10. Wilson ED, Santos AC, Vieira EC. Energia. In: Dutra-de-Oliveira, JE, Santos AC, Wilson ED, editors. Nutrição básica. São Paulo: Sarvier; 1982. p. 79 – 97.
11. Turtelli Júnior A. As experiências. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Física Gleb Wataghin. Disponível em: <<http://www.ifi.unicamp.br/~turtelli/exp.html>>. Acesso em: 24 mai. 2007.
12. Chaves JBP, Sproesser RL. Práticas de laboratório de análise sensorial de alimentos e bebidas. 1ª ed. Viçosa: UFV; 2002.
13. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução CNNPA n. 12, de 1978: Normas Técnicas Especiais. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 07 mai. 2006.
14. Escobar BA, Estévez AM, Tepper AL, Aguayi MR. Características nutricionales de barras de cereales y maní. *Arch. latinoam. nutr.* 1998; 48 (2): 156 – 159.
15. Slade L, Levine H. Beyond water activity: Recent advances based on an alternative approach to the assessment of food quality and safety. *CRC Crit. rev. food sci. nutr.* 1991; 30 (2 – 3): 115 – 360.
16. Takeuchi KP, Sabadini E, Cunha RL. Análise das propriedades mecânicas de cereais matinais com diferentes fontes de amido durante o processo de absorção de leite. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 2005; 25(1): 78 – 85.
17. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 27 de 13 de janeiro de 1998: Regulamento Técnico sobre a Informação Nutricional Complementar. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 03 set. 2006.
18. Universidade Federal de Santa Catarina. Ciência e tecnologia de cereais. Aveia. Florianópolis, 2006. Disponível em: <http://www.cca.ufsc.br/dcal/labs/ceres/aveia.html#proc>>. Acesso em 20 nov. 2006.

19. Lima FEL, Menezes TN, Tavares MP, Szarfa SC, Fisberg RM, Ácidos graxos e doenças cardiovasculares: uma revisão. *Rev. nutr.* 2000; 13 (2): 73 – 80.
20. Brito IP, Campos JM, Sousa TFL, Wakiyama C, Azeredo GA. Elaboração e avaliação global de barras de cereais caseira. *Bol. Centro Pesqui. Process. Aliment.* 2004; 22 (1): 35 – 50.
21. Dutcosky SD, Grossman MVE, Silva RSSF, Welsch AK. Combined sensory optimization of a prebiotic cereal product using multicomponent mixture experiments. *Food chem.* Article in press. 2005; 1 – 9. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em 12 dez. 2005.
22. Bueno ROG, Características de qualidade de biscoitos e barras de cereais ricos em fibra alimentar a partir de farinha de semente e polpa de nêspera. [dissertação]. Setor de Tecnologia: Universidade Federal do Paraná; 2005.
23. Cecchi HM, Fundamentos Teóricos e Práticos de Análise de Alimentos. 2ª ed. Campinas: UNICAMP; 2003.
24. Guimarães MM, Silva MS. Processamento e caracterização química e física de frutos de murici-passa (*Byrsonima verbascifolia*). *Cienc. tecnol. aliment.* 2008; 28 (4): 817-21.
25. Benassi VT, Watanabe E, Lobo AR. Produtos de panificação com conteúdo calórico reduzido. *Bol. Centro Pesqui. Process. Aliment.* 2001; 19 (2): 225 – 42.
26. O'Neill FH, Mandeno R, Thompson GR, Seed M. Enhancement of cholesterol-lowering effect of atorvastatin by stanol ester cereal bars. *Atheroscler. Suppl.* 2001; 2 (1): 110.
27. Williams G, Noakes M, Keogh J, Foster P, Clifton P. High protein high fibre snack bars reduce food intake and improve short term glucose and insulin profiles compared with high fat snack bars. *Asia Pac. j. clin. nutr.* 2006; 15 (4): 443 – 50.
28. Estévez AM, Escobar BA, Tepper AL, Castillo EV. Almacenamiento y uso de antioxidantes em barras de cereales y maní. *Arch. latinoam. nutr.* 1998; 48 (2): 160 – 4.

Atividade antifúngica do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* frente a cepas de *Candida albicans* e *Candida tropicalis* isoladas de infecções nosocomiais

Antifungal activity of *Cymbopogon citratus* essential oil on *Candida albicans* and *Candida tropicalis* strains isolated from nosocomial infections

RIALA6/1241

Fernando de Sá SILVA^{1*}, Tatiane Morais FERREIRA², Guilherme Rodrigues TEODORO², Anna Carolina Borges Pereira da COSTA², Aguida MARIA³, Milton BELTRAME JUNIOR⁴, Marcos José SALVADOR⁵, Claudete Rodrigues de PAULA⁶, Sônia KHOURI²

*Endereço para correspondência: Laboratório de Genética, Instituto Butantan, Av. Vital Brasil, 1500, Butantan, São Paulo, SP, Brasil CEP: 05503-900, e-mail: silvafs@gmail.com

¹Laboratório de Genética, Instituto Butantan

²Laboratório de Microbiologia, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), São José dos Campos, SP, Brasil

³Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Regional de Taubaté, Taubaté, SP, Brasil

⁴Laboratório de Síntese Orgânica, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), São José dos Campos, SP, Brasil

⁵Faculdade de Farmácia, Departamento de Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil

⁶Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brasil

Recebido: 03.08.2009 – Aceito para publicação: 07.12.2009

RESUMO

O óleo essencial de *Cymbopogon citratus* tem sido alvo de vários estudos em função do potencial antimicrobiano. Neste estudo, a atividade desse componente foi investigada em cepas do gênero *Candida* isoladas de infecções hospitalares. Para a condução do estudo, foram analisadas 24 isolados de *Candida albicans* e 15 isolados de *Candida tropicalis*, originados de pacientes com suspeitas de infecção hospitalar e uma cepa padrão de *C. albicans* ATCC 10231, por meio da técnica de difusão em ágar. O óleo essencial de *C. citratus* apresentou atividade antifúngica em 100% dos isolados a partir da concentração de 25% (v/v), o que indica sua ação positiva sobre as cepas hospitalares. Sugere-se a realização de estudos farmacológicos e toxicológicos desse componente para avaliar a possível aplicação clínica.

Palavras-chave. *Candida* spp, capim limão, *Cymbopogon citratus*, atividade antifúngica, óleo essencial.

ABSTRACT

The antifungal activity of *Cymbopogon citratus* essential oil was assessed by means of agar diffusion technique on 24 *Candida albicans* isolates and 15 *Candida tropicalis* isolates originated from patients with suspected nosocomial infection, and one *Candida albicans* ATCC 10231 standard strain. *Cymbopogon citratus* essential oil showed antifungal activity on 100% of the isolates which were analyzed from 25% (v/v) on concentrations, indicating its effective activity on nosocomial microorganisms.

Key words. *Candida* spp, lemongrass, *Cymbopogon citratus*, antifungal activity, essential oil.

INTRODUÇÃO

Nas últimas quatro décadas, observou-se um aumento da incidência de infecções sistêmicas graves por fungos oportunistas devido à resistência destes frente às atuais classes de antifúngicos, o que está correlacionado com o uso indiscriminado dos mesmos. Além do mais, os antifúngicos comumente usados causam efeitos adversos aos pacientes, que incluem hipersensibilidade, reações alérgicas e imunossupressão¹. Estas incidências são também influenciadas por algumas doenças tais como câncer, diabetes e AIDS^{2, 3, 4, 5, 6}.

Dentre os fungos oportunistas, o grupo que abrange *Candida* spp., foi considerado o quarto maior isolado em infecção sanguínea nosocomial registrado no Canadá, EUA, Europa e América Latina⁷. Este estudo, realizado entre 1997 a 1999, o qual abrangeu 71 centros médicos, mostrou predominância de *C. albicans* entre 45% a 60% em todas as infecções sanguíneas causadas por *Candida* spp. *Candida tropicalis* foi colocada como a segunda espécie mais isolada, seguida por *Candida parapsilosis*, na América Latina e em alguns centros médicos da Europa⁷. Estudos recentes nestas regiões evidenciaram que esta incidência permanece pouco alterada^{2, 8, 9, 10, 11}; valores semelhantes têm sido observados em hospitais no Brasil e em alguns países asiáticos^{4, 5, 12, 13, 14, 15}.

Entre os antifúngicos frequentemente usados para o tratamento das infecções causadas por *Candida* spp., estão os derivados de poliênicos, a 5-fluorocitosina e os derivados azólicos¹⁶. Os agentes antifúngicos têm como principal objetivo atuar unicamente contra fungos patogênicos, todavia, devido às semelhanças celulares também são prejudiciais às células humanas¹⁷. Atualmente, além da toxicidade promovida pelos antifúngicos, um número cada vez maior de cepas de várias espécies de *Candida* tem adquirido resistência a estes fármacos^{5, 7, 11, 13, 14, 18}.

Com isso, vários trabalhos têm sido desenvolvidos com produtos de origem vegetal na busca de uma alternativa mais eficiente e menos tóxica para o tratamento das infecções fúngicas¹⁹. Entre as espécies vegetais, destaca-se o *Cymbopogon citratus* (*C. citratus*) cujo óleo essencial obtido das folhas tem apresentado ótima atividade antifúngica. Pertencente à família Poaceae e originária da Índia, *C. citratus* (D.C.) Stapf é conhecido popularmente no Brasil como capim-limão ou *lemongrass* nos países de língua inglesa²⁰. É uma erva perene, ereta, de 0,60 a 2 m de altura, com folhas aromáticas, estreitas, longas e paralelinérvias partindo da base^{20, 21}. Suas folhas há muito

tempo, são consumidas pela população na forma de chá ou infusão. O seu principal emprego está relacionado no alívio de pequenas cólicas uterinas e intestinais, má digestão, flatulência, no tratamento de insônia, nervosismo, além de efeitos antitérmico, antiespasmódico e diurético^{22, 23}.

A atividade antifúngica de *C. citratus* está relacionada ao óleo essencial, princípio odorífero da planta, contido em suas folhas. No entanto, são poucos os trabalhos existentes em relação à sua ação antifúngica contra leveduras do gênero *Candida*, especialmente aquelas isoladas de pacientes hospitalizados. Contudo, tem sido relatado que pequenas concentrações do óleo essencial promovem excelentes efeitos em cepas de distintas espécies de *Candida*¹⁹. Mishra e Dubey²⁴, demonstraram que o óleo essencial foi ativo contra 47 espécies de fungos, incluindo *Candida* spp. Resultados promissores contra fungos filamentosos e bactérias também foram descritos^{25, 26}.

Diante das perspectivas oferecidas pela ação antifúngica do óleo essencial de *C. citratus*, e frente ao aumento da resistência e incidência das infecções hospitalares por *Candida*, há grande interesse em desenvolver novos antifúngicos eficientes com baixa toxicidade e custo acessível. Desse modo, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade antifúngica do óleo essencial de *C. citratus* em cepas hospitalares de *C. albicans* e *C. tropicalis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

Folhas de *Cymbopogon citratus* foram coletadas no Horto Medicinal da Universidade de Taubaté (UNITAU), Taubaté – SP, no período da manhã, em março de 2005. As folhas foram cortadas à altura entre 20 a 30 cm a partir do solo e protegidas da luz²⁷. A espécie foi identificada no Núcleo de Estudos Botânicos do Centro de Estudos da Natureza (CEN), Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), São José dos Campos – SP.

Extração do óleo essencial

O processo de obtenção do óleo essencial, realizado no Laboratório de Síntese Orgânica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) – UNIVAP, seguiu o método direto por destilação com arraste de vapor²⁸. Folhas frescas (100 g) de *C. citratus* foram picadas e imersas em 500 mL de água destilada. O óleo foi separado

da água utilizando acetato de etila (E7770, Sigma) e seco com sulfato de magnésio anidro (M7506, Sigma) à temperatura ambiente, até formar precipitado. A solução foi filtrada e evaporada para a remoção do solvente. Logo após, o óleo foi pesado e armazenado a 4°C.

Análise Química

A análise por cromatografia gasosa (CG) foi realizada utilizando um cromatógrafo de gás Shimadzu GC-17A com detector FID, no modo de injeção *split*. Uma coluna capilar Durabond-DB5 (30 m x 0,25 mm, espessura do filme 0,25 µm) foi operado a 60 °C por 3 min, programado de 60°-220 °C a 5 °C/min e mantido em 220 °C por 5 min. Hélio foi utilizado como gás de arraste (1 mL/min) e a temperatura do injetor foi 250 °C. A porcentagem relativa de componentes individuais foi obtido baseado nas áreas dos picos obtidos pela integração eletrônica sem o fator de correção de reposta FID. A análise CG/EM (70 eV) foi realizada utilizando o espectrofotômetro Varian Saturn 2000 equipado com uma coluna de capilar CP-Sil-8CB (30 m x 0,25 mm, espessura do filme 0,25 µm) sobre as mesmas condições relacionadas acima. Os componentes do óleo essencial foram identificados pela comparação de seus índices de retenção (relativo aos n-alcenos) e espectros de massa com os dados encontrados na literatura²⁹. Após a identificação, os dados foram armazenados no banco de dados de espectrometria (NIST 1998).

Teste antimicrobiano

A atividade antimicrobiana foi feita pelo método de difusão em ágar (cavidade/placa) modificado^{30, 31, 32}. Foram avaliadas 24 amostras de leveduras das espécies *C. albicans* e 15 de *C. tropicalis* pertencentes ao Instituto Adolfo Lutz (IAL), coletadas entre 2002 e 2003, apenas de pacientes com suspeita clínica de infecção hospitalar no Hospital Universitário de Taubaté (HUT) (Tabelas 1 e 2). A cepa padrão utilizada foi *C. albicans* ATCC 10231. Os inóculos de 10⁶ UFC/mL de *Candida* foram semeados em meio ágar Dextrose Sabouraud (Difco, Detroit, USA). O inóculo de cada cepa testada foi padronizado de acordo com Clinical and Laboratory Standard Institute³³. Subsequentemente, alíquotas de 20 µL de cada concentração de solução testada foram aplicadas em poços com 5 mm de diâmetro. As soluções do óleo essencial foram preparadas a partir do óleo bruto diluído nas concentrações de 10%, 15%, 25%, 35%, 50% e 60% (v/v) em óleo vegetal (óleo de amêndoas, LECLERC-LTDA) e

mantidas a 4°C. Após a incubação a 37°C por 48 h, foi realizada a medição dos diâmetros, em milímetros (mm), dos halos de inibição. Nitrato de miconazol (20 mg/mL – concentração utilizada no mercado) foi utilizado como controle positivo; e o óleo vegetal (óleo de amêndoas) como controle negativo, no qual nenhum efeito inibitório foi observado (dado não mostrado). Os testes foram realizados em triplicata para cada micro-organismo, sendo o resultado final determinado pela média aritmética e desvio padrão dos halos de inibição, de cada concentração do *C. citratus* e controle positivo, entre as cepas da mesma espécie. Foi considerado a distribuição normal sendo o desvio padrão $\sigma_{(n-1)}$ ^{19,34}. A sensibilidade das cepas testadas frente ao óleo de *C. citratus* foi atribuída aquelas cujo halos de inibição ficaram acima de 6 mm e ausentes de colônias micro-satélites no seu interior.

RESULTADOS

O processo de extração do óleo essencial, por destilação com arraste de vapor, rendeu 0,57% de óleo a partir de 100 g de folha frescas de *C. citratus*. Seus constituintes majoritários foram detectados pela análise de CG/EM, que mostrou a presença de α -citral (28,03%), β -citral (12,02%) e sulcatone (4,8%). Os resultados dos testes de sensibilidade das cepas de *C. albicans* e *C. tropicalis* frente ao óleo essencial estão organizados respectivamente nas Tabelas 1 e 2, e a comparação do grau de sensibilidade entre ambas as cepas está demonstrada na Figura 1. Foi observada atividade antifúngica em todas as cepas, de ambas as espécies de *Candida* a partir da concentração de 25% do óleo. Contudo, a menor concentração testada do óleo (10%) demonstrou atividade contra 48% das cepas de *C. albicans* e 20% das cepas de *C. tropicalis*.

Considerando os resultados a partir da concentração de 25% onde todas as cepas, de ambas as espécies, apresentaram sensibilidade ao óleo, ocorreram variações nos halos de inibição, principalmente nas cepas de *C. albicans*, sendo melhor observado a partir da concentração de 50%. Na maior concentração testada (60%) ocorreu inibição apresentando halos entre 17 a 38 mm, que foi também observado no controle positivo, com halos entre 28 a 50 mm. Em relação a *C. tropicalis* as variações dos halos de inibição foram menos expressivos, como pode ser observado a partir da concentração de 25% o desvio padrão não excedeu a ± 2 mm (Tabela 2).

Tabela 1. Halos de inibição (mm) formados pela ação antifúngica do óleo essencial de *C. citratus* contra 24 cepas hospitalares de *C. albicans* e uma cepa padrão ATCC 10231

Cepas	Concentrações em % (v/v) - 20 mL						Controle Positivo - 20 mL (Nitrato de Miconazol) 20 mg/mL
	10%	15%	25%	35%	50%	60%	
ATCC 10231	10	13	20	26	28	30	37
Ca08	0	8	13	15	17	17	28
Ca25	0	12	16	19	21	30	34
Ca27	0	0	18	22	24	24	45
Ca29	0	0	15	20	21	23	42
Ca30	0	0	16	19	21	23	39
Ca31	0	0	15	19	26	29	30
Ca34	0	0	19	22	24	27	32
Ca35	0	0	16	18	21	21	40
Ca46	0	0	18	25	32	38	50
Ca55	0	0	17	21	34	36	45
Ca56	0	0	16	18	21	23	36
Ca61	0	0	16	17	19	21	41
Ca64	0	0	17	21	24	26	40
Ca65	11	13	16	26	26	30	37
Ca69	10	12	19	21	28	32	36
Ca70	10	12	17	23	26	30	36
Ca72	8	12	17	19	24	30	32
Ca73	11	13	19	22	24	27	33
Ca74	9	11	18	19	23	25	30
Ca85	10	12	19	23	24	25	35
Ca86	8	12	16	22	27	28	43
Ca87	10	13	19	24	30	30	45
Ca91	8	11	19	21	23	24	33
Ca104	10	12	17	23	30	31	35
Média	5	7	17	21	25	27	37
Desvio Padrão	±5	±6	±2	±3	±4	±5	±6

Resultados numéricos em mm.

Tabela 2. Halos de inibição (mm) formados pela ação antifúngica do óleo essencial de *C. citratus* contra 15 cepas hospitalares de *C. tropicalis*

Cepas	Concentrações em % (v/v) - 20 mL						Controle Positivo - 20 µL (Nitrato de Miconazol) 20 mg/mL
	10%	15%	25%	35%	50%	60%	
Ct05	0	0	13	15	22	22	35
Ct06	10	11	14	18	20	22	33
Ct33	0	0	13	16	18	20	35
Ct37	8	9	13	16	19	20	31
Ct57	0	0	12	15	17	18	29
Ct58	0	10	14	18	20	21	33
Ct62	0	0	13	17	24	24	31
Ct66	0	8	11	13	15	16	29
Ct67	0	9	13	15	17	18	30
Ct71	0	8	14	16	18	22	27
Ct81	0	0	12	14	17	21	33
Ct82	0	8	11	14	17	19	33
Ct83	7	8	12	14	18	19	32
Ct95	0	0	13	16	20	22	32
Ct97	0	8	13	16	18	19	33
Média	2	5	13	16	19	20	32
Desvio Padrão	±3	±5	±1	±1	±2	±2	±2

Resultados numéricos em mm.

A cepa de referência *C. albicans* (ATCC 10231) apresentou halos maiores que os valores da média de todos os halos das cepas de *C. albicans*. No entanto, algumas cepas de isolados hospitalares apresentaram maior sensibilidade ao óleo que a cepa de referência.

O nitrato de miconazol (20 mg/mL) foi utilizado como controle positivo contra as cepas testadas, produzindo halos de inibição entre 27-45 mm (Tabelas 1 e 2); e como controle negativo foi utilizado o óleo vegetal de amêndoas, sendo que nenhum efeito inibitório foi observado (dados não mostrados).

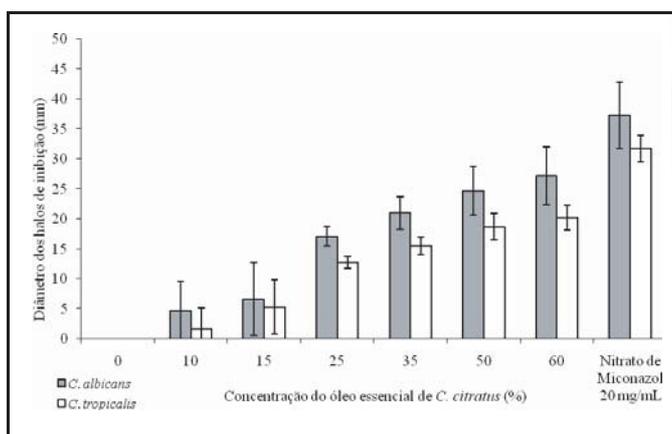


Figura 1. Média dos halos de inibição (em mm) das cepas de *C. albicans* e *C. tropicalis* frente a 20 µL do óleo essencial de *C. citratus* em diferentes concentrações e o controle positivo nitrato de miconazol a 20 mg/mL.

DISCUSSÃO

Os óleos essenciais podem ser avaliados de acordo com suas características físico-químicas como: teor ou rendimento, estabilidade e quantificação de constituintes químicos. Estas características variam e dependem diretamente do local onde a planta é cultivada, sendo influenciadas dentre vários fatores pelo clima, solo, tratamentos culturais e exposição à luz, dependendo também das suas características genéticas²¹.

O óleo essencial *C. citratus*, extraído pelo método de destilação com arraste de vapor, teve um rendimento de 0,57% das folhas frescas. Este resultado está de acordo com Akisue et al.²², que obtiveram um rendimento entre 0,46% a 0,86%; e Mishra e Dubey²⁴ que também chegaram a resultados semelhantes com rendimentos entre 0,29% e 0,64%; tal variação para ambos os trabalhos dependeu da época do ano em que as folhas foram coletadas.

Apesar das poucas publicações referentes à ação antifúngica do óleo contra cepas de *Candida* de origem hospitalar, os resultados do presente trabalho foram compatíveis às referências existentes. Lima e Farias¹⁹ demonstraram o potencial antifúngico do óleo essencial de *C. citratus*, o qual inibiu o crescimento de todas as cepas hospitalares do gênero *Candida* testadas, entre estas, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea*, *C. pseudotropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. guilliermondii*.

Considerando os resultados a partir da concentração de 25% onde todas as cepas, de ambas as espécies, apresentaram sensibilidade ao óleo, ocorreram variações nos halos de inibição, principalmente se tratando de *C.*

albicans, onde tais variações, de acordo com os desvios padrões, aumentaram com o aumento das concentrações do óleo (Tabela 1), enquanto em relação à *C. tropicalis*, estas variações foram percebidas em menor intensidade. Variações semelhantes foram observadas por Lima e Farias¹⁹ em um experimento empregando o método de disco de papel, onde os halos mediram entre 20 a 40 mm para *C. albicans* e de 20 a 32 mm para *C. tropicalis*. Nossos resultados estão em acordo com a literatura a qual sugere que, não apenas cepas de *C. albicans*, mas também cepas de *C. tropicalis*, isoladas de infecções nosocomiais, possuem diferentes graus de susceptibilidade.

Outros trabalhos mostram bons resultados relativos à atividade antifúngica do óleo essencial de *C. citratus*. Onawunmi³⁵ obteve satisfatório efeito antifúngico contra *Candida* spp., tendo halos de inibição numa média de 26 mm para cepas selvagens de *C. albicans* e 32 e 53 mm para cepas padrões de *C. albicans* e *C. pseudotropicalis*, respectivamente. Onawunmi³⁵ seguido por Mishra and Dubey²⁴ sugeriram que o efeito antimicrobiano do óleo essencial de *C. citratus* é devido ao citral, componente majoritário do óleo que demonstrou admirável atividade antifúngica. Em 1998, Carmo et al.³⁶ analisaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *C. citratus*, contra 10 cepas de *C. albicans*, isoladas de pacientes com AIDS, e obtiveram inibição em 90% das cepas. Schuck et al.³⁴ também mostram resultados promissores, já que a ação do óleo essencial, frente a cepas padrões de *Candida*, foi superior a nistatina usada como controle positivo.

Numa última avaliação, a Figura 1 mostra a comparação das médias dos halos de inibição formados, pelas concentrações do óleo essencial para as cepas de ambas as espécies. Nota-se uma tendência de saturação da atividade antifúngica do óleo essencial com o aumento da concentração, tendendo a ficar abaixo do valor da média dos halos de inibição do controle positivo. No entanto, isso não indica que o potencial antifúngico do óleo seja inferior, sendo necessário realizar testes com concentrações mais elevadas e, futuramente, testes toxicológicos, já que se deve levar em consideração que a maioria dos antifúngicos no mercado causam efeitos colaterais.

CONCLUSÃO

O presente trabalho mostrou bons resultados da ação antifúngica do óleo essencial das folhas frescas de *C. citratus* em cepas hospitalares de *C. albicans* e *C. tropicalis*. Todas as cepas, de ambas as espécies, foram

inibidas a partir da concentração de 25% do óleo essencial. Dessa forma, sugere-se futuros estudos contra outros fungos patogênicos, além de estudos farmacológicos e toxicológicos para uma futura aplicação clínica.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer Carlos Magno da Costa Maranduba e Lisley Inata Mambelli, pesquisadores do Instituto Butantan, à FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Mukherjee PK, Saritha GS, Suresh B. Antimicrobial potential of two different *Hypericum* species available in India. *Phytother Res* 2002; 16 (7): 692-5.
2. Jordà-Marcos R, Alvarez-Lerma F, Jurado M, Palomar M, Nolla-Salas J, León MA, et al. Risk factors for candidemia in critically ill patients: a prospective surveillance study. *Mycoses* 2007; 50 (4): 302-10.
3. Karaman I, Sahin F, Güllüce M, Ögütçü H, Sngül M, Adigüzel A. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. *J Ethnopharmacol* 2003; 85 (2/3): 231-5.
4. Kung HC, Wang JL, Chang SC, Wang JT, Sun HY, Hsueh PR, et al. Community-onset candidemia at a university hospital, 1995-2005. *J Microbiol Immunol Infect* 2007; 40: 355-63.
5. Shen YZ, Qi TK, Ma JX, Jiang XY, Wang JR, Xu QN, et al. Invasive fungal infections among inpatients with acquired immune deficiency syndrome at a Chinese university hospital. *Mycoses* 2007; 50: 475-80.
6. Xie GH, Fang XM, Fang Q, Wu XM, Jin YH, Wang JL, et al. Impact of invasive fungal infection on outcomes of severe sepsis: a multicenter matched cohort study in critically ill surgical patients. *Crit Care [serial online]* 2008; 12 (1): Available from: URL: <http://ccforum.com/content/12/1/R5>
7. Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, Sader HS, Fluit AC, Hollis RJ, et al. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: Frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J Clin Microbiol* 2001; 39 (9): 3254-9.
8. Bougnoux ME, Kac G, Aegerter P, D'enfert C, Fagon JY, Candirea Study Group. Candidemia and candiduria in critically ill patients admitted to intensive care units in France: incidence, molecular diversity, management and outcome. *Intensive Care Med* 2008; 34 (2): 292-9.
9. Horn DL, Fishman JA, Steinbach WJ, Anaissie EJ, Marr KA, Olyaei AJ, et al. Presentation of the PATH Alliance® registry for prospective data collection and analysis of the epidemiology, therapy, and outcomes of invasive fungal infections. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 59 (4): 407-14.
10. Lagrou K, Verhaegen J, Peetermans WE, De Rijdt T, Maertens J, Van Wijngaerden E. Fungemia at a tertiary care hospital: incidence, therapy, and distribution and antifungal susceptibility of causative species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007; 26 (8): 541-7.
11. Odds FC, Hanson MF, Davidson AD, Jacobsen MD, Wright P, Whyte JA, et al. One year prospective survey of *Candida* bloodstream infections in Scotland. *J Med Microbiol* 2007; 56: 1066-75.
12. Colombo AL, Nucci M, Salomão R, Branchini MLM, Richtmann R, Derossi A, et al. High rate of non-*albicans* candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999; 34 (4): 281-6.
13. Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouér SA, Arthington-Skaggs B, da Matta DA, et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J Clin Microbiol* 2006; 44 (8): 2816-23.
14. da Matta DA, De Almeida LP, Machado AM, Azevedo AC, Kusano EJ, Travassos NF, et al. Antifungal susceptibility of 1000 *Candida* bloodstream isolates to 5 antifungal drugs: results of a multicenter study conducted in São Paulo, Brazil, 1995-2003. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 57 (4): 399-404.
15. Lee JS, Shin JH, Lee K, Kim MN, Shin BM, Uh Y, et al. Species distribution and susceptibility to azole antifungals of *Candida* bloodstream isolates from eight university hospitals in Korea. *Yonsei Med J* 2007; 48 (5): 779-86.
16. Alves SH, Lopes JO, Cury AE. Teste de suscetibilidade aos antifúngicos. Por que, quando e como realizar. *NewsLab* 1997; 25: 140-8.
17. Trabulsi LR, Alterthum, F. *Microbiologia*. 4a ed. São Paulo, São Paulo: Atheneu; 2004.
18. Hazen KC, Baron EJ, Colombo AL, Girmenia C, Sanchez-Souza A, Palacio A, et al. Comparison of the susceptibilities of *Candida* spp. to fluconazole and voriconazole in a 4-year global evaluation using disk diffusion. *J Clin Microbiol* 2003; 41 (12): 5623-32.
19. Lima EO, Farias NMP. Atividade antifúngica de óleos essenciais, obtidos de plantas medicinais, contra leveduras do gênero *Candida*. *R Bras Ci Saúde* 1999; 3(1/3): 51-64.
20. Castro LO, Ramos RLD. Principais gramíneas produtoras de óleos essenciais. Porto Alegre, Rio Grande do Sul: FEPAGRO; 2003.
21. Ortiz RS, Marrero GV, Navarro ALT. Instructivo técnico para el cultivo de *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf (caña santa). *Rev Cubana Plant Med* 2002; 7 (2): 89-95.
22. Akisue G, Akisue MK, Silva RJ, Andaluz MI. Padronização da droga e do extrato fluído de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. *Lecta* 1996; 14 (2): 109-19.
23. Cortez LER, Jacomossi E, Cortez DAG. Levantamento das plantas medicinais utilizadas na medicina popular de Umuarama, PR. *Arq Ciênc Saúde Unipar* 1999; 3 (2): 97-104.
24. Mishra AK, Dubey NK. Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60 (4): 1101-5.
25. Pontes ZBV. Atividade antifúngica de rodutos naturais e sintéticos sobre espécies de *Trichosporon* Behrend [Tese de doutorado]. João Pessoa, Paraíba: Universidade Federal da Paraíba, 2002. 189 pp.
26. Cimanga K, Kambu K, Tona L, Apers S, De Bruyne T, Hermans N, et al. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *J Ethnopharmacol* 2002; 79: 213-20.
27. Martins PM. Influência da temperatura e da velocidade do ar de secagem no teor e da composição química do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf) [Tese de Magister Scientiae]. Viçosa, Minas Gerais: Universidade Federal de Viçosa, 2000. 77 pp.

28. Fortes CC, Dalston RCR. Manual de química orgânica experimental. 1a ed. Brasília: Universa; 2003.
29. Adams RP. Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. 4 th ed. Illinois: Carol Stream; 1995.
30. Okeke MI, Iroegbu CV, Eze EN, Okoli AS, Esimone CO. Evaluation of extracts of the roots of *Landolphia oweeunce* for antibacterial activity. *J Ethnopharmacol* 2001; 78 (2/3): 119-27.
31. Cole MD. Key antifungal, antibacterial and anti-insect assays – a critical review. *Biochem Syst Ecol* 1994; 22 (8): 837-56.
32. Grove DC and Randall WA. Assay methods of antibiotics: a laboratory manual. New York: Medical Encyclopedia Inc; 1955.
33. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Pennsylvania: NCCLS; 2003.
34. Schuck VJA, Fratini M, Rauber CS, Henriques A, Schapoval EES. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Cymbopogon citratus*. *Rev Bras Ciên Farm* 2001; 37 (1): 45-9.
35. Onawunmi GO. Evaluation of the antifungal activity of lemon grass oil. *Int J Crude Drug Res* 1989; 27 (2): 121-6.
36. Carmo CME, Lima EO, Milan EP. Atividade antifúngica e extratos e óleos essenciais contra *Candida albicans* isolada de pacientes com AIDS. *Rev Bras Farm* 1998; 79 (3/4): 108-11.

Mercury and methylmercury content, fatty acids profile, and proximate composition of consumed fish in Cananéia, São Paulo, Brazil

Avaliação da concentração de mercúrio total e metilmercúrio e composição de ácidos graxos em pescado consumido em Cananéia, São Paulo, Brasil

RIALA6/1242

Michel Rodrigues da Silva Morales CURCHO¹, Luciana Aparecida FARIAS¹, Sueli Regina BAGGIO², Barbara Cortopassi FONSECA¹, Soraia Maria do NASCIMENTO¹, Maritsa Carla de BORTOLI³, Elisabete de Santis BRAGA⁴, Déborah Inês Teixeira FÁVARO^{1*}

*Endereço para correspondência: Laboratório de Análise por ativação com Nêutrons, Centro do Reator de Pesquisa Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), São Paulo, SP, Brasil
telefone: (011) 3133-9977, e-mail: defavaro@ipen.br

¹Laboratório de Análise por ativação com Nêutrons Centro do Reator de Pesquisa, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), São Paulo, SP, Brasil

²Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos, Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), , Campinas, SP, Brasil

³Laboratório de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

⁴Laboratório de Nutrientes, Micronutrientes e Traços nos Oceanos (LABNUT), Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

Recebido: 05.05.2009 – Aceito para publicação: 08.12. 2009

ABSTRACT

Fifty three individuals of four most commonly consumed fish species by the Cananéia city population, in São Paulo, Brazil, were analyzed to determine total mercury (Total Hg) and methylmercury (MeHg) levels, as well as, proximate composition and fatty acid profile. The muscle of three carnivorous species *Centropomus parallelus* (Fat snook), *Macrodon ancylodon* (King weakfish) and *Micropogonias furnieri* (Whitemouth croaker), and one planktivorous species *Mugil platanus* (Mullet) were analyzed. MeHg and Total Hg determinations were performed by Cold Vapour Atomic Absorption Spectrometry (CV AAS). Fatty acid profile was determined by gas chromatography (GC) whilst AOAC methods were used for proximate analysis. The total Hg results (interval) in wet weight basis were: Whitemouth croaker (114–442 $\mu\text{g kg}^{-1}$), Fat snook (15–178 $\mu\text{g kg}^{-1}$), King weakfish (12–100 $\mu\text{g kg}^{-1}$) and Mullet (<10–25 $\mu\text{g kg}^{-1}$), and none of the fish species exceeded the Brazilian legislation limits. MeHg values were below FAO/WHO (2007) recommendations. In nutritional terms, the results for proximate composition for all four fish species proved to be an excellent protein source with very low lipid content as was expected. Fatty acids of all fish species were adequate. Total polyunsaturated fatty acid contents varied from 21.9% (*Micropogonias furnieri*) to 26.4% (*Mugil platanus*). For the n-3 family, *Macrodon ancylodon* presented the highest value (20.9%) and *Micropogonias furnieri* the lowest one (15.8%). *Mugil platanus* (Mullet) species also showed good levels for all parameters analyzed and very low concentrations of contaminants, indicating it as a good nutritional choice in terms of risks and benefits.

Key words. mercury, methylmercury, proximate composition, fatty acids, fish, Cananéia

RESUMO

Cinquenta e três amostras de músculo de pescados mais consumidos pela população de Cananéia, foram avaliados em relação aos teores de mercúrio total (HgT) e metilmercúrio (MeHg), composição centesimal e de ácidos graxos. Os músculos de três espécies carnívoras *Centropomus parallelus* (Robalo Peba), *Macrodon ancylodon* (Pescada) e *Micropogonias furnieri* (Corvina), e uma espécie planctívora, *Mugil platanus* (Tainha) foram analisadas. As determinações de Hg total e MeHg foram feitas por espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio (CV AAS). A composição de ácidos graxos foi determinada por cromatografia a gás (GC) e a composição centesimal, de acordo com as metodologias preconizadas pela AOAC. Os intervalos de concentração obtidos para Hg total (peso úmido) foram: Corvina (114–442 $\mu\text{g kg}^{-1}$), Robalo (15–178 $\mu\text{g kg}^{-1}$), Pescada (12–100 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e Tainha (<10–25 $\mu\text{g kg}^{-1}$), não excedendo os limites da legislação brasileira. Os valores de MeHg se encontraram abaixo das recomendações da FAO/WHO(2007). Em termos nutricionais, os resultados de composição centesimal para todas as espécies analisadas provaram ser uma excelente fonte de proteína com conteúdo muito baixo de lipídeos. Os teores de ácidos graxos poliinsaturados totais variaram de 21,9% (Pescada) a 26,4% (Tainha). Para a família n-3, *Macrodon ancylodon* apresentou o maior valor (20,9%) e *Micropogonias furnieri*, o menor (15,8%). A espécie *Mugil platanus* apresentou níveis adequados para todos os parâmetros analisados e baixa concentração para os contaminantes, indicando-o como uma boa escolha nutricional em termos de riscos e benefícios.

Palavras-chave. mercúrio, metilmercúrio, composição centesimal, ácidos graxos, pescado, Cananéia.

INTRODUCTION

Lipids in fish, as well as, fatty acid composition have been receiving a great deal of attention by researchers in the last years, due to their beneficial effects on human health. This has occurred at parallel to the development of equipment and methodological analysis techniques. The advances of these developments have permit the association of the structure of some fatty acids, especially n-3 and n-6 families, with the essentiality, biochemical metabolism and importance of these fatty acids in different fish species (saltwater and freshwater) and its role in human health¹.

Fish constitute an important source of protein for many people throughout the world. As such, fish consumption has increased in importance among health-conscious people². Fish represent also a healthy source of protein, providing omega-3 (n-3) the fatty acids that reduce cholesterol levels, and reduce the incidence of heart disease, stroke and pre-term deliveries³. At the same time, contaminant levels in fishes have considerable interest because of the potential effects on the fish themselves and the organisms that consume them, top-level receptors, including humans². Thus, recently a number of researchers have started quantitative estimates of risks vs. benefits of fish intake on human health.

Since fish fauna serves as an important food source, it is essential to know the impact of water pollution on these organisms considering the action of the bioaccumulation and biomagnification processes. Any change in the natural conditions of aquatic medium causes several physiological adjustments in fish⁴. Given the fact that chemical constituents vary greatly from species to species, as well as, from individual to individual of the same species due to differences in seasons, locations, habitat, gender, age and feeding habits, it is important to know the composition and nutritional value of some Brazilian fish species consumed by coastal populations.

In this study, 53 individuals of the four most commonly consumed fish species by the Cananéia city population, São Paulo State, Brazil, were analyzed to determine contaminants, *i.e.*, total mercury (Total Hg) and methylmercury (MeHg), as well as, proximate composition and fatty acid profile. Cananéia population has a very peculiar characteristic in that it consumes large amounts of fish due to the fact that there are large number of individuals who make their living through fishing.

MATERIAL AND METHODS

Environmental aspects of the study area

The Cananéia-Iguape estuarine-lagoon complex is one of the world's most important marine life areas. In 1999 it received the UNESCO recognition as Natural Patrimony of Humanity. The Cananéia Island, located at the southern region represents a large portion of the system under natural conditions, *i.e.* less affected by anthropic influences.

The Cananéia-Iguape Estuary is composed of four water bodies and four islands. The population's main source of income is tourism and fishing. The region's population according to the 2006 Brazilian census is 14.195⁵. Due to the presence of mangroves on the banks of the estuary, high organic matter content and phytoplankton production are favored, consequently with a great abundance of fish and marine life⁶.

Sampling and sample preparation

The fish samples were acquired directly from local fisheries in Cananéia during August of 2007. All samples acquired in local markets were assessed for quality indicators and external organoleptic characteristics (eyes, gills and scales). The species *Centropomus parallelus*, *Macrodon ancylodon*, *Micropogonias furnieri* and *Mugil Platanus* were analyzed. These species are the most consumed by Cananéia inhabitants. This information was taken from Farias et al⁷. Fish were conditioned in isothermic boxes in crushed ice and identified⁸. Once in the laboratory fish were evaluated according to total length, total weight and body weight. After this, individual muscle tissues were separated and dried at 50⁰ C until constant weight. Dried samples were ground, homogenized and prepared for chemical analysis. These analyses were performed at the Neutron Activation Analysis Laboratory - IPEN.

For proximate composition and fatty acids profile a pool of each fish species analyzed was prepared. The pool was prepared from similar amounts of each individual sample of each species. After mixture of the individual samples they were again homogenized, resulting in a pool for each species: *Centropomus parallelus*, *Macrodon ancylodon*, *Micropogonias furnieri* and *Mugil Platanus*.

Total mercury and methyl mercury determination

Mercury (Hg) and methyl mercury (MeHg) determination were performed using Cold Vapor Atomic

Absorption Spectrometry (CV AAS), using a FIMS from Perkin Elmer. For total Hg determination about 200 to 500 mg of fish samples were digested with a mixture of concentrated HNO_3 and H_2SO_4 in Teflon vials. The vials were closed and left overnight at room temperature. The following day, the vials were put into an aluminum block at 90°C and left there for 3 hours. The samples were allowed to cool at room temperature and the final volume was completed to 50 mL with Milli-Q water. For MeHg determination, the methodology was based on the leaching of the sample with 6M HCl, separation of organic from inorganic Hg through an ionic exchange resin (1 mL of ionic exchange resin - Dowex 1-X8. 200-400 mesh) used to separate non-ionic Me-HgCl from a HgCl_4^{2-} complex, retained on the column. After separation, samples were digested in a mixture of HNO_3 and H_2SO_4 and mercury determination done by using CV AAS.

The analytical procedure used (wet digestion) was that of Horvat⁹ with some modifications. This technique has many significant advantages in comparison with the conventional batches procedures, as lower consumption of sample solutions and reagents, simplicity for Hg determination, high sensitivity and relative freedom from interference. The peak area signals were measured and the Hg content of the samples was calculated against the Hg standard curves. The Hg^{2+} is reduced on line by SnCl_2 1.1% (m/v) in HCl 3% (v/v) at a flow of 5 – 6 mL min^{-1} . Argon was used as a carrier gas at a constant flow of 100 mL min^{-1} . All analytical methods were developed and validated for precision and accuracy by means of reference materials analyses with certified values for the elements determined: Dogfish muscle (DORM-1, NRCC) and Dogfish liver (DOLT-1, NRCC).

Proximate Composition

Determination of humidity, ash and proteins were performed according to the AOAC methodologies¹⁰. Since there were not enough samples for all analyzes and carbohydrates are not a regular component of fresh fish, lipid content was calculated from the difference of the total amount of humidity, ash and proteins.

Lipid profile was converted to relative values of g/100g of fish. The energetic value was calculated applying the Atwater factors 4 – 9 – 4 – 7 kcal/g of protein, lipids, carbohydrates and alcohols, respectively. These analyzes were undertaken at the Food and Experimental Nutrition Laboratory of the Pharmaceutical Science Institute (USP-SP).

Fatty acid determination

Lipid extraction according to Bligh & Dyer methodology¹¹

The wet tissue was homogenized with a mixture of chloroform and methanol in such proportions that a miscible system is formed with the water in the tissue. Dilution with chloroform and water separates the homogenate into two layers, the chloroform layer containing all the lipids and the methanolic layer containing all the non-lipids. A purified lipid extract is obtained merely by isolating the chloroform layer¹¹. This procedure was undertaken at LAN, the lipid extracts were frozen and then sent to Institute of Food Technology (ITAL) for fatty acid determination.

Fatty acid determination

The analyses were performed at the Center for Food Science and Quality from ITAL, Campinas. For fatty acid determination, one aliquot of lipid extract containing approximately 400 mg for each pool of fish species analyzed was taken and dried in a rotatory evaporator. The transmethylation was done according to Hartman & Lago methodology¹², using ammonium chloride solution and sulfuric acid in methanol as an esterificant agent. The gas chromatography was performed using a gas chromatography, (Varian, model 3900, Palo Alto, California, USA) equipped with an auto sampler; injector split, ratio 1/75; fused silica capillary column (100 m x 0.25 mm i.d., 0.20 μm film thickness) (CP-SIL 88, Chrompack, Middelburg, The Netherlands) and flame ionization detector. The initial column temperature was 120°C for 5 minutes and then programmed to increase at 5-C/min to 235°C ; the injector temperature was set at 270°C ; the detector temperature at 300°C ; injection volume was 1 μL . The carrier gas was hydrogen at a flow rate of 1 mL/min and nitrogen was used as the make-up gas at 30 mL/min. The fatty acids were identified by comparison of the retention times of the sample with those of the standards and by spiking. To verify the identity and accuracy of the method a total of 37 saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acid standards (37 FAME Mix 47885-U, SulpecoTM, Bellefonte, PA, USA) were used. Quantification was done as area percentages and the results were expressed in % of area.

RESULTS AND DISCUSSION

The methodology validation for total Hg and MeHg for CV AAS were carried out by reference materials

analyses. The results are presented in Table 1. For total Hg the relative standard deviation (RSD) varied from 1.7 to 11.7% and relative error (RE), from 0.9 to 2.6 %. For MeHg determination relative standard deviation ranged from 3.1 to 8.0% and relative error, from 1.4 to 12.0%, showing the precision and accuracy of both analytical methodologies, respectively.

Table 2 presents mean and concentration intervals for total Hg ($\mu\text{g kg}^{-1}$) and Me Hg contents (%) by CV AAS, in dry and wet weight, total weight and total length for the fish species analyzed. The total Hg averages and ranges (wet weight basis) for the species analyzed were: $236 \pm 111 \mu\text{g kg}^{-1}$ (114 - 442) for *Micropogonias furnieri* (Whitemouth croaker); $42 \pm 24 \mu\text{g kg}^{-1}$ (12 - 100) for *Macrodon ancylodon* (King weakfish); $48 \pm 43 \mu\text{g kg}^{-1}$ (15 - 178) *Centropomus parallelus* (Fat snook) and $8.3 \pm 5.6 \mu\text{g kg}^{-1}$ (<10 - 25) for *Mugil platanus* (Mullet), respectively.

The total Hg averages and ranges (dry weight basis) were: $1071 \pm 504 \mu\text{g kg}^{-1}$ (516 - 2008) for *Micropogonias furnieri*; $191 \pm 109 \mu\text{g kg}^{-1}$ (56 - 456) for *Macrodon ancylodon*; $193 \pm 173 \mu\text{g kg}^{-1}$ (61 - 712) for *Centropomus parallelus* and $33 \pm 22 \mu\text{g kg}^{-1}$ (<10 - 98) for *Mugil platanus*, respectively. MeHg averages and ranges (dry weight) for these species were: $652 \mu\text{g kg}^{-1}$ (227 - 1487), $171 \mu\text{g kg}^{-1}$ (37 - 452); $88 \mu\text{g kg}^{-1}$ (22 - 399) and $< 10 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectively. In relation to total Hg values, MeHg concentration values corresponded to 34 to 85% in *Micropogonias furnieri*, 37 to 99% in *Macrodon ancylodon* and 18 to 61% in *Centropomus parallelus*. The concentration values for *Mugil platanus* species were too low for MeHg determination.

Concerning populational risk to toxic element exposure, Hg and MeHg, Hg did not exceed the Brazilian legislation limits¹³ for predatory ($1000 \mu\text{g Hg kg}^{-1}$) and non predatory species ($500 \mu\text{g kg}^{-1}$), in wet weight. For MeHg there is no limit in the Brazilian legislation, but the values were bellow FAO/WHO recommendations of $1000 \mu\text{g Hg kg}^{-1}$ for MeHg levels in predatory species and $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ in non-predatory ones¹⁴.

Table 3 shows the results obtained for the fatty acid profile for the pool of the fish species analyzed. Total saturated fatty acids ranged from 28% in *Macrodon ancylodon* to 41.8% in *Mugil platanus*. Total polyunsaturated fatty acid contents varied from 21.9% in *Micropogonias furnieri* to 26.4% in *Mugil platanus*. These species presented similar proportions of polyunsaturated fatty acids of the n-3 family (average 17.8%) and of the n-6 family (average 7.0%).

Regarding the n-6 family *Mugil platanus* species showed the highest values (8.9%) and *Macrodon ancylodon*, the lowest ones (4.4%). On the other hand, for the n-3 family, *Macrodon ancylodon* presented the highest value (20.9%) and *Micropogonias furnieri* the lowest one (15.8%).

Lipid composition in fish tissues can be affect by diet and environmental factors such as salinity, temperature, seasons and geographical location. Although several marine fish species are rich in polyunsaturated fatty acids n-3 family, their levels can vary according to different species. Eicosapentaenoic (EPA) (C20:5 n-3) and docosahexaenoic (DHA) (C22:6 n-3) fatty acids of the

Table 1. Results for total Hg and Me Hg in the certified reference materials by CV AAS (n = 5)

Certified Reference Materials	Hg _{total} (mean ± s.d.)	Certified Value	RSD (%)	RE (%)	MeHg (mean ± s.d.)	Certified Value	RSD (%)	RE (%)
DOLT-3 (Dogfish Liver) (mg kg ⁻¹)	3.4 ± 0.4	3.37 ± 0.14	11.7	0.9	1.40 ± 0.1	1.59 ± 0.12	8.0	12.0
DORM-1 NRCC (Dogfish Muscle) (mg kg ⁻¹)	777 ± 13	798 ± 74	1.7	2.6	740 ± 23	731 ± 60	3.1	1.4

n – number of determinations

Table 2. Mean and concentration interval for total Hg ($\mu\text{g kg}^{-1}$) and Me Hg contents (%) by CV AAS (dry and wet weight), total weight and total length for the fish species analyzed

Fish species	Feed Habits	Total weight (g)	Total length (mm)	Total Hg Muscle (wet weight)	Total Hg Muscle (dry weight)	MeHg (interval) (%)
<i>Micropogonias furnieri</i> (Whitemouth croaker) (11)	Detritivorus	1199 ± 231 (832-1399)	461 ± 25 (414 – 507)	236 ± 111 (114 – 442)	1071 ± 504 (516 – 2008)	(34 – 85)
<i>Macrodon ancylodon</i> (King weakfish) (16)	Carnivorous	321 ± 99 (239 – 613)	283 ± 113 (281 – 340)	42 ± 24 (12 – 100)	191 ± 109 (56 – 456)	(37 – 99)
<i>Centropomus parallelus</i> (Fat snook) (12)	Carnivorous	474 ± 76 (312 – 563)	388 ± 32 (318 – 424)	48 ± 43 (15 – 178)	193 ± 173 (61 – 712)	(18 – 61)
<i>Mugil platanus</i> (Mullet) (14)	Planktivorus	1469 ± 347 (807 – 1936)	544 ± 51 (432 – 600)	8.3 ± 5.6 (<10 – 25)	32 ± 22 (<10 – 98)	-

(n) – number of samples analyzed

n-3 family are abundant in various marine fish species, specifically those that feed on polyunsaturated fatty acid n-3 family rich-plankton.

Omega-3 and 6 fatty acids are essential for human beings, but they are not synthesized by the body. Their deficiency can provoke adverse health effects. These fatty acids are constituents of cellular structure and are needed for membrane formation¹⁵. Omega-6 deficiency can provoke dermatological symptoms, while n-3 deficiency is related to neurological and visual disturbances¹⁶.

In the four fish species analyzed, the predominancy of unsaturated fatty acids in relation to total lipids (50.4 to 67.2%) could be observed. The higher concentration of monounsaturated fatty acids ranged from 24.7 % (Mullet) to 41.9% (King weakfish) (Table 3). The fatty acid composition revealed that the most abundant were palmitic acid (C16:0) and oleic acid (C18:1 n9) ; palmitoleic acid (C16:1 n7) and stearic acid (C18:0) in lower proportions in the four fish species analyzed with levels ranging from 12.1 to 27.7%, from 11.9 to 28.6%, 4.9 to 12.0% and from 4.9 to 13.9%, respectively of the total fatty acids. Among the fish species analyzed *Centropomus parallelus* presented the highest proportion of palmitic acid (27.7%) and *Macrodon ancylodon*, the

highest proportion of oleic (28.6%), palmitoleic (12.0%) and stearic acids (13.9%). The (EPA + DHA) fatty acid levels were higher for *Macrodon ancylodon* (18.5%) and lower for *Micropogonias furnieri* (11.9%).

As is already known, fish chemical composition can vary in function due to several endogenous and exogenous factors such as: genetics, size, gender, reproductive age, feeding habits, environmental factors, temperature and seasons^{17, 18}.

According to published literature, consumption of n-6/n-3 ratio ranging from 5:1 to 10:1 is recommended for adults for the prevention of cardiovascular risks¹⁹. Even though in the present study n-6/n-3 ratio ranged from 0.21 (*Macrodon ancylodon*) to 0.51 (*Mugil platanus*), it must not be forgotten that fish is only a small part of a whole diet. Therefore it could be an important contribution in reaching the recommended ratio.

Table 4 presents the results obtained for proximate composition in the fish pool samples and literature values from TACO2²⁰, USDA²¹ and Menezes²² for comparison for all fish species analyzed. For the *Micropogonias furnieri* species, in general, the obtained values were similar to the literature²⁰. However, the results for fatty acid n-3 family were higher and total lipids lower.

Table 3. Fish species (muscle pool) fatty acid composition, expressed in area (%) of the relative area concerning the total lipids

Fatty acids	<i>Micropogonias furnieri</i> (Whitemouth croaker)	<i>Macrodon ancylodon</i> (King weakfish)	<i>Centropomus parallelus</i> (Fat snook)	<i>Mugil platanus</i> (Mullet)
C 13:0	Nd	Nd	nd	0.1
C 14:0	2.7	0.7	1.5	4.4
C 15:0	0.7	0.1	1.1	6.8
C 15:1	Nd	Nd	nd	0.3
C 16:0	26.3	12.1	27.7	22.5
C 16:1n7	10.7	12.0	4.9	8.1
C 17:0	0.8	0.2	1.2	1.7
C 17:1	0.7	0.1	1.4	3.7
C 18:0	7.0	13.9	8.2	4.9
C 18:1n9t	0.4	0.4	0.4	0.3
C 18:1n 9	17.3	28.6	17.6	11.9
C 18:2n6t	0.1	nd	0.6	0.2
C 18:2n6	1.3	0.8	2.1	3.3
C 20:0	0.4	0.6	0.3	0.2
C 18:3n3t	0.1	nd	0.1	0.5
C 20:1n11	1.4	0.8	0.8	0.4
C 18:3n3	0.7	0.4	0.6	1.3
C 21:0	0.1	nd	nd	nd
C 20:2n6	0.8	0.5	0.3	1.4
C 22:0	0.3	0.2	0.5	1.2
C 20:3n6	0.2	0.1	0.2	0.2
C 20:3n3	0.2	nd	0.1	0.1
C 22:1	0.2	0.1	0.1	0.2
C 20:4n6	3.4	2.7	5.7	3.4
C 22:2n6	0.4	0.3	0.1	0.6
C 24:0	Nd	0.2	0.3	nd
C 20:5n3	4.6	3.9	1.9	5.9
C 24:1	0.3	0.3	0.2	0.1
C 22:5n3	3.0	2.0	2.6	4.1
C 22:6n3	7.3	14.6	11.8	6.1
Σ Saturated	38.3	28.0	40.8	41.8
Σ Monounsaturated (MUFA)	30.6	41.9	25.0	24.7
Σ Polyunsaturated (PUFA)	21.9	25.3	25.4	26.4
Σ omega 6	6.1	4.4	8.4	8.9
Σ omega 3	15.8	20.9	17.0	17.5
Trans	0.6	0.4	1.1	1.0
NI	8.6	4.4	7.7	6.1
Σ (MUFA+PUFA)	52.5	67.2	50.4	51.1
n-6/ n-3	0.39	0.21	0.49	0.51
Σ (EPA+DHA)	11.9	18.5	13.7	12.0

nd = not detected (detection limit 0.1%); N.I. = not identified

Table 4. Analyzed fish samples (pool) proximate composition and TACO2²⁰, USDA²¹ and Menezes²² data for comparison

Fish species	<i>Micropogonias furnieri</i> (Whitemouth croaker)	<i>Macrodon ancylodon</i> (King weakfish)	<i>Centropomus parallelus</i> (Fat snook)	<i>Mugil platanus</i> (Mullet)	TACO2 ²⁰ (Whitemouth croaker)	TACO2 ²⁰ (King weakfish)	USDA ²¹ (Mullet)	Menezes ²² <i>Centropomus undecimalis</i> (Common snook)	Menezes ²² <i>Mugil cephalus</i> (Tainha)
Humidity	77.9 ± 1.7	77.8 ± 4.9	76 ± 5.7	75.1 ± 3.0	79.4	79.5	77.0	79.6 ± 1.1	78.4 ± 1.6
Ash	1.06	1.07	1.17	1.26	1.1	0.9	1.2	1.09 ± 0.15	1.06 ± 0.13
Proteins	19.6	18.8	20.1	20.9	18.6	16.7	19.35	18.3 ± 1.2	20.8 ± 1.6
Lipids ¹	1.46	2.35	2.75	2.71	1.6	4	3.79	2.5 ± 0	2.5 ± 0
Lipids profile ²									
Saturated	0.56	0.66	1.12	1.13	0.7	0.9	1.116		
Monounsaturated	0.45	0.98	0.69	0.67	0.5	2.3	1.078		
Polyunsaturated	0.32	0.59	0.7	0.72	0.1	0.3	0.715		
Ômega 6	0.09	0.10	0.23	0.24	0.1	0.03	0.088		
Ômega 3	0.23	0.49	0.47	0.47	0.02	0.02	0.025		
Trans	0.008	0.009	0.03	0.03					
Not identified	0.12	0.10	0.21	0.16					
Energy ³	91.4	96.3	105.1	108.1	94	107	117		

¹ Fats calculated over humidity, ashes and proteins values

² Lipid profile calculated and expressed over total lipid content

³ Energy in kcal

For *Macrodon ancylodon* species, the results for protein were higher than the literature, as well as, for polyunsaturated fatty acids and n-3 and n-6 fractions.

The results for *Mugil platanus* species were compared to the USDA National Nutrient Database for Standard Reference (Release 18)²¹. The lipid content was lower than the literature and higher for polyunsaturated fatty acids of the n-3 and n-6 families. Comparing the values with literature for *Mugil platanus* from Menezes²² similar values were observed.

The results obtained for *Centropomus parallelus* in the present study were compared to the results obtained for *Centropomus undecimalis* data presented from Menezes²² and values were similar as well.

The fishes analyzed presented different values in their chemical composition (Table 4). The humidity values ranged from 75.1% in *Mugil platanus* to 77.9% in *Micropogonias furnieri*, while ash content observed was lower in *Micropogonias furnieri* and higher in *Mugil platanus* species. The average protein content was $19.9 \pm 0.9\%$ with a very narrow protein content interval (from 18.8 to 20.9%).

Micropogonias furnieri, *Macrodon ancylodon* and *Mugil platanus*, in general, presented protein values higher than those found in the literature (Table 4).

For polyunsaturated fatty acids *Mugil platanus* presented similar values to those found in the literature, and *Micropogonias furnieri* and *Macrodon ancylodon* presented higher values. Regarding n-3 and n-6 contents for the four species, the results were, in general, higher than those values published in the literature (Table 4).

CONCLUSION

Concerning populational risk to toxic element exposure, Hg and MeHg, Hg did not exceed the Brazilian legislation limits¹³ for predatory ($1000 \mu\text{g Hg kg}^{-1}$) and non-predatory fish species ($500 \mu\text{g kg}^{-1}$), in wet weight basis. For MeHg the value set by FAO/WHO¹⁴, of $1000 \mu\text{g Hg kg}^{-1}$ for predatory fish species and $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ in non-predatory ones, were not found in the studied samples. Even if mercury or methylmercury were found in the fish, levels would be considered safe for consumption, although the amount of fish that the population indeed consumes on a daily or weekly basis must be assessed.

In this study the whole diet of Cananéia's population was not assessed, but as fish play an important role for the population, from the nutritional point of view

the results for proximate composition for all four species showed that these fishes can be an excellent protein source with very low lipid content, as was expected. Regarding the fatty acid profile, all fish species analyzed were also adequate.

Micropogonias furnieri (Whitemouth croaker) presented higher total Hg content because it is a predatory species. *Mugil platanus* (Mullet), however, showed good levels for all parameters analyzed and very low concentrations of total Hg and MeHg, indicating that this may be a good nutritional choice in terms of risks and benefits. Unfortunately this species has seasonal availability and is relatively expensive and *Macrodon ancylodon* (King weakfish) is much more consumed.

REFERENCES

1. Souza SMG, Anido RJ, Tognon FC. Fatty acids Omega-3 and Omega-6 in fish nutrition – sources and relations. *Revista Ciências Agroveterinárias*. 2007; 6(1): 63-71.
2. Burger J, Gochfeld M. Heavy metals in commercial fish in New Jersey. *Environmental Research*. 2005; 99: 403–12.
3. Anderson PD, Wiener JB. Eating fish. In: Graham JD, Wiener JB, editors. *Risk versus Risk: Tradeoffs in Protecting Health and the Environment*. Harvard, University Press, Cambridge, MA.,1995, p. 104–23.
4. Black EC. Blood levels of hemoglobin and lactic acid in some freshwater fishes following exercise. *J. Fish. Res. Bd., Canada*.1955; 12 (6): 917 - 9.
5. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [IBGE], 2006. *IBGE Cidades@*. Site: <http://www.ibge.gov.br>. (Acesso em 11mar 2008).
6. Garcia TR. Impactos da implantação de uma cooperativa de produção de ostras junto a comunidades extrativistas caícaras do litoral sul/SP: um estudo de caso [Tese de Doutorado]. São Paulo, Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, 2005.
7. Farias LA, Santos NR, Fávoro DIT, Braga ES. Mercúrio total em cabelo de crianças de uma população costeira, Cananéia, São Paulo, Brasil. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro. 2008; 24(10): 2249-56.
8. Figueiredo JL, Menezes NA. Manual de peixes marinhos do Sudeste do Brasil III. Teleostei (2). São Paulo: Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, 1980, 90p.
9. Horvat, M. Mercury analysis and speciation in environmental samples. In W. Baeyens et al (eds), *Global and Regional Mercury Cycles: Sources, Fluxes and Mass Balances* (NATO ASI Series, Partnership Sub-Series: 2), The Netherlands, Kluwer Academic Publishers, 1996, p.1-31.
10. Association of official analyst chemists. *Official methods of analysis* (AOAC). 16ª ed., 3ª rev. Gaithersburg: Published by AOAC International, 1997. v.2, cap. 32, p.1-43.
11. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Phys.*1959; 37(8): 911-7.
12. Hartman L, Lago RCA. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Lab. Pract.* 1973; 22: 475-7.

13. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 695 1998. . Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, p.5-6, 30 mar.1998. Seção 1.
14. FAO-WHO Additives series: 58. Safety evaluation of certain food additives and contaminants. Sixty-seventh meeting of the joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), 2007, 337p.
15. Santos KMO, Aquino RC. Grupo dos óleos e gorduras, In: Philippi, S. T. (Org), Barueri: Manole editora, 2008. p. 241-92.
16. Rogero MM, Gomes MR, Tirapegui J. Lipídeos In: de Angelis, R. C.; Tirapegui, J. (Org) Fisiologia da Nutrição Humana Aplicada: Aspectos Básicos, Aplicados e Funcionais. São Paulo, Atheneu editora, 2007, p. 49-68.
17. Luzia LA. et al. The influence of season on the lipid profiles of five commercially important species of Brazilian fish. *Food Chemistry*, Champaign. 2003, 83(1): 93-7.
18. Moreira AB. et al. Fatty acids profile and cholesterol contents of three Brazilian *Brycon* freshwater fishes. *Journal of Food Composition and Analysis*, London. 2001;14(6): 565-74.
19. National Academic Press. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids (macronutrients). 1357p., 2005. Available from : <http://www.nap.edu/catalog/10490.html>. Accessed in January, 2009.
20. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO 2) versão 2, 2ª edição - Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação – NEPA, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, 2006.
21. USDA Nutrient Database for Standard Reference, Release 18 (SR18), <http://www.ars.usda.gov/research/publications> accessed in February, 2009.
22. Menezes MES, Lira GM, Omena CMB, Freitas JD, Sant’Ana AEG. Proximate composition, cholesterol and fatty acid of the fished species of estuarino Tainha (*Mugil cephalus*) and Camurim (*Centropomus undecimalis*) from Mundaú Lagoon, Al/Brazil. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2008; 67(2): 89-95.

Determinação de mercúrio e metilmercúrio em amostras de cabelo e peixes

Determination of mercury and methylmercury in fish and hair samples

RIALA6/1243

Luciana Aparecida FARIAS¹*, Déborah Inês Texeira FÁVARO, Marina Beatriz Agostini VASCONCELLOS

*Endereço para correspondência: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo, SP

¹Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo, SP

Recebido: 05.06.2009 – Aceito para publicação: 07.12.2009

RESUMO

A Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Vapor Frio (CVAAS) está entre os métodos mais utilizados atualmente para a determinação de mercúrio (Hg) e metilmercúrio (MeHg) em materiais biológicos devido a vantagens, tais como: facilidade de operação, rápida resposta analítica, boa sensibilidade e baixo custo. Neste estudo apresentam-se os resultados obtidos no programa de intercomparação da Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA) o *World-Wide Intercomparison Exercise for the Determination of Trace Elements and Methylmercury in Tuna Fish Flesh Homogenate* (IAEA-436), realizado no período de outubro de 2004 a julho de 2005. A precisão e a exatidão do método para determinação de Hg e MeHg foram verificadas por meio da análise de materiais de referência com valores certificados para ambos. Os resultados obtidos apresentaram boa precisão e exatidão, com desvio padrão relativo de 2,2 a 10 % e erro relativo, de 0,4 a 12% para MeHg e desvio padrão relativo de 2,6 a 11,7% e erro relativo, de 0,9 a 3,11%, para Hg. O método apresentado mostrou-se adequado para determinação de baixos níveis destes contaminantes em amostras de cabelo e peixe e pode ser usado em estudos relacionados aos efeitos do Hg e suas espécies na saúde do ser humano.

Palavras chave. metilmercúrio, peixe, cabelo, espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio.

ABSTRACT

The cold vapor atomic absorption spectrometry (CVAAS) is one of the most useful analytical technique for mercury and methylmercury determinations in biological materials due to several advantages such as operation facility, fast analytical response, good sensitivity and low cost. This study also shows the results obtained by our laboratory in the *World-Wide Intercomparison Exercise for the Determination of Trace Elements and Methylmercury in Tuna Fish Flesh Homogenate* (IAEA-436), during the period of October 2004 and July 2005. The precision and accuracy of the method for total mercury and MeHg determinations were verified by means of the reference material analyses. The results obtained showed good precision and accuracy with relative standard deviation ranged from 2.2 to 10 % and relative error from 0.4 to 12% for MeHg and relative standard deviation ranged from 2.6 to 11.7 % and relative error from 0.9 to 3.1% for Hg. The method presented has been shown to be suitable for determination of background levels of these contaminants in fish and hair samples and can be used in studies related to the health effects of mercury and its species in man.

Key words. methylmercury, fish, hair, cold vapor atomic absorption spectrometry.

INTRODUÇÃO

O impacto tóxico do metilmercúrio (MeHg) é amplamente conhecido e inúmeros estudos no Brasil têm sido realizados nas últimas décadas^{1, 2, 3}. O mercúrio (Hg) que entra em oceanos, lagos e rios pode ser convertido para MeHg pela ação de bactérias e bioacumula-se na cadeia alimentar aquática. Fatores ambientais tais como pH, condutividade, disponibilidade de oxigênio, temperatura, atividade biológica e concentração de nutrientes, entre outros, são relevantes nos processos de metilação do Hg no ambiente⁴. A conversão entre as diferentes formas é a base do complexo padrão de distribuição do mercúrio em ciclos locais e globais e de seu enriquecimento biológico⁵. Os seres humanos estão expostos ao MeHg principalmente por meio do consumo de peixe contaminado, particularmente espécies de peixes predadores^{6, 7, 8}. Consequentemente, os teores de MeHg em peixes são frequentemente avaliados por inúmeras organizações e pesquisadores com o objetivo de avaliar os níveis de contaminação e estes resultados são, frequentemente, utilizados para checar a qualidade dos peixes disponíveis para a população.

Entretanto, a especiação do Hg em amostras clínicas, biológicas ou ambientais é particularmente complexa, devido às várias formas químicas que este metal pode assumir, à variedade de comportamento das mesmas e a grande diferença na concentração que pode existir entre elas, sendo que da mesma forma que para outras espécies organometálicas, as técnicas utilizadas para a determinação de MeHg envolvem várias etapas analíticas⁹.

Em relação ao Hg e MeHg, na literatura são relatados vários procedimentos e técnicas analíticas para a sua determinação, contudo, o desenvolvimento destes métodos para quantificação de MeHg em amostras biológicas não é tão simples, devido aos problemas relacionados à extração do analito da amostra e ao método de quantificação final empregado. Este deve ser capaz de trazer os compostos de Hg presentes na amostra a formas convenientes à etapa posterior de determinação sem, entretanto, modificar a identidade das espécies ao longo do processo. Para diferenciar o MeHg do Hg total (inorgânico), geralmente utiliza-se uma etapa de separação ou extração, antes de sua quantificação¹⁰. São sugeridos, dependendo da amostra, diversos procedimentos, que envolvem, por exemplo a digestão alcalina¹¹, extração com solventes¹² ou troca iônica^{13,14}.

Uma revisão completa dos métodos de especiação de Hg não é o escopo deste trabalho, mas, a título de

exemplificação, alguns métodos de especiação serão citados a seguir.

Uma das primeiras técnicas desenvolvidas para a especiação do Hg foi baseada na lixiviação ácida, extração com solventes e separação cromatográfica com a utilização de colunas empacotadas e determinação por captura de elétrons (ECD)¹⁵. Todavia, a dificuldade devido à diversidade de matrizes e os níveis muito baixos de MeHg, fez com que este método apresentasse baixa especificidade, alto limites de detecção e difícil empacotamento das colunas. Porém, o interesse em determinar teores de Hg para estimar o seu real impacto no meio ambiente, principalmente em sistemas aquáticos e nos seres humanos, levou a um grande progresso no desenvolvimento de procedimentos de análise para este metal. Além disso, a sua alta toxicidade, mesmo em baixas concentrações, bem como a sua natureza volátil e possibilidade de associação com outros compostos, fez com que fossem necessários procedimentos bastante sensíveis e precisos para a sua determinação em diferentes matrizes.

Entretanto, quanto à detecção instrumental, a cromatografia gasosa é e foi, desde o início, foi o método mais utilizado¹⁶, permitindo a discriminação das diferentes espécies organomercuriais entre si, mas encontrando dificuldades quanto às espécies inorgânicas, sendo também procedimentos normalmente longos e tediosos¹⁷. Contudo, além dos métodos cromatográficos citados, há outros procedimentos de especiação, cromatográficos ou não, encontrados na literatura. Por exemplo, Evans & McKee¹⁸, utilizaram a combinação de cromatografia líquida de alta resolução com detecção amperométrica. Gibičar e colaboradores determinaram MeHg e etilmercúrio (EtHg) utilizando cromatografia gasosa, pirólise e espectrometria de fluorescência atômica¹⁹. Saouter & Blattman²⁰ usaram a cromatografia gasosa/espectrometria de fluorescência atômica. Há estudos também que avaliaram a detecção por ICP-MS, a partir de diferentes processos de extração utilizados para a etapa de separação^{21, 22} e aqueles que se utilizaram de técnicas voltamétricas^{23, 24}.

Entretanto, com o progresso obtido na determinação das diferentes espécies mercuriais, criou-se a necessidade de avaliar constantemente os resultados obtidos a partir dos inúmeros métodos atualmente existentes, verificando-se a necessidade cada vez maior da organização de intercomparações laboratoriais por meio de análises de materiais candidatos a material de referência, preparados por um organismo internacional competente.

E um exemplo de intercomparações realizadas, com a participação de diversos países, são as organizadas pela Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA) que há mais de quatro décadas vem produzindo materiais de referência certificados. O Laboratório Ambiental da Agência, em Mônaco (IAEA_MEL), desde 1973 vem conduzindo essas intercomparações por meio de do “*Analytical Quality Control Services (AQCS)*” com o principal objetivo de avaliar a precisão e exatidão dos resultados obtidos a partir desses materiais de referência e assim, disponibilizar dados confiáveis e de qualidade, aumentando a demanda por materiais de referência certificados para diversos contaminantes em nível de traço, principalmente em amostras marinhas.

Neste estudo são apresentados os resultados obtidos no programa de intercomparação da Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA) o *World-Wide Intercomparison Exercise for the Determination of Trace Elements and Methylmercury in Tuna Fish Flesh Homogenate* (IAEA-436), realizado no período de outubro de 2004 a julho de 2005 utilizando um procedimento simples, sensível, confiável e com baixo limite de detecção para quantificação de Hg total e MeHg. Esse procedimento pode ser utilizado tanto para amostras de cabelo quanto para amostras de peixe (potenciais indicadores biológicos na avaliação da exposição ao Hg e MeHg) e que se destaca pelo protocolo de procedimento analítico, o qual garante a integridade do analito até a etapa posterior de determinação sem, entretanto, modificar a identidade das espécies ao longo do processo de separação. Este método é baseado na lixiviação ácida (HCl) e posterior separação do MeHg do Hg total em uma coluna de troca iônica. Após a etapa de separação, o MeHg sofre uma digestão ácida (HNO_3 e H_2SO_4), seguida da redução com cloreto estano, para posterior quantificação por Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Vapor Frio (CVAAS). Esse procedimento é baseado no trabalho de Horvat e colaboradores²⁵. Estamos considerando nesse estudo que o mercúrio orgânico presente em amostras biológicas de peixe e cabelo, está em sua maioria, na forma de metilmercúrio²⁶.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Aparatos e reagentes

Todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico. O ácido clorídrico (HCl), ácido nítrico (HNO_3) e ácido sulfúrico (H_2SO_4) utilizados foram

Suprapuros da Merck. A alta pureza da água, de $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ de resistividade foi obtida usando sistema Milli-Q.

Uma solução nova de 1,1% (m/v) de SnCl_2 em HCl 3% foi preparada a cada experimento dissolvendo-se a quantidade apropriada do sal (Merck) em aproximadamente 50 mL de água Milli-Q e transferida para um balão volumétrico já contendo 15 mL de HCl concentrado. O volume foi completado até a capacidade do balão (500 mL) com água Milli-Q e a solução borbulhada com gás nitrogênio (N_2) por aproximadamente 10 minutos. Foi preparada também uma solução de HCl 3% a cada experimento para ser utilizada como solução carreadora.

A solução de 10% (m/v) de dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) utilizada foi preparada previamente pesando-se 50 g de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ em um balão volumétrico de 500 mL e em seguida adicionou-se aproximadamente 250 mL de água Milli-Q. A solução, foi colocada então sob agitação até dissolver completamente o $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ e o volume foi completado até a capacidade do balão.

Uma solução estoque 1 de Hg (1255 mg L^{-1}) foi preparada dissolvendo-se HgO (Johnson Matthey Chemicals Limited) de alta pureza (99,99995 %) em HNO_3 (1000 mg L^{-1}) e foi utilizada para preparar a solução estoque 2 ($1255 \mu\text{g L}^{-1}$).

Uma coluna de troca iônica foi preparada com pequena quantidade de lã de vidro e preenchida com 1 mL de resina de troca iônica - Dowex 1-X8, 200-400 mesh, tomando-se o cuidado que todas as colunas apresentassem a mesma quantidade de resina. Após o assentamento da resina sobre a base de lã de vidro, colocou-se novamente uma pequena quantidade de lã de vidro sobre a resina para evitar que a mesma não ressuspendesse no procedimento de lavagem. A coluna foi lavada então duas vezes seguidas com 10 mL de água Milli-Q e a vazão ajustada em aproximadamente 5 mL/min. Após a medida da vazão, a coluna foi lavada duas vezes com 10 mL de HNO_3 8 M. Antes da percolação da solução contendo a amostra, a coluna foi ativada com 10 mL de HCl 6M.

Na determinação de Hg ou MeHg, meticulosa limpeza dos materiais é essencial. Toda a vidraria utilizada é deixada por 24 horas em Extran 2% (v/v) e enxaguada com água Milli-Q. Em seguida, é deixada por 72 horas em 20% (v/v) HNO_3 e finalmente é enxaguada novamente com água Milli-Q por pelo menos três vezes.

Curvas de Calibração

Neste trabalho as curvas de calibrações foram construídas com a utilização de soluções padrão

preparadas a partir de uma solução estoque de Hg (estoque 2), pipetada em volumes apropriados diretamente nos frascos de Teflon fechado da Savilex, com capacidade de 50 mL. Em seguida, foram adicionados 8 mL de ácido nítrico (HNO_3) conc. com baixo teor de Hg e 4 mL de H_2SO_4 conc., ambos da Merck, e deixados reagir durante toda a noite. Este procedimento também foi realizado para as amostras. As soluções de calibração foram preparadas diariamente e as concentrações utilizadas dependeram das amostras e/ou materiais de referência analisados, sendo utilizadas sempre cinco soluções de concentrações diferentes ($2,51 \text{ ng mL}^{-1}$, $5,02 \text{ ng mL}^{-1}$, $10,04 \text{ ng mL}^{-1}$, $20,08 \text{ ng mL}^{-1}$, $25,10 \text{ ng mL}^{-1}$) para a obtenção da curva de calibração.

Uma vez cumpridas todas as etapas do processo de preparação das condições experimentais e instrumentais, foi realizada a avaliação parcial da metodologia empregada, com o objetivo de garantir a confiabilidade da resposta analítica obtida das amostras sob análise. Esta avaliação da metodologia analítica permitiu obter alguns parâmetros analíticos de mérito, indicados a seguir: faixa linear de trabalho (ng mL^{-1}), inclinação (ng mL^{-1}), regressão linear, limite de detecção (ng mL^{-1}), limite de quantificação (ng mL^{-1}) (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros analíticos de mérito para a metodologia empregada na determinação de mercúrio e metilmercúrio

Faixa Linear de Trabalho (ng mL^{-1})	0,5 - 50
Inclinação	0,0181
Regressão Linear	0,9995
Limite de Detecção (ng g^{-1})	0,1
Limite de Quantificação (ng g^{-1})	10

Procedimento analítico para a determinação de MeHg em amostras biológicas

Separação do MeHg do Hg total, digestão e análise para a determinação do Hg orgânico (MeHg)

O método empregado é baseado na lixiviação ácida e separação de Hg orgânico (MeHg) e inorgânico numa coluna de troca iônica, seguido pela espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio (CVAAS). O HCl 6 M extrai quantitativamente o MeHg dos tecidos biológicos e uma coluna de troca iônica é usada para

separar o CH_3HgCl não iônico (que passa através da resina de troca iônica) do complexo HgCl_4^{-2} , que fica retido na coluna. Uma vez separado, o Hg orgânico tem que ser decomposto para Hg^{2+} , porque o SnCl_2 pode reduzir somente o Hg iônico inorgânico. A decomposição pode ser feita por radiação ultravioleta (UV) ou decomposição ácida. No presente trabalho, optou-se pela digestão ácida visto que a decomposição pela irradiação UV é simples e efetiva, mas pode demorar horas e deve ser conduzida em tubos de quartzo ou frascos de Teflon transparentes (pois ambos refletem a luz UV). A digestão ácida é mais rápida e também efetiva, deve ser feita em tubos de digestão fechados e devido a grande quantidade de ácidos utilizada, o branco do reagente é mais alto, mas não alto o suficiente que prejudique a determinação do Hg.

Para a determinação do Hg orgânico, pesaram-se cerca de 0,2 a 0,5 g de amostra diretamente em um frasco com tampa de rosca e capacidade de 15 mL. Após a pesagem, foram adicionados 10 mL de HCl 6M e deixados reagir durante toda a noite. Os frascos foram envolvidos em papel alumínio para impedir a passagem de luz e evitar a decomposição do MeHg. No dia seguinte, os frascos foram colocados no agitador por duas horas e posteriormente centrifugados por aproximadamente 10 min a uma velocidade de 3000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi percolado através de uma resina de troca iônica condicionada previamente na forma Cl^- (1 mL de resina de troca iônica - Dowex 1-X8, 200-400 mesh). O material eluído da coluna foi recolhido em frascos de Teflon com tampa, com capacidade de 50 mL e adicionados então 4 mL de HNO_3 conc. e 2 mL de H_2SO_4 conc. com a finalidade de decompor o CH_3Hg^+ . As amostras foram digeridas em sistema fechado, em temperatura de 90°C , durante três horas. Após a digestão, os frascos foram colocados em banho de gelo até o completo resfriamento e, em seguida, adicionados 500 μL de solução de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 10% (m/v), para a oxidação e estabilização do Hg. Completou-se o volume até a marca de 50 mL. Finalmente, após a decomposição do MeHg em Hg^{+2} , a quantificação do Hg é feita por CVAAS.

Digestão e análise da amostra para a determinação de Hg total

Pesou-se de 0,2 a 0,5 g de amostra diretamente em um frasco de Teflon fechado da Savilex, com capacidade de 50 mL. Em seguida, foram adicionados 8 mL de ácido nítrico (HNO_3) conc. com baixo teor de Hg e 4 mL de H_2SO_4 conc., ambos da Merck, e deixados reagir com as

amostras durante toda a noite. No dia seguinte, os frascos foram colocados no bloco digestor da Tecnal e as amostras foram digeridas em sistema fechado, em temperatura de 90°C, durante três horas. Esse procedimento foi necessário para permitir uma digestão completa das amostras, devido ao alto teor de gordura presente. Após a digestão, os frascos foram colocados em banho de gelo até o completo resfriamento e, em seguida, adicionados, 500 µL de solução de (K₂Cr₂O₇) 10% (m/v), para a oxidação e estabilização do Hg. Completou-se o volume até a marca de 50 mL.

Teste de eficácia de retenção do MeHg em uma coluna de resina de troca iônica e taxa de recuperação (R_p)

Foram realizados três experimentos para avaliação da eficácia de retenção do MeHg na resina Dowex x-8 e separação do Hg inorgânico. O primeiro experimento consistiu da lixiviação do MeHg da matriz biológica e posterior percolação por uma coluna de troca iônica (Experimento 1). Com posterior determinação do Hg de acordo com o item “Procedimento analítico para a determinação de MeHg em amostras biológicas”. Nesse experimento, no final do procedimento analítico, estaríamos quantificando somente o MeHg presente no MR. O segundo experimento, consistiu entretanto, de

igual lixiviação do MeHg da matriz biológica, porém sem percolação por uma coluna de troca iônica (Experimento 2). No final do processo, estaríamos quantificando o Hg total (inorgânico e MeHg) presente nas amostras. Para tanto, foi escolhido o material de referência DOLT-3 (Dogfish Liver), pois este apresenta valores certificados bem diferentes para Hg Total (3,7 ± 0,14 mg kg⁻¹) e MeHg (1,59 ± 0,12 mg kg⁻¹), ou seja, as faixas de concentração de ambos não se sobrepõem, facilitando a avaliação da eficácia da separação do MeHg do Hg inorgânico.

O terceiro experimento foi feito com duas soluções de Hg Total de concentração conhecida (2,51 ng mL⁻¹ e 5,02 ng mL⁻¹), obtidas a partir da mesma solução utilizada para a preparação da curva de calibração (estoque 2), com o objetivo de avaliar o potencial de retenção do Hg inorgânico pela coluna de troca iônica (Experimento 3). Estas soluções foram submetidas ao mesmo tratamento necessário para determinação de MeHg, com duas alíquotas (de 2,51 ng mL⁻¹ e 5,02 ng mL⁻¹) passando pelo processo de percolação pela coluna (Experimento 3.1) e duas alíquotas de mesma concentração sem percolação (Experimento 3.2).

O fluxograma a seguir, apresenta um esquema resumido dos experimentos realizados nesse estudo (Figura 1).

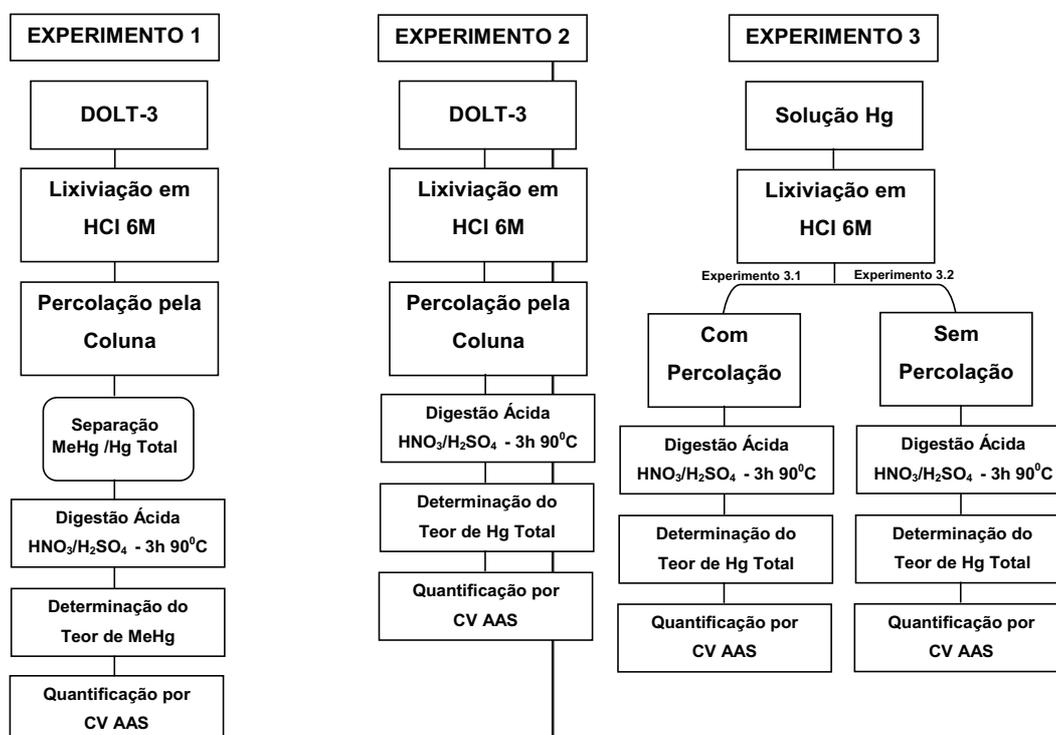


Figura 1. Fluxograma dos experimentos realizados para avaliação da eficácia na determinação de MeHg.

Também foi realizada a avaliação de taxa de recuperação (R_p) do analito (MeHg) extraído das amostras, pela análise de materiais de referência: Dogfish muscle (DORM-1 NRCC) e Human Hair Spiked (IAEA 085).

Equipamentos

A quantificação de Hg foi realizada por meio da técnica de Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Vapor Frio (CV AAS), empregando a Análise por Injeção em Fluxo, e equipamento FIMS da Perkin Elmer, usando argônio como gás de arraste. O agitador empregado foi o modelo Khan da Nova Ética, bloco digestor da Tecnal e centrífuga Safeguard Centrifuge da Clay-Adams INC.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Exatidão e precisão

A exatidão e precisão da metodologia para a determinação de Hg total e MeHg em amostras de cabelo e peixe, foram avaliadas por meio da análise de materiais de referência com valores certificados, a saber: IAEA-085 e 086 (Human Hair), NIST SRM 2976 (Mussel Tissue), DORM-1 (Dogfish Muscle) e DOLT-3 (Dogfish Liver).

Na Tabela 2, encontram-se os valores médios obtidos na análise desses materiais de referência, bem como os valores certificados. Os resultados obtidos para a determinação do MeHg nos materiais de referência apresentaram desvio padrão relativo variando de 2,2 a 10 % e erro relativo, de 0,4 a 12 % e, desvio padrão relativo de 2,6 a 11,7 % e erro relativo, de 0,9 a 3,1%, para Hg Total, verificando-se a precisão e exatidão do método, respectivamente.

Teste de eficácia de retenção do MeHg em uma coluna de resina de troca iônica e taxa de recuperação (R_p):

Na Tabela 3 estão os resultados obtidos para MeHg (mg kg^{-1}) no material de referência DOLT-3 (Dogfish Liver), com (Experimento 1) e sem percolação (Experimento 2) pela coluna de troca iônica e avaliação do potencial de retenção da coluna de troca iônica para o Hg inorgânico (Experimento 3).

Pelos resultados, pôde-se observar que com o procedimento de percolação da solução, houve uma perfeita separação do MeHg do Hg inorgânico e os resultados obtidos ($1,40 \pm 0,10 \text{ mg kg}^{-1}$) foram bem próximos do valor certificado esperados para o MeHg ($1,59 \pm 0,12 \text{ mg kg}^{-1}$), comprovando a eficácia de separação

Tabela 2. Resultados obtidos para Hg Total e MeHg (mg kg^{-1}) nos materiais de referência IAEA-085 e 086 (Human Hair), NIST SRM 2976 (Mussel Tissue), DORM-1 (Dogfish Muscle) e DOLT-3 (Dogfish Liver)

Materiais de Referência	Total Hg (mg kg^{-1})			MeHg (mg kg^{-1})				
	Hg Total (média \pm d.p.)	Valor Certificado	DPR (%)	ER (%)	MeHg (média \pm d.p.)	Valor Certificado	DPR (%)	ER (%)
IAEA-085	22,97 \pm 0,60	23,2 (22,4 - 24,0)	2,6	1,0	22,8 \pm 0,5	22,9 (21,9 - 23,9)	2,2	0,4
IAEA-086	0,579 \pm 0,021	0,573 (0,534 - 0,612)	3,6	1,0	0,254 \pm 0,016	0,258 (0,236-0,279)	6,3	1,5
NIST SRM 2976 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	59 \pm 6	61,0 \pm 3,6	10,2	3,0	0,031 \pm 0,003	0,028 \pm 0,011	10	11
DORM-1	0,773 \pm 0,033	0,798 \pm 0,074	4,2	3,1	0,718 \pm 0,042	0,731 \pm 0,060	5,8	1,8
DOLT-3 (n = 4)	3,4 \pm 0,4	3,37 \pm 0,14	11,7	0,9	1,40 \pm 0,1	1,59 \pm 0,12	8	12

(n) – número de determinações - n = 15)

das espécies de mercúrio (Experimento 1). Os resultados obtidos para o material de referência que não sofreu a percolação após a lixiviação, com valor médio de $(3,19 \pm 0,68 \text{ mg kg}^{-1})$ foi próximo ao esperado para Hg Total $(3,37 \pm 0,14 \text{ mg kg}^{-1})$, ou seja, tanto o complexo HgCl_4^{-2} , quanto o CH_3HgCl formados na etapa de lixiviação foram quantificados. Esse resultado permitiu concluir também que não ocorreu metilação do Hg inorgânico em meio ácido, na etapa de lixiviação (Experimento 2).

Os valores esperados para a taxa de recuperação do Hg inorgânico a partir de soluções de concentrações conhecidas foram mais baixos com relação a quantidade de Hg pipetada para o Experimento 3.2, ou seja, sem percolação pela coluna de troca iônica. Possivelmente reações ocorridas, dificultaram a liberação do Hg^{2+} em solução e conseqüentemente, não foi possível reduzi-lo a Hg elementar, forma exigida para determinação por CV AAS. Contudo, observou-se também que não foi detectado a presença de Hg inorgânico nas soluções de concentrações conhecidas analisadas para o Experimento 3.1, com percolação pela coluna de troca iônica. Todos os resultados deram negativos, ou seja, todo o Hg inorgânico ficou retido na coluna.

Estudos encontrados na literatura científica também relatam que não ocorrem problemas de

interferentes na extração de MeHg, indicando, como já testado anteriormente, que o Hg^{2+} não é transferido para a fase orgânica²⁷.

Taxa de recuperação (R_i)

O resultado do estudo de recuperação de analito (MeHg) obtido pela análise dos materiais de referência indicou uma recuperação percentual conforme segue:

- Dogfish muscle (DORM-1 NRCC) – 99,25% com desvio padrão relativo (RSD) de 7,0%.
- Human Hair Spiked (IAEA 085) – 102,54% com desvio padrão relativo (RSD) de 3,3 %.

Portanto, a taxa de recuperação foi de:

$$R_{i\text{DORM}} = \frac{99,25}{100} = 0,9925 \quad \text{Equação 1}$$

$$R_{i085} = \frac{102,54}{100} = 1,0254 \quad \text{Equação 2}$$

Nos dois casos, a taxa de recuperação foi muito próxima de 1, não havendo a necessidade de correção no valor final.

Tabela 3. Resultados obtidos para MeHg (mg kg^{-1}) no material de referência DOLT-3 (Dogfish Liver), com (experimento 1) e sem (experimento 2) percolação pela coluna de troca iônica e avaliação do potencial de retenção da coluna de troca iônica para o Hg inorgânico

Material de Referência (Experimento 1)	MeHg (mg kg^{-1}) (média \pm d.p.)	Valor Certificado (mg kg^{-1})	DPR (%)	ER (%)
DOLT-3 (Dogfish Liver)	1,40 \pm 0,10	1,59 \pm 0,12	7,1	11,9
Padrão Pipetado (Experimento 3.1)	Hg Total (ng mL^{-1}) (média \pm d.p.)	Valor esperado (ng mL^{-1})	DPR (%)	ER (%)
Padrão – Ponto 2	-	2,51 ng mL^{-1}	-	-
Padrão – Ponto 3	-	5,02 ng mL^{-1}	-	-

Material de Referência (Experimento 2)	Hg total (mg kg^{-1}) (média \pm d.p.)	Valor Certificado (mg kg^{-1})	DPR (%)	ER (%)
DOLT-3 (Dogfish Liver)	3,19 \pm 0,68	3,37 \pm 0,14	21,3	5,3
Padrão Pipetado (Experimento 3.2)	Hg Total (ng mL^{-1}) (média \pm d.p.)	Valor Esperado (ng mL^{-1})	DPR (%)	ER (%)
Padrão – Ponto 2	0,36 \pm 0,02	2,51 ng mL^{-1}	-	-
Padrão – Ponto 3	1,39 \pm 0,03	5,02 ng mL^{-1}	-	-

Exercício de intercomparação

Com o objetivo de avaliar a metodologia analítica utilizada na determinação de MeHg, bem como a qualidade final dos resultados, participou-se do programa de intercomparação da Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA) o “World-Wide Intercomparison Exercise for the Determination of Trace Elements and Methylmercury in Tuna Fish Flesh Homogenate” (IAEA-436), realizado para avaliação de um material candidato a material de referência (“Tuna Fish Flesh Homogenate” (IAEA-436)), realizado no período de outubro de 2004 a julho de 2005. A performance dos laboratórios participantes foi avaliada através de gráficos Z-score e os resultados foram publicados no Report nº IAEA/AL/157-MEL/77 “Marine Environment Laboratory, 4 quai Antoin 1^{er}”, MC 98000 Monaco.

Os valores obtidos no exercício de intercomparação para determinação de Hg total e MeHg no material candidato a material de referência são apresentados na Tabela 4.

A participação em um exercício de intercomparação patrocinado pela IAEA apresentou resultados bastante satisfatórios. Foram observados valores de desvio padrão relativo 1,1 e 1,4% e erros relativos de 10,5 e 0,5%, respectivamente para as determinações de Hg total e MeHg, comprovando a precisão e a exatidão das metodologias analíticas utilizadas.

Os gráficos de Z-score com os resultados obtidos no programa de intercomparação para as análises de Hg total e MeHg encontram-se nas Figuras 2 e Figura 3, representados pelo código 30.

Tabela 4. Hg total e MeHg no material Tuna Fish Flesh Homogenate (IAEA-436)(mg kg⁻¹)

Material de Referência (média ± s.d.)	Valor Encontrado (mg kg ⁻¹)	Valor Certificado (mg kg ⁻¹)	DPR (%)	ER (%)
Hg _{total}	3,75 ± 0,04	4,19 ± 0,36	1,1	10,5
MeHg	3,66 ± 0,05	3,68 ± 0,42	1,4	0,5

(n = 6, n= número de determinações)

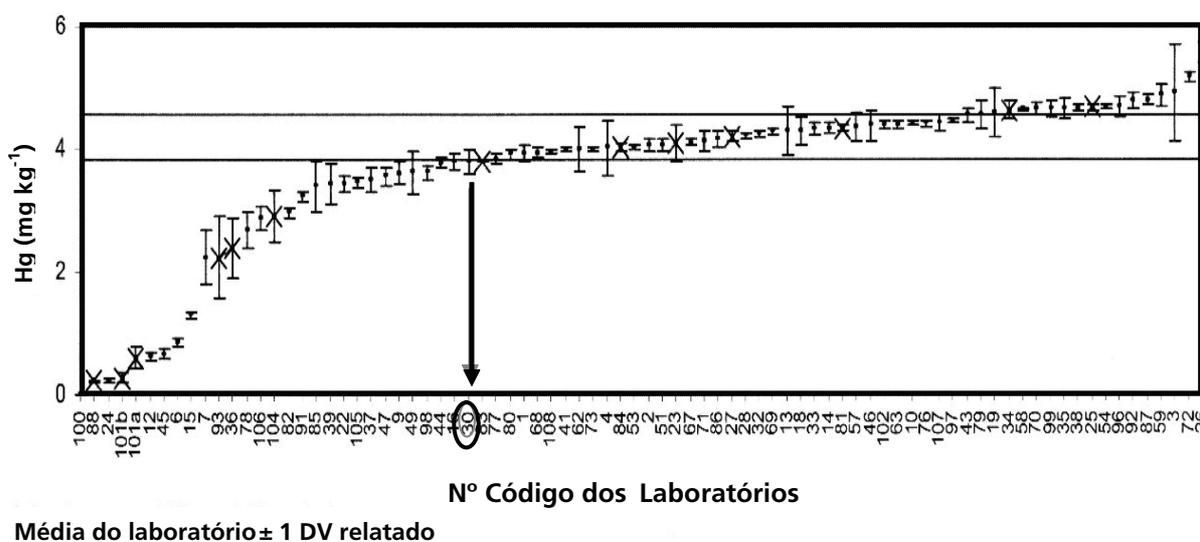
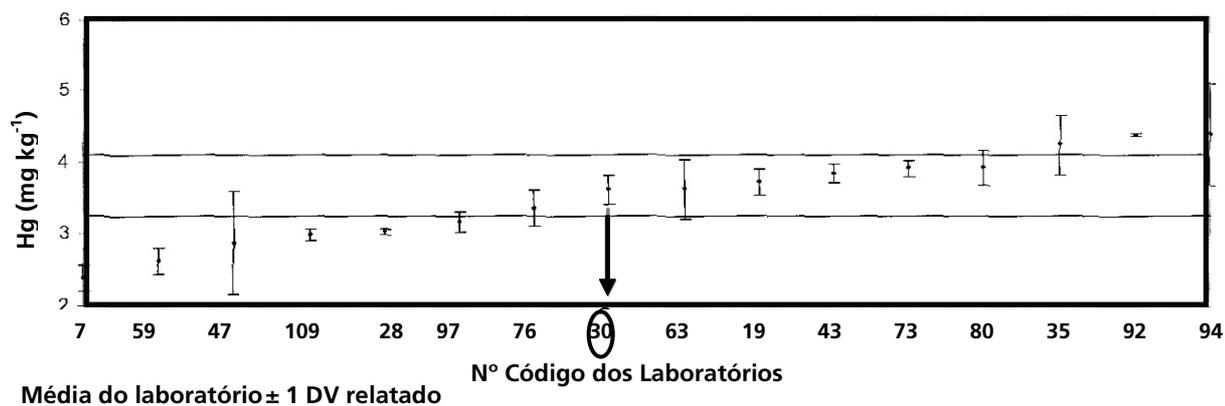


Figura 2. Gráfico de apresentação dos resultados obtidos para Hg total na intercomparação pelos laboratórios participantes (gráfico adaptado do Report nº IAEA/AL/157-MEL).



Média do laboratório \pm 1 DV relatado

Linha horizontal: valor médio \pm 1 DV

Figura 3. Gráfico de apresentação dos resultados obtidos para MeHg total na intercomparação pelos laboratórios participantes (gráfico adaptado do Report nº IAEA/AL/157-MEL).

CONCLUSÕES

A participação em um exercício de intercomparação patrocinado pela IAEA, com o objetivo de avaliar a qualidade dos resultados analíticos utilizados na determinação de Hg Total e MeHg em um material candidato a material de referência (“Tuna Fish Flesh Homogenate” (IAEA-436) apresentou resultados bastante satisfatórios. Foram observados valores de desvio padrão relativo 1,1 e 1,4% e erros relativos de 10,5 e 0,5%, respectivamente para as determinações de Hg Total e MeHg, comprovando a precisão e a exatidão das metodologias analíticas utilizadas.

Verificou-se também que a utilização da espectrometria de absorção atômica por geração de vapor frio (CVAAS), com anterior lixiviação ácida e posterior separação do MeHg e Hg Total, utilizando-se uma coluna de troca iônica, mostrou-se efetiva para a determinação dessa espécie de Hg. Esse método se constitui num método simples para a determinação de MeHg em laboratórios que não dispõem de equipamentos sofisticados para a especiação do Hg. O uso da técnica de CVAAS juntamente com a separação por meio de uma coluna de troca iônica, permitiu a determinação da concentração de ambos, o Hg Total e o MeHg em amostras biológicas, tais como músculo e tecidos de peixes e cabelos que possuem, em geral, uma grande proporção de MeHg em relação ao conteúdo de Hg total.

REFERÊNCIAS

1. Mergler, D, Passos, C. Human mercury exposure and adverse health effects in the Amazon: a review. *Cad. Saúde Pública* 2008; 24 (4): 5503-20.
2. Hacon, S e col. An overview of mercury contamination research in the Amazon basin with an emphasis on Brazil. *Cad. Saúde Pública* 2008; 24 (7): 1479-92.
3. Farias, LA, Santos, NR, Favaro, DIT, Braga, ES. Mercúrio total em cabelo de crianças de uma população costeira, Cananeia, São Paulo, Brasil. *Cad. Saúde Pública* 2008, 24 (10):1-8.
4. Canela MC. Determinação de Mercúrio. Campinas: UNICAMP, 1995.
5. Goyer RA. Toxic effects of metals. In: Klaassen CD, Amdur MO, Doull J, eds. Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons. New York, NY: Macmillan Publishing In: Klaassen CD, Amdur MD, Doull J, eds. Casarett and Doull's toxicology - the basic science of poisons. 3rd ed. New York, NY: Macmillan Publishing, 1986.
6. Passos CJS., Mergler D, Lemire M, Fillion M, Guimarães JRD. Fish consumption and bioindicators of inorganic mercury exposure. *The Science Total Environment* 2003; 373:68-76.
7. Virtanen JK, Rissanen TH, Voutilainen S, Tuomainen TP. Mercury as a risk factor for cardiovascular diseases. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2007; 18:75-85.
8. Farias LA, Favaro DIT, Maihara VA, Vasconcellos MBA, Yuyama LK, Aguiar JPL, Alencar FJ. Assessment of daily dietary intake of Hg and some essential elements in diets of children from the Amazon region. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 2006; 260 (2):383-7.
9. Quevauviller, P, Filippelli, M, Horvart, M. Method performance evaluation for methylmercury determination in fish and sediment. *Trends in analytical chemistry* 2000, 19:157-79.
10. Lai, R, HuanG, EL, Zhou, F, Wipf, DO. Selective Determination of Methylmercury by Flow-Injection Fast-Scan Voltammetry Selective

- Determination of Methylmercury by Flow- Injection Fast-Scan Voltammetry. *Electroanalysis* 1998, 10 (13):926-32.
11. Cappon, C J, Smith, J.C. Breakdown of methylmercury in sodium hydroxide solution. *Anal. Chem.*, 1980, 52:1527-9.
 12. Ealy, J.A, Shults, W.D, Dean, J.A. Extraction and Gas Chromatographic Determination of Methyl-, Ethyl-, and Methoxyethylmercury (II) Halides. *Anal. Chem. Acta.* 1973, 64: 235- 41.
 13. Sanema A.I., Haraguchi, K, Nagai, H. Preconcentration of inorganic mercury with an-exchange resin and direct reduction-aeration measurements by cold-vapour atomic absorption spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 1981, 130 (1):149-56.
 14. Neagu, V., Cornelia, L., Simina, S., Untea, I. Unconventional ion exchange resins and their retention properties for Hg²⁺ ions. *Reactive & Functional Polymers*, 2007, 67:1433-9.
 15. Horvat, M, Byrne, A.R. Preliminary study of the effects of some physical parameters on the stability methylmercury in biological samples. *Analyst* 1992, 117:665-8.
 16. Westöö, G. Determination of methylmercury compounds in foodstuffs. I. methylmercury compounds in fish, identification and determination. *Acta Chem. Scand.*, 1966, 20 (8): 2131- 7.
 17. Dan-YY., Hoang-YTT, Yu-Wei C, Nelson B. Improvements of reliability for methylmercury determination in environmental samples. *Analytica Chimica Acta*, 2009, 633:157-64.
 18. Evans, O. & Mckee, G.D. Determination of mercury (II) and organomercury compounds by reversed-phase liquid chromatography with reductive electrochemical detection. *Analyst.*, 1988, 113: 243-6.
 19. Gibicar, D, Logar, M, Horvat, N, Marn-Pernat, A, Ponikvar, R. Horvat, M. Simultaneous determination of trace levels of ethylmercury and methylmercury in biological samples and vaccines using sodium tetra (n-propyl) borate as derivatizing agent. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, 388 (2):329-40.
 20. Saouter, E. & Blattmann, B. Analyses of organic and inorganic mercury by atomic fluorescence spectrometry using a semiautomatic analytical system. *Anal. Chem.*, 1994, 66:2031-7.
 21. Hatch, W.R, Ott, W.L. Determination of sub-microgram quantities of mercury by atomic absorption spectrophotometry. *Anal. Chem.*, 1968, 40: 2085-7.
 22. Poluektov, N. S.; Zelyukova, Y. V. Atomic absorption determination of mercury microcontaminations in alkali metal hydroxides (exchange of experience). *Industrial Laboratory*, 1969, 35 (2): 222-30.
 23. Ribeiro, F, Neto, M.M.M, Rocha, M.M, Fonseca, I.T.E. Voltammetric studies on the electrochemical determination of methylmercury in chloride medium at carbon microelectrodes. *Analytica Chimica Acta*, 2006, 579:227-34.
 24. Mieczyslaw K, Iwona R. New methodology for anodic stripping voltammetric determination of methylmercury. *Electrochemistry Communications*, 2008, 10:1024-6.
 25. Horvat, M. Mercury analysis and speciation. In *Environmental Sample in Global and Regional Mercury Cycles: Sources, Fluxes and Mass Balances*, p. 1-31, W. Baeyens et al (eds), 1996.
 26. Deng, D-F; Teh, F-C; Teh, S.J. Effect of dietary methylmercury and seleno-methionine on Sacramento splittail larvae. *Science of The Total Environment*, 2008, 407:197-208.
 27. Bisinoti, M. C.; Jardim, W.F.; Brito Junior, J. L.; Malm, O.; Guimarães, J. R. Um novo método para quantificar mercúrio orgânico (Hg orgânico) empregando a espectrometria de fluorescência atômica

Avaliação de requisitos referentes à implantação do sistema de gestão da qualidade nos Laboratórios Centrais de Saúde Pública

Evaluation of requirements for implementing quality management system at the Central Public Health Laboratories

RIALA6/1244

Ana Camila Teixeira de CAMPOS^{1*}, Silvânia Vaz de Melo MATOS²

*Endereço para correspondência: Gerência Geral de Laboratórios de Saúde Pública – ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária – SIA trecho 05, Área Especial 57, Bloco D, 1º andar – Brasília, DF - CEP 71205050, tel (61) 3462-5474 e-mail: camila.campos@anvisa.gov.br

¹Gerência Geral de Laboratórios de Saúde Pública, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)

²Secretaria Executiva da Farmacopeia Brasileira, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)

Recebido: 18.09.2009 – Aceito para publicação: 30.11.2009

RESUMO

Os laboratórios centrais de saúde pública - LACEN formam a Rede Nacional de Laboratórios de Vigilância Sanitária, os quais subsidiam as ações de investigação, monitoramento e controle de agravos à saúde da população, por meio da realização de análises físicas. Para isso é de extrema importância a implantação do sistema de gestão da qualidade nesses laboratórios, ação que tem sido implementada em conjunto com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Foi realizada pela equipe da Anvisa a avaliação de vinte e sete LACEN, das cinco regiões do país, em relação ao sistema de gestão da qualidade, por meio de *check list* referente à estrutura laboratorial, recursos humanos capacitados e estágio de implantação do sistema de gestão da qualidade. O objetivo da investigação foi a obtenção de um panorama geral dos LACEN. Verificou-se que apesar de os laboratórios estarem em diferentes graus de desenvolvimento em relação ao sistema de gestão da qualidade, de maneira geral essas unidades possuem recursos humanos tecnicamente capacitados, assim como equipamentos qualificados. No entanto, há necessidade de realizar a incorporação mais efetiva da política da qualidade e superar alguns entraves administrativos para a melhoria do sistema.

Palavras-chave. Serviços laboratoriais de saúde pública. Gestão da Qualidade. Sistema de Vigilância Sanitária. Laboratório Oficial.

ABSTRACT

The central laboratories of public health - LACEN make up a laboratory network for health monitoring, supporting the investigation actions, monitoring and controlling the diseases of the population by performing the physical analyses. Therefore, it is extremely important the implementation of the quality management system in these laboratories, and this action has been implemented in a joint work with Anvisa. The evaluation of twenty seven LACEN, at five regions of the country, was conducted by the teamwork of Anvisa, by a checklist application stated by the following items: laboratory infrastructure, human resources training and qualification, and quality management system status. The objective was to get an overview of LACEN. It was found that although the laboratories are in different stages of quality management system implementation, they have trained and skilled staff, and qualified equipments. Nevertheless, they need to incorporate a quality policy more effective and overcome some administrative barriers for improving the system.

Key-words. Public health laboratory services. Quality Management. Health surveillance system . Official Lab.

INTRODUÇÃO

Uma rede de laboratórios de saúde pública adequada e efetiva é de importância fundamental para a vigilância sanitária, por subsidiar ações de investigação, monitoramento e controle de agravos à saúde da população¹.

Os Laboratórios Centrais de Saúde Pública - LACEN, integrantes da estrutura organizacional do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária – SNVS, são laboratórios de referência estaduais, vinculados às Secretarias de Estado da Saúde do Sistema Único de Saúde – SUS¹.

Os LACEN produzem conhecimentos relevantes para a saúde coletiva, desenvolvem pesquisas aplicadas, promovem e divulgam trabalhos científicos, colaboram na elaboração de normas técnicas, padronizam métodos diagnósticos e analíticos e organizam cursos de formação técnica, de aperfeiçoamento e estágios de aprimoramento, em nível nacional e internacional.

Além disso, possuem como missão estratégica a emissão de diagnóstico laboratorial preciso e oportuno referente às análises fiscais de água, alimentos, medicamentos, cosméticos, saneantes e água para diálise, dentre outros produtos de relevância para a saúde pública.

O processo de implantação de um sistema de gestão da qualidade nos LACEN faz parte da tendência mundial de obtenção de laboratórios oficiais confiáveis e de alto padrão de competência e qualidade.

A fiscalização sanitária apóia-se no laboratório oficial, instrumento fundamental para a avaliação da conformidade dos produtos em relação às normas vigentes, por meio de análises fiscais e exige que o laboratório seja ágil e esteja estruturado para atender ao desenvolvimento científico e tecnológico em seu campo de ação.

Dentro desta perspectiva, o Ministério da Saúde e a Anvisa instituíram o incentivo destinado aos LACEN - FINLACEN, por meio da Portaria 3271/07², que trata do repasse de recursos destinados aos Laboratórios de Saúde Pública da Rede Nacional de Laboratórios de Vigilância Sanitária, dentro do Bloco de Financiamento de Vigilância em Saúde, para a implementação de melhorias na estrutura e a execução de ações de vigilância sanitária². Os critérios utilizados para esse repasse são baseados na classificação por

porte, de acordo com a população e extensão territorial de cada estado e do Distrito Federal e pelo estágio atual da prática do sistema da qualidade e capacidade técnica e operacional instalada³.

Assim, os 27 estados e o distrito federal se agrupam dentre os cinco portes (I, II, III, IV e V) e os quatro níveis de complexidade preconizados (A, B, C e D), os quais são estabelecidos conforme o cumprimento aos requisitos de biosegurança, à capacitação do pessoal técnico e ao estágio atual do sistema da qualidade praticado em cada LACEN, denominados como Estágio 1, 2, 3 e 4.

A implementação do sistema de gestão da qualidade nos LACEN é de extrema importância, uma vez que possibilita a rastreabilidade dos processos administrativos e analíticos, subsidiando a obtenção de resultados com maior confiabilidade.

Este estudo tem por objetivo analisar alguns requisitos do processo de implementação do sistema de gestão da qualidade nos LACEN e traçar um panorama geral da situação encontrada em relação aos itens selecionados, considerados mais impactantes para o seu desenvolvimento. A análise situacional permitirá o conhecimento dos pontos fortes e das carências da rede de laboratórios oficiais do país. A partir daí poderão ser definidos objetivos e metas para a criação de uma rede coordenada e integrada.

A avaliação da capacidade técnico-operacional dos laboratórios oficiais, além de ser relevante para a obtenção de uma visão macroscópica mais atualizada da situação dos LACEN no país⁴, colabora para o planejamento e fornece subsídios para o seu aprimoramento e consequente melhoria das ações da vigilância sanitária.

A Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999⁵, define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária e dá outras providências.

De acordo com o Art. 7º da referida Lei, compete à Agência:

“Coordenar as ações de vigilância sanitária realizadas por todos os laboratórios que compõem a rede oficial de laboratórios de controle de qualidade em saúde; monitorar e auditar os laboratórios oficiais de controle de qualidade; coordenar e executar o controle da qualidade de bens e produtos ou de programas especiais de monitoramento da qualidade em saúde; fomentar o desenvolvimento de recursos humanos para o sistema e a cooperação técnico-científica nacional e internacional, dentre outras.”

No Regimento da ANVISA, o Art. 50⁶ estabelece as atribuições da Gerência-Geral de Laboratórios de Saúde Pública – GGLAS, dentre outras:

“I - propor a política nacional de gestão de qualidade para os laboratórios que prestem serviços de análise em produtos sujeitos à ação de Visa;

III - planejar, propor, organizar, promover, participar e realizar encontros e cursos de interesse científico e tecnológico da área, com enfoque na implementação de controle de qualidade analítica de serviços de laboratório;

VI - planejar, propor, organizar, promover, participar e realizar programas de adequação de laboratórios considerados estratégicos para execução das atividades de Visa;

VII - coordenar, supervisionar e acompanhar, em nível nacional, as atividades laboratoriais de controle de qualidade dos produtos sujeitos ao regime de Visa.”

O laboratório de saúde pública tem como função básica promover atividades voltadas para o controle sanitário e epidemiológico de uma população. No cumprimento de suas funções, ele atende à demanda analítica de produtos afetos à vigilância sanitária como alimentos, medicamentos, água para diálise, cosméticos, serviços de saúde, saneantes⁷ e produtos para a saúde, como, por exemplo, os diversos materiais de apoio ou artigos descartáveis utilizados em saúde. Além disso, executa os ensaios para elucidação de surtos de infecções e para detectar falsificação de produtos.

O direcionamento e a consolidação dessa complexa estrutura laboratorial constituem um dos elementos críticos do SUS⁸.

Em relação aos recursos humanos, o quadro verificado em grande parte dos laboratórios centrais de saúde pública expõe as fragilidades devido à perda de pessoal preparado e experiente para a iniciativa privada, em decorrência de baixos salários e ausência de incentivos⁹ para o crescimento e a valorização profissional.

Os principais aspectos de planejamento de um laboratório englobam segurança do pessoal, proteção da amostra, precisão dos resultados, eficiência no fluxo do trabalho, assim como a proteção do ambiente e dos riscos decorrentes das atividades realizadas em seu interior⁷.

Outro aspecto importante e previsto na legislação que deve ser observado nos laboratórios que realizam análises de produtos é o gerenciamento dos resíduos de serviços de saúde - RSS, tendo em mente não só a saúde do trabalhador (RDC ANVISA 306/04), mas também a proteção do ambiente (Resolução CONAMA 358/05),

que dispõem sobre o gerenciamento interno e externo, respectivamente, dos RSS.

É importante utilizar procedimentos padronizados, condizentes com as boas práticas de laboratório, para garantir a confiabilidade dos resultados e a integridade das pessoas, instalações e equipamentos¹⁰. Nesse sentido, a implantação de sistema de gestão da qualidade nos laboratórios de saúde pública colabora na melhoria contínua dos processos realizados, englobando tanto aspectos gerenciais como técnicos dos ensaios.

De acordo com a NBR ISO/IEC 9000:2000¹¹, entende-se por qualidade o grau em que um conjunto de características inerentes satisfaz aos requisitos estabelecidos.

Dentre os documentos normativos para Sistemas de Gestão da Qualidade - SGQ - utilizados por laboratórios de calibração e de ensaios, pode-se citar a norma ISO/IEC 17025:2005 e os princípios de Boas Práticas de Laboratório (BPL) da OECD¹².

As Boas Práticas de Laboratório (BPL) constituem um Sistema da qualidade referente à organização e às condições sob as quais os estudos em laboratório e no campo são planejados, realizados, monitorados, registrados, relatados e arquivados¹³. Aplica-se principalmente a laboratórios que realizam análises para fins de registro de medicamentos, saneantes, agrotóxicos, entre outros.

Já a ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005¹⁴ trata dos requisitos gerais para a competência dos laboratórios de ensaio e calibração e aplica-se a todos os tipos de laboratórios.

O Sistema de Gestão da Qualidade referenciado na ABNT ISO/IEC 170125:2005 contempla os seguintes itens: controle de documentos e registros, análises críticas, compras e contratação de serviços, atendimento ao cliente, controle de trabalho não - conforme, auditoria interna, pessoal, acomodações e condições ambientais, métodos de análise e validação de métodos, equipamentos, rastreabilidade de medição, manuseio de amostras, gestão da qualidade de resultados e apresentação dos resultados.

Na implantação de sistemas de gerenciamento da qualidade, normalmente os principais entraves encontrados estão relacionados à compreensão de sua finalidade e às melhorias geradas pelo sistema⁸. Principalmente quando os processos implicam em mudanças significativas de comportamento ou conduta, as dificuldades iniciais são consideráveis.

A implantação do sistema de gestão da qualidade exige planejamento, gerenciamento adequado de todos os processos e muito esforço e dedicação por parte de toda a equipe do laboratório. Porém, inúmeras são as vantagens adquiridas¹⁵.

Um sistema de gestão da qualidade apropriado propiciará meios para a confirmação de que o trabalho foi realizado por pessoal competente, utilizando-se de instalações e equipamentos adequados para a realização das análises, conforme os procedimentos estabelecidos e de maneira controlada para garantir que os resultados sejam confiáveis, rastreáveis e de acordo com os fins propostos¹⁶.

Nesse sentido, considerando a relevância para o SNVS que é se constituir por uma rede laboratorial moderna e operando de acordo com os padrões atuais, a missão regimental da Anvisa de monitorar e coordenar as ações de controle da qualidade de produtos e serviços e a necessidade de conhecer e acompanhar a implantação do FINLACEN em cada estado, foi feito este estudo, visando a fornecer subsídios para o planejamento desse setor.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizadas visitas aos vinte e sete LACEN, sendo sete na região Norte, nove da região Nordeste, quatro da região Centro-Oeste, quatro da região Sudeste e três da região Sul, entre os meses de março e junho de 2008, por equipe técnica da ANVISA (Brasília), composta por doze servidores, atuando em duplas, na avaliação de cada laboratório, priorizando os setores de análises de produtos e serviços sujeitos à vigilância sanitária.

Os laboratórios foram avaliados em relação à estrutura, compreendendo a área física em relação à instalação dos equipamentos, à capacitação dos recursos humanos e ao estágio de implantação do sistema de gestão da qualidade.

A avaliação foi realizada com base em um roteiro (*check list*) previamente elaborado, contemplando requisitos gerenciais e técnicos da norma ISO/IEC 17025:2005¹⁴, como também alguns itens de biosegurança e da Portaria 3271/2007 do FINLACEN².

As avaliações foram feitas em dois ou três dias de visita, onde também foram levantadas quais são as análises realizadas pelos LACEN. De acordo com as análises realizadas, posteriormente poder-se-ia propor testes de análises específicas de acordo com as demandas

A partir da avaliação *in loco*, as equipes técnicas elaboraram um relatório para cada LACEN, fundamentado nas informações coletadas e registradas no formulário e também nas anotações pessoais, que constituíram a base de dados e informações deste artigo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estrutura Laboratorial

Com relação à estrutura física dos LACEN, a maioria apresenta área física adequada às atividades propostas. Aqueles que necessitavam de alguma adequação, em geral já haviam encaminhado projeto com previsão de reforma referente à melhoria da estrutura que se encontrava em desacordo.

Observou-se, em alguns LACEN, a proximidade geográfica com os órgãos de Vigilâncias Sanitárias locais, o que favorece o fluxo de amostras e a comunicação, colaborando para agilizar os planos de ação e processos de trabalho.

A maioria dos LACEN apresentava bons equipamentos, estando a maioria em uso e em bom estado de conservação e em funcionamento. No entanto, principalmente na região Norte, foram observados alguns laboratórios com carência de equipamentos relevantes às análises laboratoriais de produtos.

Em relação aos equipamentos existentes, tendo como base uma extensa lista de itens, neste estudo foram pontuados apenas aqueles considerados mais relevantes para a área de atuação dos LACEN, segundo dois aspectos: avaliação da potencialidade de suas ações, por refletirem a amplitude de possibilidades de atuação e um investimento mais substancial, como cromatógrafo gasoso (CG), cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) e espectrofotômetro de absorção atômica de chama (EEA - chama); e pelo caráter básico e estruturante, que representa uma água própria e adequada às atividades laboratoriais (purificador de água).

O cromatógrafo gasoso possibilita analisar uma série de grupos diferentes de substâncias presentes como ingredientes, contaminantes ou adulterantes nos produtos sob controle e doze LACEN informaram possuir este tipo de equipamento, sendo que cinco deles têm mais de um aparelho.

Já os cromatógrafos líquidos (CLAE) oferecem maior diversidade de análises, possibilitando ao laboratório amplas condições para determinar, com relativa facilidade, a concentração de grupamentos semelhantes e impurezas

presentes nas amostras pesquisadas. Por suas características e versatilidade tem sido uma tendência a sua utilização cada vez mais frequente nas diversas áreas de interesse da vigilância sanitária.

Pelo menos sete LACEN possuem mais de um cromatógrafo líquido, sendo que dois deles já contam com dez aparelhos em suas análises de rotina. Destes, cada um informou possuir dez tipos de detectores diferentes. Isto pode representar a diversificação e modernização das técnicas utilizadas nestes laboratórios. Mas, considerando a população e desenvolvimento de cada estado, seria interessante contar com outros centros com tamanha diversificação, para ampliar suas potencialidades e não polarizar as demandas emergentes em apenas dois laboratórios. Os detectores de ultravioleta-visível, que são os mais comuns nestas análises, estão presentes em todos os LACEN.

Quanto aos espectrofotômetros de absorção atômica, aparelhos específicos para a análise de metais, os modelos acoplados com detector por chama estão presentes em onze LACEN. Nove deles possuem também a modalidade de leitura por gerador de hidretos, para tipos específicos de elementos como o arsênio, antimônio e selênio, e sete possuem o forno de grafite. Este último, geralmente possibilita a leitura de elementos com limites de detecção bem mais baixos que com chama, sendo excelente aliado na pesquisa de contaminações por traços metálicos, seja em água, alimentos e outras aplicações de interesse.

Mesmo os LACEN classificados como de nível A pelo FINLACEN, que é o primeiro estágio na implantação do sistema de gestão da qualidade, como os de AM, ES, SE e TO, estão relativamente bem equipados, pois também utilizam modernos métodos, como os cromatográficos ou os espectrofotométricos de absorção atômica.

Observa-se, portanto, que a classificação utilizada pela Portaria nº 3271, de 27 de dezembro de 2007, não reflete o grau de instrumentação e estrutura do laboratório. Assim, um LACEN é considerado de Nível A, principalmente por apresentar apenas os requisitos do Estágio 1 da implantação do sistema de gestão da qualidade. Significa que ainda contemplam os requisitos básicos que a norma estabelece e que, todavia necessitam implantar vários procedimentos para que o sistema de gestão da qualidade esteja efetivamente implantado. São laboratórios que já fizeram investimentos importantes na diversificação de ensaios e de tecnologia, para o atendimento às necessidades da vigilância de produtos, que

é a sua atividade finalística, mas a forma como estabelecem os procedimentos internos, objetivando maior segurança dos resultados, não acompanhou o mesmo ritmo.

Considerando o equipamento para purificar a água utilizada no laboratório e garantir o fornecimento de água ultra-pura, observou-se que ainda faltam investimentos para esta finalidade. Oito LACEN ainda não possuem um aparelho específico, o que pode significar que faltam recursos ou conscientização para este ponto crítico das análises, sob o risco de comprometer o resultado dos ensaios. Em geral, este equipamento exige um investimento relativamente alto, que implica em custos periódicos com manutenção, e muitas vezes os dirigentes não são sensíveis a este tipo de demanda.

Observou-se também que os LACEN da região Sudeste possuem um número mais expressivo de equipamentos, comparando com as regiões Centro-Oeste, Nordeste, Norte e Sul onde o número é mais restrito. Talvez, por se tratar de centros mais populosos e receberem mais demandas, normalmente vivenciam maior pressão para atender às necessidades locais, aliado ao acesso mais facilitado às informações e aos recursos.

É importante salientar que nem sempre a inexistência de equipamento específico significa precariedade do laboratório, uma vez que há algumas regiões que não possuem demanda para a realização de certas análises, justificando assim a ausência do aparelho.

Em relação aos serviços de aquisição e de calibração de equipamentos foi evidenciada maior dificuldade na utilização desse tipo de serviço na região Norte, devido à escassez regional e das dificuldades na aquisição de serviços e insumos, por conta da burocracia no processo de compras, que na maioria das vezes envolve licitação.

A burocracia no processo de compras é, inclusive, um item frequentemente apontado pelos LACEN de todo o país, como responsável pela morosidade na aquisição de equipamentos e reagentes, que envolve na maioria das vezes o governo estadual para o repasse de verbas.

Observou-se, por exemplo, um laboratório do Centro-Oeste, que não realiza serviço de aquisição de insumos e reagentes diretamente, sendo necessário o envio da solicitação para a sub-secretaria de Vigilância à Saúde, que pertence à Secretaria de Saúde do Estado, que se encarregará da licitação.

Foram identificados, inclusive, em alguns laboratórios, equipamentos em ótimo estado de conservação,

porém sem utilização, por falta de reagentes ou de amostras, os quais poderiam estar ativos e atendendo às demandas das vigilâncias locais.

Recursos Humanos

Com relação aos recursos humanos dos laboratórios centrais de saúde pública foram calculados os percentuais de funcionários que atuam nas áreas relacionadas a produtos, biosegurança e qualidade, de acordo com a escolaridade (especialização, mestrado, doutorado) e por região do país, conforme mostra a Figura 1:

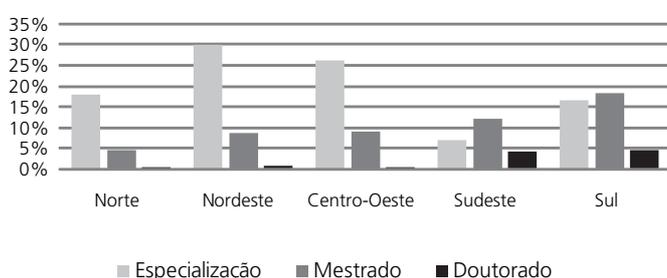


Figura 1. Capacitação de recursos humanos

Em relação à realização de especialização, os maiores percentuais foram observados nas regiões Nordeste, Centro-Oeste e Norte, enquanto que profissionais com mestrado e doutorado são mais frequentes nas regiões Sul e Sudeste. Esse resultado é compatível com a diversidade de cursos de pós-graduação oferecidos no país, que é bem mais ampla nessas regiões. Mas mesmo nas regiões Sul e Sudeste, os percentuais de profissionais com doutorado é relativamente pequeno.

Observou-se que a maioria dos LACEN apresentava pessoal capacitado, equipe comprometida, com conhecimentos técnicos e envolvimento com a implementação do sistema de gestão da qualidade.

No entanto, os resultados sugerem que, embora a maioria dos funcionários dos LACEN já tenha passado por algum tipo de treinamento referente à implementação do sistema de gestão da qualidade, os cursos oferecidos são curtos ou mesmo superficiais, deixando marcas de insegurança na implantação dos conhecimentos adquiridos. Observa-se certa imaturidade na compreensão dos diversos requisitos a serem atendidos e de como operacionalizá-los.

Há também sete laboratórios (26%) cuja direção não foi capacitada na interpretação da norma da qualidade específica, o que dificulta no envolvimento de toda a equipe e na implantação da política da qualidade. Apenas dezenove deles informaram que haviam sido capacitados e um não respondeu este item.

Observou-se em alguns laboratórios da região Norte que, apesar da maior carência de recursos humanos capacitados, o pessoal, em geral, encontrava-se bastante motivado e organizado, promovendo inclusive atividades de integração entre os funcionários.

No entanto, constatou-se ainda, em alguns laboratórios, carência de pessoal, devido à evasão do emprego público frente aos baixos salários nessa área, o qual acaba optando pela iniciativa privada, com salários mais atrativos. Além disso, alguns funcionários estão em processo de aposentadoria, apontando a necessidade de realização de mais concursos públicos nessa área.

Em relação aos cursos de capacitação observou-se que a maioria dos funcionários dos LACEN tem acesso facilitado, devido às exigências de legislações em vigor do setor de saúde, à prática comum de capacitação pelas esferas superiores e pelos estados e ao apoio da Anvisa na disponibilização periódica de cursos.

Sistema de Gestão da Qualidade

Panorama geral dos LACEN em relação ao estágio de implantação do sistema de gestão da qualidade e dos itens de biosegurança conforme classificação FINLACEN.

Foram considerados os quatro estágios de implantação do sistema de gestão da qualidade e os itens de biosegurança separadamente, conforme classificação do FINLACEN.

Em relação aos laboratórios classificados no Estágio 1, pela Portaria No. 3271 de 27 de dezembro de 2007, onze LACEN (41%) atendem a menos de 75% dos itens relacionados nesse estágio, sendo que três deles não chegam a cumprir os 50% dos requisitos para o atendimento. Em geral, estes laboratórios localizam-se nas regiões Norte e Nordeste. Os itens que oferecem maior dificuldade de atendimento estão relacionados à nomeação de substitutos para o pessoal-chave de nível gerencial e detalhamento nas informações contidas nos relatórios de análise crítica. São dificuldades que, para serem superadas, dependem mais diretamente de seus dirigentes.

No Estágio 2 estabelecido pela Portaria No. 3271, de 27 de dezembro de 2007, apenas cinco LACEN (18,5%)

cumprem menos de 50% dos itens. Aqueles itens menos atendidos pelos laboratórios referem-se a procedimentos para a aquisição de insumos, especificações e verificação no recebimento, e de manuseio geral dos registros técnicos e da qualidade: identificação, indexação, disposição etc.

Apenas nove LACEN atendem a 50% ou mais dos requisitos do Estágio 3. Os itens responsáveis pelas maiores dificuldades referem-se a procedimentos escritos e registros da verificação de equipamentos no recebimento, preparo de reagentes, armazenamento de insumos e análise crítica dos resultados dos ensaios, bem como o registro das condições ambientais em que as análises foram realizadas.

Com relação ao Estágio 4 do FINLACEN observa-se grande desigualdade no país e onde se verifica maior dificuldade no atendimento aos requisitos. Alguns laboratórios já apresentam um sistema da qualidade implantado e em fase de pequenos ajustes ou melhoria contínua, ao passo que vários não conseguiram avançar nesses quesitos. Este Estágio refere-se aos programas de manutenção preventiva e calibração de equipamentos, bem como às auditorias internas e análise crítica.

Dezessete LACEN (63%) não atendem ou atendem precariamente aos requisitos do Estágio 4. Encontram-se nesse grupo representantes de todas as regiões do país, embora estes estejam presentes também na minoria que já implantou o sistema da qualidade. Observa-se que os itens exigidos requerem mais especificamente investimentos na contratação de empresas especializadas em calibração e um corpo técnico bastante treinado, com conhecimento sólido e experiência na sistemática da gestão da qualidade.

Como ponto comum entre os LACEN mais desenvolvidos na implantação do sistema da qualidade observa-se o papel fundamental do envolvimento da direção. Aquelas que compreenderam a importância e vislumbraram esta meta como primordial para o fortalecimento e crescimento do laboratório conseguiram avançar e estimular o corpo técnico a se tornar pró-ativo na busca pela qualidade. Em geral, também, conseguiram garantir a continuidade de suas atividades pelos governos dos respectivos estados da união.

Quanto aos itens de biosegurança, o não cumprimento se deve mais frequentemente à precariedade na rotulagem e sinalização de segurança para a presença de reagentes químicos, carência de capacitação em primeiros socorros e utilização de EPIs, separação adequada e procedimentos escritos para o manuseio de material

perigoso. Os percentuais de atendimento aos requisitos relacionados à biosegurança são mais homogêneos entre os laboratórios, e refletem maior difusão do conhecimento nesta área, embora cerca de 20% dos LACEN ainda apresentem menos de 50% do total de itens contemplados ou os atendem com restrição.

Observou-se que os LACEN apresentam desigualdades em relação ao estágio de implantação do sistema de gestão da qualidade, podendo encontrar alguns mais avançados, com o sistema de gestão da qualidade funcionando plenamente e atendendo a praticamente todos os requisitos, e outros ainda excipientes, trilhando os primeiros passos. Apesar de todos já terem iniciado o processo de implantação e se encontrarem motivados para progredir, oito LACEN (30%) ainda não estabeleceram um programa de implantação do sistema da qualidade.

Constatou-se que alguns LACEN conseguiram a contratação de um serviço de consultoria referente ao sistema de gestão da qualidade, o que tem proporcionado maior êxito na implementação desse sistema de gestão.

Panorama dos LACEN em relação à implantação de alguns itens do sistema de gestão da qualidade referentes aos requisitos da Norma ISO IEC 17025/2005

Com relação ao sistema de gestão da qualidade foram selecionados alguns itens para serem pontuados nesse artigo, referentes aos requisitos da Norma ISO IEC 17025/2005, indicados a seguir:

- Elaboração de manual da qualidade documentado;
- Lista mestra de documentos do Sistema de Gestão da Qualidade;
- Procedimento documentado e aprovado para elaboração e controle de documentos do Sistema de Gestão da Qualidade (POP do POP); e
- Elaboração de programa anual de auditorias internas e da análise crítica pela gerência, e registro das atividades pertinentes.

As Figuras 2, 3, 4 e 5 apresentam o resultado da compilação destes dados:

Em relação ao Manual da Qualidade, observou-se que 100% dos laboratórios da região Centro-Oeste possuem o Manual, enquanto as regiões Sudeste e Sul possuem alguns laboratórios onde o Manual encontra-se em elaboração, e as regiões Norte e Nordeste ainda possuem laboratórios que não atendem a esse requisito.

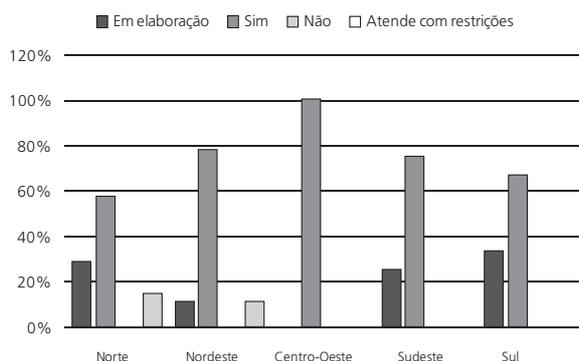


Figura 2. Manual da Qualidade

Em relação à Lista Mestra observou-se que todos os laboratórios das regiões Centro-Oeste e Sul já implementaram esse requisito. A região Sudeste possui também alguns laboratórios em processo de elaboração da lista mestra e as regiões Norte e Nordeste ainda possuem laboratórios que não atendem a esse requisito ou que o atendem com restrição.

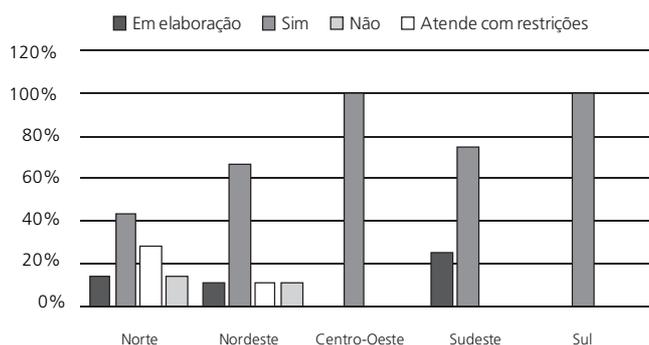


Figura 3. Lista Mestra

Em relação ao “POP do POP” observou-se que esse procedimento está implementado em todos os laboratórios das regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul. Já na região Norte, alguns laboratórios se encontram em fase de elaboração e na região Nordeste alguns laboratórios ainda não possuem esse procedimento.

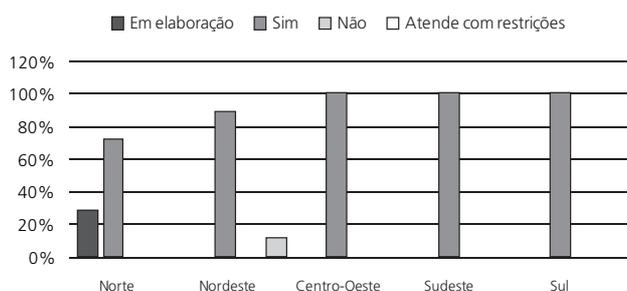


Figura 4. Pop do Pop

Em relação à auditoria interna e análise crítica observou-se que, embora sejam requisitos mais avançados na implementação do sistema de gestão da qualidade, a maioria das regiões apresenta alguns laboratórios que preenchem esse requisito. A região Sudeste é a região que possui mais laboratórios que atendem a esse requisito, enquanto a região Sul não apresenta nenhum. Já nas regiões Norte e Centro-Oeste, a maioria dos laboratórios ainda não possui programas anuais de auditoria interna, nem de análise crítica. Na região Nordeste observa-se laboratórios que começam a elaborar esse requisito.

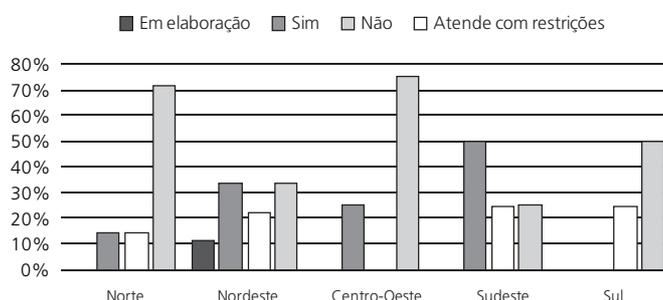


Figura 5. Auditoria Interna e Análise Crítica

Com relação à discussão sobre a forma de obtenção dos dados deste estudo é importante ponderar que a forma na qual foi realizada, por meio de relatórios elaborados por duplas, nem sempre coincidentes, durante a realização das visitas técnicas, embora utilizando um roteiro único a ser seguido, pode ter causado certa dificuldade na comparação dos laboratórios, principalmente nas avaliações mais subjetivas e qualitativas.

Observou-se também preenchimento incompleto de algumas planilhas e necessidade de adequação das mesmas, para um melhor desempenho na compilação dos dados.

Cabe salientar ainda, que foram pontuados apenas alguns dos aspectos levantados na visita técnica, havendo outros também relevantes, que foram constatados nos LACEN. No entanto, esse artigo restringiu-se aos requisitos mais impactantes para a implantação do sistema de gestão da qualidade nos LACEN.

Houve dificuldade também, na compilação geral dos dados referentes à capacitação de recursos humanos, pelo fato de não ter havido homogeneidade na aquisição dos dados, uma vez que alguns LACEN pontuaram todos os funcionários do laboratório, e outros apenas os envolvidos com as análises laboratoriais.

Observou-se que, em geral, há uma expectativa muito grande, por parte dos laboratórios, referente à cooperação da Anvisa, em relação à implementação do sistema de gestão da qualidade nos LACEN.

Alguns laboratórios apresentam maior interesse em enfrentar os obstáculos e programar melhorias, mesmo com os recursos escassos. Porém, vale ressaltar que a maioria dos entrevistados demonstrou estar consciente da importância de uma rede de laboratórios oficiais com o Sistema de Gestão da Qualidade implantado, possibilitando capacitação técnica e laboratorial adequadas para a garantia da confiabilidade analítica.

CONCLUSÃO

Conforme avaliação dos aspectos analisados nos LACEN referentes à implantação do sistema de gestão da qualidade observou-se que há uma disparidade em relação à regionalidade dos mesmos. Foi observado que os LACEN das regiões Norte e Nordeste encontram maiores dificuldades no processo de implantação do sistema de gestão da qualidade que os da região Centro-Oeste, Sul e Sudeste, devido aos fatores geográficos, à carência de oferta de serviços de calibração, aos entraves administrativos e ao acesso às informações.

Constatou-se que, embora os LACEN das diversas regiões apresentem diferentes graus de implementação em relação ao sistema de gestão da qualidade, todos já iniciaram o processo, embora alguns com maiores dificuldades que outros, e caminham rumo aos benefícios que a implantação desse sistema de gestão gera nos laboratórios.

Pode-se ressaltar a importância da sensibilização da direção do laboratório referente à política da qualidade para a efetiva implantação do sistema de gestão. Foi evidenciado que nos sete laboratórios cuja direção não havia sido capacitada na interpretação da norma da qualidade específica, houve dificuldade no envolvimento de toda a equipe e na implantação do sistema de gestão da qualidade.

Em relação aos requisitos gerenciais, a maioria dos LACEN atende apenas os itens mais básicos, como Manual da Qualidade, POP do POP e Lista Mestre, enquanto são poucos os laboratórios que já implantaram os requisitos mais avançados do sistema de gestão, como o plano de auditoria interna e a análise crítica.

Com relação aos equipamentos, é importante criar um mecanismo para agilizar e facilitar a contratação de

serviços de calibração de equipamentos, principalmente para atender às regiões onde há maior carência desse serviço.

É importante ressaltar que nem sempre a dificuldade de realização da análise tem como causa a ausência de equipamentos, uma vez que foram evidenciados em muitos laboratórios equipamentos adequados, porém fora de uso por falta de mão-de-obra qualificada e/ou dos reagentes requeridos.

Observou-se também grande dificuldade e burocracia por conta do repasse de verbas dos Estados para os LACEN, o que representa outro entrave no processo de implantação do sistema de gestão da qualidade e de melhorias e operacionalidade para o laboratório.

É necessário, além de investimentos financeiros para aquisição de equipamentos, insumos e treinamentos, a desburocratização do processo de compra nos LACEN e uma política efetiva de contratação, capacitação e valorização de recursos humanos, para que a rede nacional de laboratórios de saúde pública seja efetiva no controle dos produtos sujeitos à vigilância sanitária e na produção de laudos analíticos confiáveis.

Como pontos positivos, ressaltam-se o comprometimento dos funcionários dos LACEN, imbuídos, em sua maioria, na missão de implantar melhorias em suas atividades, sejam técnicas ou relativas ao sistema de gestão da qualidade; e por outro lado, o apoio da Anvisa na promoção de cursos de capacitação e do FINLACEN, que vem para incentivar investimentos na implementação do sistema da qualidade e manutenção das atividades.

Nesse sentido destaca-se o papel relevante da Anvisa no acompanhamento e direcionamento da aplicação de recursos aos LACEN, visando ao planejamento e otimização dos recursos para o fortalecimento da rede laboratorial do país, para atendimento à crescente demanda analítica decorrente das ações de vigilância sanitária.

REFERÊNCIAS

1. Santos E. Gestão da qualidade nos Laboratórios Centrais de Saúde Pública e o modelo de controle de qualidade analítica da malária. *Epidemiol. Serv. Saúde*. 2008;17(2): 117-22.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Portaria nº 3.271, de 27 de dezembro de 2007. Regulamenta o repasse de recursos financeiros destinados aos Laboratórios de Saúde Pública para a execução das ações de vigilância sanitária, na forma do Bloco de Financiamento de

- Vigilância em Saúde. [acesso em 2009 Set 10]. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2008/portaria_3271_finlacen.pdf.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Portaria nº 3202/GM de 18 de dezembro de 2007. Regulamenta o incentivo financeiro destinados aos Laboratórios Centrais de Saúde Pública – LACEN, para a execução das ações de vigilância sanitária, na forma do Bloco de Financiamento de Vigilância em Saúde e dá outras providências. [acesso em 2009 Set 10]. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2008/portaria_3202_incentivo.pdf.
 4. Góes HA, Jacob SC, Cruz CM, Vasconcellos E, Gemal A. Avaliação da capacidade técnico-operacional dos laboratórios oficiais na área de alimentos. XII Encontro Nacional de Analistas de Alimentos; 2001: Maceió. p.281.
 5. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Lei n 9.782, de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. [acesso em 2009 Set 10]. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/consolidada/lei_9782_99.pdf.
 6. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Portaria 354, de 11 de agosto de 2006. Aprova e promulga o Regimento Interno da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA e da outras providências. [acesso em 2009 Set 10]. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=23441>.
 7. Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Diretrizes para Projetos Físicos de Laboratórios de Saúde Pública. Brasília, DF: Funasa-MS; 2004. p 7-11.
 8. Silva ABM. Proposta para a implantação, implementação e avaliação de um programa de gestão da qualidade nos laboratórios de referência para a vigilância epidemiológica da Fiocruz [dissertação de mestrado]. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública. Fundação Oswaldo Cruz; 2004.
 9. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis/AIDS. Avaliação do desempenho de laboratórios de referência estadual em DST/AIDS. Brasília,DF: MS;1997. p. 9-12.
 10. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Estado da Saúde do Paraná. Laboratório Central do Estado do Paraná. Manual de biosegurança e segurança química em laboratórios de saúde pública. Curitiba: SESA; 2000.
 11. Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT.. NBR ISO/IEC 9000: Sistemas de gestão da Qualidade. Fundamentos e Vocabulários. Rio de Janeiro: ABNT; 2000.
 12. Pizzolato M, Caten CST, Jornada JAH. A influência do sistema de gestão de laboratórios nos resultados dos ensaios de proficiência da construção civil . *Gest Prod*. 2008 Set; 15(3): 579-89.
 13. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Gerência Geral de Laboratórios de Saúde Pública. Critérios para a Habilitação de Laboratórios segundo os Princípios das Boas Práticas de Laboratório (BPL): procedimento GGLAS 02/BPL: habilitação de laboratórios junto à REBLAS. Brasília: ANVISA; 2001. p 10-21.
 14. Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT. NBR ISO/IEC 17025: Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro: ABNT; 2005.
 15. Motta VT, Correa JA, Motta LR. Gestão da qualidade no laboratório clínico, 2º ed. Caxias do Sul. Médica Missau; 2001. p. 12-25.
 16. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Gerência Geral de Laboratórios de Saúde Pública. Guia para qualidade em química analítica. Brasília: ANVISA; 202. p.12-9.

Investigação da atividade antimicrobiana do veneno de *Rhinella icterica* (Amphibia, Anura)

Research of the antimicrobial activity of the poison from *Rhinella icterica* (Amphibia, Anura)

RIALA6/1245

Érika Gracielle PINTO^{1*}, Andrea Cardador FELIPE², Daniel NADALETTO³, Vera Lúcia Mores RALL⁴, Rosângela Marques MARTINEZ⁵

*Endereço para correspondência: Laboratório de Biologia Celular, Instituto Butantan, Avenida Vital Brazil, 1500 CEP: 05503-900, São Paulo, Brasil, Tel: (11), e-mail: erikagp@butantan.gov.br

¹Laboratório de Biologia Celular, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil,

²Departamento de Biologia, Universidade do Sagrado Coração, Bauru, SP, Brasil

³Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho (UNESP) Botucatu, SP, Brasil.

⁴Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, (UNESP) Botucatu, SP, Brasil.

⁵Departamento de Biologia, Universidade do Sagrado Coração, Bauru, SP, Brasil

Recebido: 02.06.2009 – Aceito para publicação: 03.09.2009

RESUMO

Os anfíbios apresentam dois tipos de glândulas cutâneas: as mucosas e as granulosas. As secreções produzidas nas suas glândulas de sua pele apresentam componentes químicos diversos que têm sido estudados com relação as suas atividades biológicas, com efeito anestésico, alucinógeno e até antimicrobiano. Devido à diversidade de espécies no Brasil e ainda poucos estudos dessa natureza, o presente estudo objetivou investigar a atividade antimicrobiana do veneno das glândulas parotóides do sapo *Rhinella icterica*, procedentes do Distrito de Rubião Junior, Botucatu, estado de São Paulo. Foi avaliado o efeito de diferentes concentrações do veneno sobre colônias de bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, bem como o tempo necessário para a ação antimicrobiana. Observou-se que o veneno extraído apresentou atividade antimicrobiana leve para as duas bactérias estudadas, porém com maior ação para *S. aureus*. O veneno agiu somente em concentrações maiores de 50 mg/mL, com maior eficiência na concentração de 100 mg/mL, em tempo igual ou superior a 30 minutos para *S. aureus* e a partir de 15 minutos para *E. coli*. Estes dados poderão servir de base para estudos futuros envolvendo o isolamento das substâncias do veneno que apresentaram atividade antimicrobiana e as concentrações mínimas necessárias para a referida ação.

Palavras-chave. Amphibia, Anura, ação antimicrobiana, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Rhinella icterica*.

ABSTRACT

Amphibians exhibit two types of cutaneous glands: mucous and granular. The secretion produced in their skin glands exhibit several chemical components. These substances have been studied regarding biological activity, showing aenesthetic, hallucinogen and antimicrobial effects, among others. Due to the diversity of Brazilian species, and considered that only few studies assessed this issue, the present study aim to investigate the antimicrobial activity of the poison produced by the parotoid macroglands of the toad *Rhinella icterica* originated from Rubião Júnior, Botucatu, São Paulo state. We assessed the effect of different poison concentrations on *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* cultures, as well as the time required for antimicrobial action to perform. *R. icterica* poison presented weak antimicrobial activity for both bacteria considered, with a stronger effect on *S. aureus*. The poison acts in concentrations higher than 50 mg/mL, with a larger effectiveness at 100mg/mL. Time required for action was equal or superior than 30 minutes for *S. aureus* and superior than 15 minutes to *E. coli*. These data may support future studies involving the isolation of the substances conferring antimicrobial activity to the poison of *R. icterica*, as well as the minimum concentrations required for the refered action.

Key words. Amphibian, Anura, antimicrobial activity, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Rhinella icterica*.

INTRODUÇÃO

Os anfíbios são divididos em três ordens: Anura, representada pelos sapos, rãs e pererecas; Caudata, salamandras e tritões; e Gymnophiona, as cobras-cegas¹. As três ordens caracterizam-se pela presença de dois tipos de glândulas cutâneas: glândulas mucosas e as glândulas granulosas. As glândulas mucosas produzem muco, o qual controla o pH, o grau de umidade na pele, atua na termoregulação, respiração cutânea e na defesa. Já as glândulas granulosas (também chamadas de serosas ou venenosas) produzem secreções tóxicas, repelentes para várias espécies de vertebrados, e protegem contra a proliferação de micro-organismos na superfície do corpo, sendo um dos primeiros elementos de defesa dos anfíbios². O veneno produzido pelas glândulas granulosas é bem diversificado quanto aos seus componentes químicos³, incluindo aminas biogênicas, esteróides, alcalóides e peptídeos, com diferentes atividades biológicas: colinomimética, simpatomimética, anestésica, hemolítica, miotóxica, neurotóxica e antibiótica^{2,4}.

Os anfíbios são ricos em moléculas antimicrobianas, particularmente peptídios⁵. Em algumas espécies, essas moléculas estão no muco que recobre o tegumento dos anfíbios, como é o exemplo de um potente antibiótico que foi isolado da pele de *Xenopus laevis*, e que talvez tenha aplicações médicas⁶. Em *Lithobates palustris* foram encontrados 22 peptídeos com atividade antimicrobiana⁷. No sapo asiático *Bufo gargarizans* foi purificado e caracterizado um peptídeo antimicrobiano presente em seu estômago, o qual mostrou forte atividade contra uma ampla variedade de micro-organismos incluindo bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos⁵. Em *Rhinella arenarum* foi registrada atividade antimicrobiana de lecitinas construtoras da lactose da pele, que mostraram forte atividade bacteriostática contra bactérias Gram-negativas (*E. coli* e *Proteus morganii*) e Gram-positivas (*Enterococcus faecalis*), concluindo que as lecitinas podem suprir uma defesa eficaz contra a invasão de micróbios nesses sapos⁸.

Em anos recentes, o uso indiscriminado e sem controle médico de antibióticos fez com que cepas de bactérias resistentes a estas drogas fossem selecionadas⁷. Por isso, tornou-se necessária a descoberta constante de novos agentes fungicidas e bactericidas mais eficazes, que podem ter utilidade clínica⁹. Considerando a diversidade da fauna de anuros do Brasil e os poucos trabalhos dessa natureza, o presente estudo objetivou testar a

ação antimicrobiana do veneno de sapos da espécie *Rhinella icterica* em colônias de bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, bem como verificar o tempo mínimo para a referida ação e a concentração na qual o veneno apresenta máxima atividade antimicrobiana.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta dos animais

Foram coletados nove exemplares machos da espécie *Rhinella icterica*, no mês de julho de 2007, no Distrito de Rubião Júnior, município de Botucatu (SP). Os exemplares foram transferidos para o Laboratório de Zoologia da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Botucatu, e mantidos em terrários para posterior extração de veneno, que foi realizada na manhã seguinte.

Extração, processamento e armazenamento do veneno

Cada uma das glândulas parotóides de cada exemplar sofreu compressão manual. O veneno projetado foi recolhido sobre um vidro transparente e plano posicionado diante da glândula. O veneno total foi recolhido do vidro por raspagem e imediatamente liofilizado conforme descrito por Nadaletto e colaboradores (2001)¹⁰. Após liofilizado, o veneno colhido (total de 2,793g) foi mantido em freezer à -70°C. Para utilização nos ensaios, o veneno foi descongelado e imediatamente macerado até transformar-se em pó.

Pesquisa da atividade antibacteriana

Os micro-organismos *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) utilizados nesse estudo foram obtidos no Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Botucatu.

Técnica 1: As bactérias (*Escherichia coli* - ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* - ATCC 25923) foram semeadas em caldo Brain Heart Infusion (BHI, Difco) e incubadas a 37°C/16-18 horas. Após esse período, as concentrações dessas bactérias foram ajustadas à escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC). Concentrações de 5 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL, 100 mg/mL do veneno foram diluídas diretamente nessas culturas. Após os tempos 15, 30 e 60 minutos de contato, foram realizadas diluições seriadas decimais. 100 µl dessas diluições foram espalhados na superfície do ágar Plate Count Agar (PCA, Difco), com

o auxílio de uma alça em L, e as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após período de incubação, pôde ser verificada a diminuição do número de bactérias nas placas analisadas.

Houve o controle da esterilidade do veneno pela sua sementeira em PCA, para a observação do possível crescimento de contaminantes. Como controle positivos, as bactérias foram semeadas no mesmo ágar, mas sem o contato prévio com o veneno.

Técnica 2: O veneno foi espreado com o auxílio de uma alça em L diretamente sobre placas de Petri, nas concentrações de 5 mg/mL, 10 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL, 100 mg/mL. Após a absorção do veneno pelo ágar, 100 µl das bactérias, na concentração de 1,5 x 10⁸ UFC, foram espreadas na superfície e incubadas a 37°C/24h. Foi realizada contagem das colônias após 25 horas, 26 horas e 27 horas da estriagem. Após período de incubação, pode ser verificada a diminuição do número de bactérias nas placas analisadas.

Técnica 3: Essa técnica é uma modificação da técnica de antibiograma. Cada bactéria, na concentração de 1,5 x 10⁸ UFC, foi espreada com o auxílio de uma alça em L, na superfície do ágar PCA. Em cada placa, foram perfurados cinco poços nos quais foram aplicados diferentes diluições do veneno, nas concentrações de 5 mg/mL, 10 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL, 100 mg/mL, diluídos em água tamponada esterilizada. Para a confecção dos poços, utilizou-se uma seringa para a aspiração do meio, deixando um orifício redondo na placa. As placas foram mantidas em estufa a 37°C por 24 horas, ao fim das quais verificou-se a presença de halo de inibição do crescimento bacteriano ao redor dos poços.

Avaliação do efeito antibacteriano

Não foi possível realizar a contagem das UFC. Portanto, realizamos uma avaliação qualitativa do efeito do veneno sobre a proliferação bacteriana. Observamos 4 níveis de inibição: (-) nenhuma inibição; (+) pouca inibição; (++) média inibição; (+++) máxima inibição.

RESULTADOS

A técnica 1 apresentou resultados satisfatórios, pois possibilitou a análise do fator tempo de exposição ao veneno e concentração do veneno na atividade antimicrobiana. Os resultados da relação entre o tempo e o efeito antimicrobiano estão sumarizados na Tabela

1. Os resultados da relação entre concentração e efeito antimicrobiano estão sumarizados na Tabela 2.

No experimento, utilizando *Escherichia coli*, o número de UFC diminuiu conforme aumentava a concentração de veneno de *Rhinella icterica*. Na concentração de 100 mg/mL, houve forte inibição bacteriana. Por outro lado, com 5 mg/mL, houve uma mínima inibição. Quanto ao tempo, utilizando-se a concentração de 100 mg/mL, houve inibição a partir dos 15 minutos (0-15). Contudo, não houve diferenças no grau de inibição entre 15 minutos e os demais tempos de exposição (30 e 60 minutos).

Em relação à *Staphylococcus aureus*, o número de UFCs diminuiu conforme aumentava a concentração de veneno. Na concentração de 100 mg/mL, o veneno apresentou maior atividade em relação as demais concentrações utilizadas. Observou-se variação quanto ao tempo de ação, pois a concentração de 100 mg/mL não apresentou efeito inibitório em 15 minutos (0-15 minutos) e sim em 30 (15-30) minutos, que se manteve constante com 60 minutos.

Para uma mesma concentração e tempo de exposição, o veneno de *Rhinella icterica* mostrou ação antimicrobiana mais eficaz em *Staphylococcus aureus* do que em *Escherichia coli*, em qualquer dos tratamentos utilizados.

Tabela 1. Efeito do veneno em relação ao tempo

Tempo (minutos)	0	15	30	60
<i>E. coli</i>	-	++	++	+++
<i>S. aureus</i>	-	-	++	+++

Legenda: (-) Nenhuma inibição; (+) pouca inibição; (++) média inibição; (+++) máxima inibição.

Tabela 2. Efeito do veneno em relação à concentração

Concentração (mg/mL)	5	25	50	100
<i>E. coli</i>	+	++	++	+++
<i>S. aureus</i>	+	++	++	+++

Legenda: (-) Nenhuma inibição; (+) pouca inibição; (++) média inibição; (+++) máxima inibição.

Na técnica 2, o veneno não inibiu o crescimento das duas espécies de bactérias em nenhum dos tratamentos aplicados, tanto com relação aos diferentes tempos (30

min às 3h) e concentrações. Portanto, o método não foi eficiente para discriminar os efeitos dos diferentes tratamentos sobre o desenvolvimento das bactérias.

Em relação ao terceiro método, o veneno não inibiu o crescimento das bactérias em nenhum dos tratamentos aplicados. Uma vez que não foram observados halos ao redor dos poços, é provável que o veneno não tenha conseguido dispersar-se dentro das poças, deste modo, não inibindo o crescimento das bactérias.

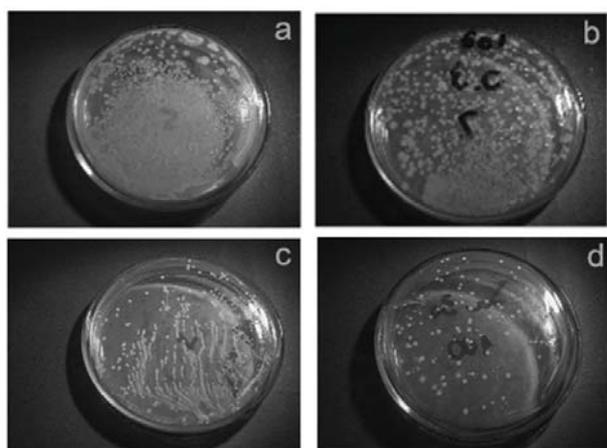


Figura 1. Fotos ilustrando diferentes concentrações do veneno e diferentes tempos de atividade antibacteriana: a) Placa de *Escherichia coli* em 30 minutos na concentração de 5 mg/mL; b) Placa de *Escherichia coli* em 60 minutos na concentração de 5 mg/mL; c) Placa de *Staphylococcus aureus* em 30 minutos na concentração de 5 mg/mL; d) Placa de *Staphylococcus aureus* em 30 minutos na concentração de 100 mg/mL.

DISCUSSÃO

O veneno bruto de *Rhinella icterica* apresentou ação antimicrobiana em concentrações maiores de 50 mg/mL para as duas bactérias e em tempo igual ou superior a 30 minutos (15 e 30 minutos) para *S. aureus* e igual ou superior à 15 minutos (0 e 15 minutos) para *E. coli*. Os dados obtidos neste trabalho estão de acordo com a observação de que as secreções da pele e/ou das macroglândulas de sapos e de outros anfíbios apresentam atividades antimicrobianas. As moléculas que apresentam tal característica estão presentes na pele, glândulas mucosas, glândulas de veneno e no tecido estomacal e têm sido isoladas e estudadas em algumas espécies de anuros dos gêneros *Xenopus*, *Bombina*, *Phyllomedusa*, *Lithobates* e *Rhinella*^{5,7,11}.

Com relação ao veneno de *Rhinella*, Rieira e colaboradores⁸ demonstraram atividade antimicrobiana de lecitinas construtoras da lactose da pele de *Rhinella arenarum*, mostrando inibição de *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Proteus morgani*. Foi demonstrada

atividade antibiótica de dois bufadienólídeos da pele de *Rhinella rubescens* sobre bactérias *S. aureus* e *E. coli*¹¹. Esses autores verificaram que *S. aureus* é menos suscetível do que *E. coli* à esses compostos, em oposição ao presente trabalho. É possível que a atividade antibiótica observada na secreção bruta do veneno de *Rhinella icterica* esteja relacionada à presença desses compostos, tendo em vista o alto grau de conservação de componentes do veneno entre espécies do gênero *Rhinella*¹². A pele de sapos *Rhinella* apresenta uma grande diversidade de compostos bioativos, representando importante fonte de novos fármacos. Tempone e colaboradores¹³ demonstraram que dois bufadienólídeos denominados telocinobufagina e helebrigenina, isolados de *Rhinella jimi*, apresentam potente atividade anti-*Leishmania* e anti-*T. cruzi*.

Em nossos ensaios, a maior suscetibilidade de *Staphylococcus aureus* em relação à *Escherichia coli* ao veneno de *R. icterica* pode estar relacionada ao fato de a primeira ser uma bactéria Gram-positiva enquanto a segunda é Gram-negativa. Essa efetividade diferencial entre os dois tipos de bactérias está descrita para uma série de antibióticos, como lincomicina e eritromicina, estando associada à diferenças na estrutura da parede celular e RNA ribossomal entre esses dois grupos¹⁴.

O presente trabalho demonstrou que o veneno do sapo *Rhinella icterica* possui ação antimicrobiana sobre *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, e que essa ação é dependente da concentração e do tempo de exposição ao veneno. Estes dados poderão servir de base para estudos futuros envolvendo o isolamento das substâncias do veneno com atividade antimicrobiana e a determinação de concentrações mínimas necessárias para a referida ação. Estudos dessa natureza são fundamentais para busca de novos fármacos, os quais podem se tornar importantes armas no combate a doenças causadas por bactérias e outros micro-organismos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o suporte de André Tempone e Ivan Prates por terem lido o texto criticamente e sugerido comentários para sua melhoria.

REFERÊNCIAS

1. Monti R, Cardello L. Bioquímica do Veneno de Anfíbios. In: Barraviera B, editor. Venenos Animais: uma visão integrada. Rio de Janeiro: EPUC; 1994. p. 225-32.

2. Toledo RC, Jared C. Cutaneous granular glands and amphibian venoms. *Comp. Biochem. Physiol.* 1995; 111(1): 1-29.
3. Toledo RC. Breve apreciação sobre a secreção cutânea dos anfíbios. *Ciência e Cultura.* 1984; 38: 279-84.
4. Daly JW, Myers CW, Whittaker N. Further classification of skin alkaloids from neotropical poison frogs (Dendrobatidae), with a general survey of toxic/noxious substances in the amphibia. *Toxicon.* 1987; 25(10): 1023-95.
5. Park CB, Kim MS, KIM SC. A novel antimicrobial peptide from *Bufo bufo gargarizans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996; 218: 408-13.
6. Pough FH. Salamandras, Anuros e Cecílias. In: A vida dos vertebrados. São Paulo: Atheneu; 2003. p.346-55.
7. Conlon JM, Kolodziejek J, Nowotny N. Antimicrobial peptides from ranid frogs: taxonomic and phylogenetic markers and a potencial source of new therapeutic agents. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2004; 1696(1):1-14.
8. Rieira AS, Daud A, Gallo A, Genta S, Aybar M, Sanches S. Antibacterial activity of lactose-binding lectins from *Bufo arenarum* skin. *Biocell.* 2003; 27(1): 37-46.
9. Nascimento ACC, Zanotta LC, Kyaw CM, Schwartz ENF, Schwartz CA, Sebben A, Sousa MV, Fontes W, Castro MS. Ocellations: New antimicrobial peptides from the skin secretion of the south american frog *Leptodactylus ocellatus* (anura: Laeptodactylidae). *The Protein Journal.* 2004; 23: 501-08.
10. Nadaletto D. Avaliação da toxicidade do veneno de adultos de *Bufo ictericus* Spix, 1824, criados em cativeiro desde a fase larval e de sapos capturados no campo e mantidos em cativeiro. [tese de bacharelado] Botucatu, São Paulo: Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho (UNESP), 2001.
11. Cunha Filho GSA, Schwartz CA, Resck IS, Murta MM, Lemos S, Kyaw CM, Castro MS, Leite JR, Pires JROR, Block JRC, Schwartz ENF. Antimicrobial activity of the bufadienolides marinobufagin and telocinobufagin isolated as major components from skin secretion of the toad *Bufo rubescens*. *Toxicon.* 2005; 45: 777-82.
12. Maciel NM, Schwartz CA, Junior ORP, Sebben A, Castro MS, Souza MV, Fontes W, Schwartz ENF. Composition of indolealkylamines of *Bufo rubescens* cutaneous secretions compared to six other Brazilian bufonids with phylogenetic implications. *Comparative Biochemistry and Physiology.* 2003; 134: 641-49.
13. Tempone AG, Pimenta DC, Ivo L, Patrícia S, Noemi NT, Heitor FAJR, Marta MA, Calos J. Antileishmanial and antitrypanosomal activity of bufadienolides isolated from the toad *Rhinella jimi* parotoid macrogland secretion. *Toxicon.* 2008; 52: 13-21.
14. Tanaka R, Weisblum B. Systematic difference in the methylation of ribosomal ribonucleic acid from Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Jornal of Bacteriology.* 1975; 123: 771-4.

Epidemiologia do câncer de mama em homens

Epidemiology of breast cancer in men

RIALA6/1246

Patrícia HAAS*, Alessandra Bortoluzzi COSTA, Alyne Proença de SOUZA

*Endereço para correspondência: Departamento de Análises Clínicas UFSC – Florianópolis, SC, Brasil
e-mail: haas@ccs.ufsc.br

Departamento de Análises Clínicas Universidade Federal de Santa Catarina
Florianópolis, SC, Brasil

Recebido: 23.07.2009 – Aceito para publicação: 07.12.2009

RESUMO

O presente estudo avaliou os aspectos epidemiológicos, clínicos, diagnósticos e terapêuticos do câncer de mama em homens, cuja ocorrência é rara e poucos relatos são disponíveis na literatura. Foi realizada a pesquisa de artigos científicos publicados sobre esse temático por meio de consultas a bases de dados como BIREME - Biblioteca Virtual em Saúde que possibilita acesso à Lilacs (Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde) e à base de dados PUBMED (Biblioteca Nacional de Medicina dos Estados Unidos). O câncer de mama representa menos de 1% de todos os cânceres em homens, contudo a ocorrência dessa neoplasia tende a aumentar em função da má qualidade de vida e pela dificuldade em efetuar diagnóstico precoce. A incidência aumentou significativamente de 0,86 a 1,06 por 100.000 homens ao longo dos últimos 26 anos; as taxas mais altas ocorrem na América do Norte e na Europa e taxas mais baixas na Ásia. É sabido que os homens com câncer de mama têm as piores taxas de sobrevida global em relação às mulheres, mas esta é provavelmente pela maior idade no momento do diagnóstico, que corresponde à fase mais avançada de apresentação da doença, bem com as maiores taxas de morte por comorbidade de doenças. A prevenção e o diagnóstico precisos são as melhores estratégias para melhorar a qualidade de vida e sobrevivência do paciente com essa neoplasia.

Palavras-chave. câncer de mama masculino, neoplasia da mama, incidência em homens, diagnóstico.

ABSTRACT

This study evaluated the epidemiological, clinical, diagnostic and treatment aspects of breast cancer in men, which is rarely frequent and few investigations are reported in the literature. We looked over the scientific publications in databases such as BIREME - Virtual Health Library that allows the access to the Lilacs (Latin-American and Caribbean Health Sciences Literature), and also to the database PUBMED (National Library of Medicine U.S.). The breast cancer represents less than 1% of all cancers in males, nevertheless the occurrence of this cancer tends to increase due to poor quality of life and difficulty in performing an early diagnosis. Its incidence significantly increased from 0.86 to 1.06 per 100,000 men over the past 26 years. The highest rates are found in North America and Europe and the lowest rates in Asia. It is known that men have overall the worst rates of survival when compared to women, probably due to the breast cancer diagnosis in men being done when they are older, just at time of much more advanced disease stage, and also owing to the death rates by co-morbid diseases. The accurate diagnosis and prevention are the best strategies to make an improvement upon life quality and survival of patient with this malignancy.

Key words. males breast cancer, breast cancer, incidence in men, diagnosis.

INTRODUÇÃO

O câncer de mama masculino é uma doença rara que representa menos de 1% de todos os cânceres em homens e sua incidência está aumentando em homens mais jovens^{1,2,3,4}. A Sociedade Americana de Câncer estimou no ano de 2004 que 1.450 homens seriam diagnosticados com câncer de mama nos Estados Unidos e 470 homens morreriam desta doença. Em 2005, um número estimado de 1.690 novos casos de câncer de mama masculino foram diagnosticados nos Estados Unidos e 460 homens morreriam em consequência do câncer⁵. A incidência de câncer de mama masculino aumentou significativamente de 0,86 a 1,06 por 100.000 homens ao longo dos últimos 26 anos². A variação mundial do câncer de mama tanto masculino como feminino, apresenta-se com taxas mais altas na América do Norte e na Europa e taxas mais baixas na Ásia. Embora a literatura epidemiológica sobre câncer de mama feminino é extensa, pouco é relatado sobre a etiologia da neoplasia masculina. Esta diferença é principalmente devido à baixa incidência desta neoplasia em homens². A média de idade no momento do diagnóstico para os homens com cancro da mama é de 67 anos, sendo 5 anos acima que a idade média no momento do diagnóstico para as mulheres, no entanto, tem sido relatado pacientes do sexo masculino com idade entre 5 a 93 anos de idade. A incidência em homens aumenta conforme a idade avança, escalando com firmeza até que seja atingido um patamar de cerca de 80 anos⁵.

Os principais fatores de risco identificados são os antecedentes familiares; insuficiência hepática por causas diversas (incluindo alcoolismo e doenças endêmicas); tratamentos hormonais prolongados; tumores de testículo; orquite; traumas testiculares; tumores de próstata; obesidade; alterações de cariótipo (Síndrome de Klinefelter); assim como a presença de ginecomastia. Esta última, apesar de não ser considerada isoladamente um fator de risco para o câncer de mama em homens, apresenta frequente associação com o mesmo⁶. Mutações no gene BRCA1 estão associadas a alguns casos, mas a ligação entre mutações no gene BRCA2 e câncer de mama masculino é mais forte^{5,7,8}. A maioria dos subtipos histológicos que são observados em mulheres também está presente em homens, exceto o tipo lobular que é muito raro. Tumores de mama masculinos têm maior probabilidade de manifestar receptores de estrogênio e progesterona⁵. Um estudo caso-controle realizou uma comparação de base

populacional, de 99 casos masculinos, caracterizado por mutações no gene BRCA1 e no gene BRCA2, com 261 homens como controles, todos residentes em Toscana, Itália. Todos casos e controles foram genotipados para o alelo BRCA2 N372H. Para avaliar o genótipo de risco específico do BRCA2 N372H variante, os homens que apresentavam mutações BRCA1/2 foram excluídos das análises. Embora baseasse em uma série relativamente pequena, o estudo sugeriu que o genótipo homocigoto BRCA2 HH pode ser positivamente associado com um risco aumentado da neoplasia em homens com idade inferior a 60 anos de idade⁹. Existe uma associação entre mutações no gene BRCA2 e câncer de mama masculino, especialmente naqueles com uma história familiar. A alta prevalência de mutações BRCA2 entre os homens deve ser considerada uma estimativa de risco para parentes do sexo feminino^{10,11}.

Os homens com síndrome de Klinefelter tendem a ter níveis aumentados de gonadotrofinas, mas os baixos níveis de androsterona e níveis normais a ligeiramente baixos de estrógenos, resultam em uma alta taxa de estrogênio / andrógeno. A média de idade dos pacientes com câncer de mama com síndrome de Klinefelter é de 58 anos de idade, que é um pouco menor do que a idade média de aparecimento do câncer, na ausência da síndrome. Estima-se que 3% a 4% dos casos de câncer de mama foram relatados ter síndrome de Klinefelter. Quando comparada com a frequência do transtorno na população geral, parece que o câncer de mama pode ser pelo menos 20 vezes mais comum em homens com a síndrome, em comparação com homens sem esta condição².

Condições que são associadas com o aumento de níveis de estrogênio como a cirrose hepática e a administração exógena de estrogênio têm sido implicados como fatores causais. Além disso, devido à deficiência androgênica testicular, doenças como caxumba, lesão testicular, foram associadas à ocorrência de câncer de mama em homens. A exposição ocupacional ao calor e à radiação eletromagnética, que podem causar danos testiculares é também postulada¹².

Conforme estudo sobre as diferenças étnicas e raciais para sobrevivência desse tipo de câncer existe uma diferença significativa por etnia. As taxas de sobrevivência de 5 anos foram 66% para brancos, 57% negros, e 75% para os homens de outra etnia. Negros apresentaram a doença mais avançada. Brancos e negros tinham piores taxas de sobrevivência em comparação com os homens de

outra etnia¹³. Houve uma associação da raça negra do sexo masculino com o aumento da mortalidade específica para o câncer de mama¹. Em outra pesquisa o objetivo da análise retrospectiva foi comparar as características e os resultados dos pacientes masculinos e femininos com câncer de mama. Os resultados sugeriram a presença de diferenças na biologia, patologia, apresentação, etnia e sobrevivência entre pacientes. Em pacientes com receptores hormonais positivos, no câncer de mama masculino a sobrevida foi inferior apesar do tratamento hormonal semelhante entre homens e mulheres¹⁵.

O quadro clínico, na maioria das vezes, inicia-se de forma insidiosa, com espessamento do tecido glandular mamário normalmente na região retroareolar, retração na pele, presença de nódulo sólido, secreção papilar frequentemente sanguinolenta e, em etapa posterior, úlcera⁶. Os sintomas mais comuns apresentados em doentes com a neoplasia são um nódulo indolor subareolar, mamilo retração e sangramento do mamilo. Carcinoma ductal *in situ* compreende aproximadamente 10% dos cânceres de mama em homens. Os mais comuns são o crescimento dos padrões papilares e cribiforme, e a maioria destes tumores são de baixa qualidade. Carcinoma lobular *in situ* é muito raro, porque o homem não tem terminal de lóbulos na mama, mas tem sido relatada uma associação com carcinoma lobular invasivo. Para carcinomas invasivos, os intervalos dos subtipos histológicos de câncer de mama feminino e masculino são semelhantes, mas as relativas distribuições diferem. Dados de mais de 2.000 pacientes do sexo masculino mostram que 93,7% dos carcinomas da mama masculina são do tipo ductais ou não classificados; 2,6 % são papilar; 1,8 % são mucinoso, e apenas 1,5 % são lobular. Esta distribuição contrasta com o observado no sexo feminino em que quase 12% são tipo carcinoma lobular⁵.

METODOLOGIA

A busca por artigos científicos foi realizada nas seguintes bases de dados: BIREME - Biblioteca Virtual em Saúde, que possibilita acesso à Lilacs (Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde) e PUBMED (serviço da Biblioteca Nacional de Medicina dos Estados Unidos). Utilizou-se como restrição para inclusão: artigos publicados nos últimos cinco anos, idiomas inglês, português e espanhol e pesquisas em humanos.

DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

O diagnóstico do câncer de mama masculino ocorre mais tarde se comparado ao feminino, com idade de 60 anos sendo que nas mulheres é detectado em média 10 anos antes. Esse atraso no diagnóstico leva a detecção de casos avançados da doença por desconhecimento do problema pelo paciente e, muitas vezes, pelo médico^{3,6,16,17,18,19}. Devido ao tumor estar próximo à pele e a musculatura, justifica-se uma menor frequência de casos de estágios iniciais, o que por sua vez, leva a um maior achado de invasões de estruturas vizinhas ao órgão e acometimento linfonodal à distância. Atualmente, com conhecimentos maiores da patologia, a duração dos sintomas anteriores ao diagnóstico vem decaindo, chegando entre 1 a 8 meses, o que anteriormente chegava até 21 meses²⁰. Houve um aumento do diagnóstico clínico do câncer de mama em homens, nos últimos anos, pelo fato da maior preocupação da área médica em difundir a real incidência da doença no sexo masculino. Ainda que em comparação com a neoplasia feminina, ocorre um percentual de incidência menor, com a razão homem/mulher aproximadamente 1:1.000 pessoas¹⁶.

O diagnóstico diferencial com a ginecomastia deve ser levado em consideração, pois está associado com 12% a 40% dos casos de câncer de mama masculino^{5,17,21}. Outras doenças como abscesso subareolar, ectasia ductal, papiloma intraductal, necrose gordurosa (trauma), tumor filodes, lipoma, melanoma, linfoma, tuberculose mamária, sarcomas da parede torácica e metástases para a mama, também devem ser analisadas no diagnóstico diferencial²¹.

A mamografia é de grande importância, mas apresenta o uso limitado pelas dificuldades técnicas e também pela condição anatômica da mama masculina, sendo que para pacientes obesos e com ginecomastia é de grande utilidade^{5,16,20,21}. Os principais achados da mamografia são presença de massa bem definida, excêntrica com margens espiculadas com menor frequência de microcalcificações^{5,16,17,20,21}. Estes achados diferenciam-se da ginecomastia que apresenta área triangular ou circular com posicionamento simétrico na região retroareolar^{16,21}. Como complemento do diagnóstico a ultra-sonografia se torna útil e pode revelar envolvimento nodal^{5,16}.

Para confirmação do diagnóstico a biópsia com comprovação histopatológica é o método de escolha¹⁶. A punção aspirativa por agulha fina (PAAF) ou a *core*-biópsia são os procedimentos realizados, a *core* permite

o conhecimento do estadiamento do tumor através do tamanho (estado T) e a presença ou ausência de metastização nos linfonodos axilares (estado N) (17, 21). Esses indicadores fornecem um prognóstico ao paciente, a sobrevida de cinco anos apresenta-se para paciente com 77% de linfonodos negativos contra 37,5% de linfonodos positivos. Já em relação ao tamanho, casos acima de 5 cm indicam prognóstico ruim²¹.

A imunoistoquímica é uma ferramenta auxiliar na avaliação preditiva à resposta ao tamoxifeno quando há presença de receptores estrogênicos e progesterogênicos. Esses receptores estão mais presentes em homens do que em mulheres com a porcentagem de 83%, sendo que no sexo masculino essa porcentagem é de 86% e no feminino de 76%^{16,22}.

A presença de receptores hormonais no tecido tumoral permite a dosagem dos mesmos, assim serve como fator prognóstico para a doença de mama em mulheres; sendo sua dosagem praticamente parte da rotina do laudo anatomopatológico, ou que, pelo menos, deve ser solicitada em todos os casos de neoplasia de mama. Devido à presença de receptores na neoplasia masculina é válida a dosagem, pois pode orientar e indicar a complementação terapêutica considerando que os tumores masculinos são receptores positivos⁶.

Para o câncer de mama em homens preconiza-se o mesmo tratamento estabelecido para as mulheres, os quais são tratamento cirúrgico, após o uso ou não de radioterapia, quimioterapia e principalmente hormonioterapia⁶. Embora a doença é fundamentalmente semelhante nos dois sexos e o tratamento do câncer de mama em homens é semelhante ao do sexo feminino, é considerada pobre sobrevida em pacientes do sexo masculino em comparação ao feminino²³.

O tratamento cirúrgico proposto é a mastectomia radical modificada, sua escolha se baseia nos seguintes fatos: escassez de parênquima mamário; a localização do tumor muitas vezes é na região retroareolar da mama; quase sempre são diagnosticados como lesões palpáveis e, portanto a relação volume tumoral e volume mamário não permitiriam o tratamento conservador⁶. Há indicação da linfadenectomia axilar obrigatória nos casos de mastectomia radical modificada, devido às altas taxas de metástase axilar^{5,16,20,24}.

A radioterapia para homens após a mastectomia é mais indicada a estes do que para as mulheres, isso se deve a elas apresentarem mais susceptibilidade de envolvimento dos mamilos e pele. Porém a radioterapia não parece ser

eficaz nos casos de recidivas da neoplasia, mas estudos mostraram que a mesma pode ter um potencial benéfico na sobrevida do paciente⁵.

Pacientes com comprometimento linfonodal axilar, a quimioterapia está indicada. Os esquemas com antraciclinas (adriplastina) é indicado para pacientes jovens com linfonodos axilares comprometidos e também pacientes linfonodos negativos, mas de alto risco de recorrência¹⁶. Embora não existam ensaios clínicos ou dados definitivos sobre o papel e a eficácia da quimioterapia adjuvante, vários estudos mostraram um benefício na sobrevida e prevenção da recorrência. Um grande estudo envolvendo 24 pacientes linfonodos positivos tratados com ciclofosfamida, 5-fluorouracil e metotrexato mostrou cinco anos de sobrevida com 80% de eficácia num tempo de 46 meses. Em uma análise retrospectiva da terapêutica do câncer de mama masculino, foi observado que a sobrevida média dos pacientes submetidos à cirurgia era de 33 meses. No entanto, para aqueles pacientes que receberam terapia adjuvante adicional sob a forma de radioterapia, hormonioterapia e quimioterapia, isoladamente ou em combinação, a sobrevida média subiu para 86 meses. Terapia adjuvante foi mais eficaz em grandes dimensões, linfonodos positivos e tumores pouco diferenciados¹². Com altas taxas de positividade para receptores hormonais de estrogênio e progesterona, 81% e 74% respectivamente, a terapia hormonal é eficaz como terapia adjuvante bem como nos casos de metástase^{12,20}.

No tratamento sistêmico a quimioterapia e hormonioterapia são considerados tratamento de primeira e segunda linha respectivamente para a metástase da doença. O protocolo quimioterápico envolve taxanos (docetaxel e paclitaxel), vinorelbina, gencitabina e capecitabina, esses fármacos são utilizados em regimes de mono ou poliquimioterapia, de acordo com a evolução da doença e as taxas de resposta clínica e tumoral¹⁶. Nos casos de doença metastática, primeiramente inicia-se o tratamento hormonal com tamoxifeno, se ocorrer insucesso pela não presença de receptores hormonais, substitui-se por quimioterapia²⁰. Conforme estudos em relação à toxicidade do tamoxifeno verificou-se que homens tinham alguma dificuldade em tolerar esse fármaco e alguns efeitos colaterais como trombose venosa, diminuição da libido, impotência e alterações de humor. Porém, mostrou eficácia de aproximadamente 50% de resposta a neoplasia, sendo considerado a melhor abordagem de primeira linha⁵.

Estudos sobre a utilização de anticorpos monoclonais (herceptin) em pacientes que expressam

ou amplificam o oncogene Her2-neu e também a utilização de terapia hormonal com inibidores e ativadores da aromatase estão em andamento¹⁶.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Anatomicamente, a mama masculina é semelhante a um atraso de uma mama feminina. É constituída principalmente por tecido adiposo e fibroso, sem muitos elementos lobulares. Redução dos níveis de andrógenos em homens mais velhos pode resultar em alguns, proliferação ductal na mama. Devido à raridade do câncer de mama no sexo masculino, a etiologia desta doença não é bem descrita, mas alguns fatores de risco são semelhantes aos observados para o sexo feminino, por exemplo, história familiar, radiação ionizante é um conhecido fator de risco para câncer de mama feminina. Entre os sobreviventes da bomba atômica no Japão, por exemplo, a incidência de câncer de mama feminina aumenta linearmente com a dose e com a idade de exposição²⁵. Esse tipo de câncer pode ser resultado de um desequilíbrio anormal entre estrógenos e andrógenos. O risco é aumentado em pacientes com hérnia inguinal congênita, orquiectomia, orquite, lesão testicular, infertilidade e síndrome de Klinefelter²⁶.

A maioria (99%) do sexo masculino apresenta lesões benignas da mama. Portanto, é particularmente importante que os radiologistas sejam capazes de distinguir lesões suspeitas que necessitem de biópsia²⁷.

A incidência varia muito entre os países. Esse tipo de câncer representa 1,2% dos recém-diagnosticados nos Estados Unidos e cerca de 1% de todos os cânceres de mama na Europa. No entanto, a incidência é muito maior na África sub-saariana, com 15% de todos os cânceres mamários, essa porcentagem relativamente alta é atribuída a possíveis hiperestrogenismo como um resultado de dano hepático de endemias infecciosas. Em um estudo realizado na Coreia a incidência foi de 0,38%, e tem sido relatada como 0,4 - 0,6% de todos os cânceres de mama. É bastante baixo e comparável ao de países ocidentais, apesar da elevada prevalência de infecção pelo vírus da hepatite B nos homens (5,1%), segundo Inquérito Nacional de Saúde e Nutrição na Coreia em 1998. No Japão a neoplasia representou 0,49% do total de casos durante 1975 - 1997 em Osaka. Já na Ásia a incidência é menor que no Ocidente devido a fatores biológicos e / ou ambientais²⁸.

Em geral, os homens com a neoplasia têm uma maior duração dos sintomas do que as mulheres, e o

subsequente atraso no diagnóstico contribui para estágios avançados. O tamanho do tumor e o envolvimento de linfonodo axilar são os mais importantes fatores prognósticos para o sexo masculino e feminino no câncer. Quando pareados em idade e estágio, os homens e as mulheres têm semelhantes prognósticos. É sabido que os homens têm as piores taxas de sobrevivência global em relação às mulheres, mas esta é provavelmente devido à maior idade no momento do diagnóstico, mais avançada fase de apresentação, e maiores taxas de morte por doença comórbida, mas não devido à biologia da doença^{28,29}.

Oitenta e cinco a 91% das neoplasias de mama masculina são receptores-estrógeno positivos e respondem a terapia com tamoxifeno, embora a vantagem de sobrevivência nestes, não é tão evidente como no sexo feminino. Receptor-andrógeno também é expresso em um número significativo (39 a 80%) nos tumores. Hiperprolactinemia é também um importante fator de risco. Pelo menos, um terço de uma série consecutiva de pacientes com câncer de mama masculino teve elevação dos níveis séricos de prolactina, que é também correlacionado com o tamanho do tumor primário. Tratamentos associados à elevação de prolactinas também são significativamente associados ao aumento do risco. Em um estudo retrospectivo, um em cada três homens com câncer de mama tinham receptores-prolactina detectáveis em seus tumores³⁰.

Devido à baixa frequência de câncer de mama masculino, a experiência de oncologistas ou mesmo centros acadêmicos é limitado. Do mesmo modo, grande parte das informações relativas à história natural e gestão da neoplasia foi obtida de estudos com pequeno número de pacientes ou por extrapolação a partir de estudos e experiências com o câncer da mama feminina. Vários comentários recentes sobre o câncer de mama masculino têm sumarizado a epidemiologia, clínica, patologia, genética, marcadores moleculares, e os tratamentos. Estes comentários salientam que embora existam semelhanças entre os sexos femininos e masculinos, existem também distintas diferenças³¹.

REFERÊNCIAS

1. Perkins GH, Middleton LP. Breast cancer in men. *BMJ*. 2003;327:239-40.
2. Weiss JR, Moysich KB, Swede H. Epidemiology of male breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14:20-6.

3. Aydin H., Gökbayir H., Tezcaner T, Zorlutuna Y. Combined surgery for ischemic heart disease and breast cancer in a male: a case report. *Anadolu Kardiyol Derg*, 2006;6:83-4.
4. Sinha S, Hughes RG, Ryley NG. Papillary carcinoma in a male breast cyst: a diagnostic challenge. *Ann R Coll Surg Engl*. 2006;88:1-3.
5. Giordano SH. A Review of the Diagnosis and Management of Male Breast Cancer. *The Oncologist*. 2005;10(7):471-9.
6. Leme LHS, Souza GA. Câncer de Mama em Homens: Aspectos Epidemiológicos, Clínicos e Terapêuticos. *Rev Cienc Med*. 2006; 5(15):391-8.
7. Chodick G, Struewing JP, Ron E, Rutter JL, Iscovich J. Similar prevalence of founder BRCA1 and BRCA2 mutations among Ashkenazi and Non-Ashkenazi men with breast cancer: Evidence from 261 cases in Israel, 1976-1999. *Eur J Med Genet*. 2008; 51(2):141-7.
8. Miolo G, Puppa LD, Santarosa M, Giacomi C, Veronesi A, Bidoli E, et al. Phenotypic features and genetic characterization of male breast. *Bmc Câncer*. 2006;6(156):1-9.
9. Palli D, Falchetti M, Masala G, Lupi R, Sera F, Saieva C, et al. Association between the BRCA2 N372H variant and male breast cancer risk: a population-based case-control study in Tuscany, Central Italy. *BMC Cancer*. 2007;7:170.
10. Diez JO, Cortes M, Domenech C, Pericay J, Brunet C, Alonso & M. Baiget. BRCA2 germ-line mutations in Spanish male breast cancer patients. *Annals of Oncology*, Barcelona, Spain. 2000;11:81-4.
11. Tai YC, Domchek S, Parmigiani G, Chen S. Breast Cancer Risk Among Male BRCA1 and BRCA2 Mutation. *J Natl Cancer Inst*. 2007;99(23):1811-4.
12. Contractor KB, Kaur K, Rodrigues, G, Kulkarni DM, Singhal H. Male breast cancer: is the scenario changing. *World Journal Of Surgical Oncology*. 2008;6(58):1-2.
13. O'Malley CD, Prehn AW, Shema SJ, Glaser SL. Racial/ethnic differences in survival rates in a population-based series of men with breast carcinoma. *Cancer*. 2002;94:2836-43.
14. Crew KD, Neugut AI, Wang X, Jacobson JS, Grann VR, Raptis G, et al. Racial Disparities in Treatment and Survival of Male Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2007;25(9):1089-98.
15. Nahleh Z, Srikantiah R, Safa M, Jazieh AR, Muhleman A, Komrokji R. Male breast cancer in the veteran affairs population: a comparative analysis. *Cancer*. 2007;109:1471-7.
16. Araújo RRF, Filho ASSF, Costa LO, Santos ALG, Galvão EL, Simplicio LM. Câncer de mama em homens: estudo de 13 casos. *Rev Bras Mast*. 2003;13(5):115-21.
17. Giodarno SH, Buzdar AU, Hortobagyl GN. Breast Cancer in Men. *Annals Of Internal Medicine*. 2002;137(8):678-87.
18. Smolin Y, Massie MJ. Male Breast Cancer: A Review of the Literature and a Case Report. *Psychosomatics*. 2002;43:326-30.
19. Gentilini O, Chagas E, Zurrida S, Intra M, Cicco C, Gatti G, et al. Sentinel Lymph Node Biopsy in Male Patients with Early Breast Cancer. *The Oncologist*. 2007;12:512-5.
20. Araújo DB, Gomes NH, Renck DV, Silva RB, Oliveira DS, Vieira FEN. Metástases pulmonares em homem: localização incomum do tumor primário. *J Bras Pneum*. 2006;33(2):234-7.
21. Miranda TCC, Meirelles DSP. Receptores hormonais negativos em carcinoma de mama masculina: relato de caso. *Rev Bras Mast*. 2003;13(1):45-8.
22. Peschos D, Tsanou E, Dallas P, Charalabopoulos K, Kanaris C, Batistatou A. Mucinous breast carcinoma presenting as Paget's disease of the nipple in a man: A case report. *Diagn Pathol*. 2008;3(42):1-4.
23. Rai B, Ghoshal S, Sharma SC. Breast cancer in males: A PGIMER experience. *J Can Res Ther*. 2005;1:31-3.
24. Gu GL, Wang SL, Wei XM, Ren L, Zou FX. Axillary metastasis as the first manifestation of male breast cancer: a case report. *Cases Journal*. 2008;1(285):1-4.
25. Ron E, Ikeda T, Preston DL; Tokuoka, S. Male Breast Cancer Incidence Among Atomic Bomb Survivors. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. 2005; 97:603-5.
26. Erhan Y, Zekioglu O, Erhan Y. Invasive lobular carcinoma of the male breast. *Can J Surg*. 2006;49(5):365-6.
27. Chen L, Chantra PK, Larsen LH, Barton P, Rohitopakarn M, Zhu EQ, et al. Imaging Characteristics of Malignant Lesions of the Male Breast. *Radiographics*. 2006;26(4):993-1006.
28. Park S, Kim JH, Koo J, Park BW, Lee KS. Clinicopathological Characteristics of Male Breast Cancer. *Yonsei Med J*. 2008; 6(49):978-6.
29. Ioka A, Tsukuma H, Ajiki W, Oshima A. Survival of Male Breast Cancer Patients: A Population-Based Study. *Jpn J Clin Oncol*. 2006;11(36):699-703.
30. Arendt LM, Schuler LA. Prolactin Drives Estrogen Receptor- α -Dependent. *The American Journal Of Pathology*. 2008;172(1):194-202.
31. Dimitrov NV, Colucci P, Nagpal S. Some Aspects of the Endocrine Profile and Management of Hormone-Dependent Male Breast Cancer. *The Oncologist*. 2007;7(12):798-807.

Proteção solar, uma questão de saúde pública: avaliação das informações contidas nos rótulos dos protetores solares mais comercializados no Brasil

Sunscreen, a public health issue: assessment of information on the labels of most solar protectors marketed in Brazil

RIALA6/1247

Sônia Ribeiro DORIA^{1*}, Eloisa Nunes ALVES¹, Kátia Mirian. Peixoto MENEZES¹, Therezinha Coelho Barbosa TOMASSINI²

*Endereço para correspondência: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, CEP 21040900, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Tel-(21)-3865-51-28. e-mail: sonia.doria@incqs.fiocruz.br.

¹Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

²Farmanguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Recebido: 04.06.2009 – Aceito para publicação: 22.09.2009

RESUMO

As informações contidas nos rótulos dos protetores solares são fundamentais para a eficácia, segurança e para o controle da qualidade desses produtos. O presente estudo teve como objetivos verificar se as informações contidas nos rótulos dos protetores solares estão de acordo com as normas vigentes e avaliar se elas orientam adequadamente o consumidor quanto à escolha e uso do produto para a efetiva proteção. Utilizando como instrumento de coleta de dados o roteiro de inspeção, elaborado e empregado pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde para análise de rótulos desses produtos, foram verificadas as informações imprescindíveis e por meio de uma análise crítica, consideradas se as mesmas eram suficientemente explícitas e adequadas. O estudo demonstrou que 76% dos produtos analisados não cumpriam os requisitos técnicos estabelecidos pelas normas, deixando de apresentar informações importantes relativas à fabricação, modo e restrições de uso, frases de advertências, indicações específicas do produto e cuidados a serem observados quando de sua utilização. Os dizeres contidos nos rótulos não eram suficientes e nem adequados para orientar o consumidor de modo a obter a proteção solar necessária. Os rótulos dos protetores solares necessitam com urgência de uma revisão criteriosa. A omissão dos requisitos técnicos estabelecidos, além de constituir infração sanitária, acarreta prejuízo para as ações correspondentes de vigilância.

Palavras-chave. protetor solar, rótulo, Vigilância Sanitária, Brasil.

ABSTRACT

The information on the labels of solar protection are key to the effectiveness, safety and the quality control of these products. This study aimed to verify whether the information on the labels of solar protectors are in line with current standards and whether they adequately guide the consumer to choose and use the product for the effective protection. Using as an instrument to collect data from the inspection tour, developed and employed by the National Institute for Control of Quality in Health for analysis of labeling of these products have been verified and the information needed through a critical analysis, as if they were sufficiently explicit and appropriate. The study showed that 76% of the products tested failed to meet the technical requirements set by the rules, leaving to present important information regarding the manufacture, method of use and restrictions, warnings of phrases, specific indications of the product and care to be observed when using it. The words contained in the labels were not sufficient and not adequate to guide the consumer to obtain the necessary sun protection. Labels for sun protection an urgent need for a careful review. The omission of technical requirements established, as well as building health violation, causes damage to the corresponding shares of surveillance.

Key words. sunscreen, label, health surveillance, Brazil.

INTRODUÇÃO

O câncer mais frequente no Brasil é o de pele, considerado atualmente um grave problema de saúde pública. Corresponde a 25% de todos os tumores diagnosticados, sendo responsável por importantes sequelas decorrentes de intervenções cirúrgicas, que geralmente levam a mutilações, e até mesmo a morte, quando não detectados precocemente. Estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) prevêem aproximadamente 120 mil novos casos por ano¹.

O Brasil é um dos países mais ensolarados do mundo, com grande área intertropical. O Sol emite energia na forma de radiação eletromagnética de vários comprimentos de onda, sendo as mais nocivas aquelas na faixa do ultravioleta (200 a 400nm). Esta região está conceitualmente dividida em três faixas:

Ultravioleta C (UV-C): de 200 a 290nm

Ultravioleta B (UV-B): de 290 a 320nm

Ultravioleta A (UV-A): de 320 a 400nm

A UV-C é completamente absorvida pela camada de ozônio da atmosfera, mas com a degradação ambiental parte desta radiação também pode nos atingir. Portanto, a radiação UV que consegue atravessar a atmosfera consiste principalmente em UV-B (cerca de 5%) e UV-A (95% ou mais). Estas porcentagens são aproximações, as quantidades relativas variam com a hora do dia, estações do ano, latitude e muitos outros fatores. A maior densidade da radiação UV é recebida quando o Sol está em seu ponto mais alto no céu, nas 4 horas em torno do zênite solar. Aqui no Brasil, em dias claros de verão, entre 11 e 15 horas. Nessas horas, os raios solares por estarem menos perpendiculares à superfície da Terra, percorrem uma distância menor para atravessarem a atmosfera e, portanto, menor oportunidade de serem absorvidos ou refletidos. Os níveis de UV-B variam significativamente durante o dia, sendo mais suscetíveis aos fatores atmosféricos do que a UV-A².

A exposição à radiação solar, cujos danos são cumulativos, é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de pele, por outro lado, ele é também um dos mais passíveis de prevenção efetiva e de baixo custo. Para a prevenção é necessário evitar a exposição ao sol sem proteção desde os primeiros anos de vida³.

O diagnóstico precoce é muito importante, o auto-exame contribui estrategicamente possibilitando

o reconhecimento de alterações sugestivas da doença como, por exemplo, manchas pruriginosas (que coçam), descamativas ou que sangram; sinais ou pintas que mudam de tamanho, forma ou cor; feridas que não cicatrizam em quatro semanas.

Há dez anos a Sociedade Brasileira de Dermatologia realiza ampla campanha a nível nacional de prevenção e detecção precoce da doença, fornecendo informações para o conhecimento epidemiológico do câncer da pele no Brasil, bem como, subsídios para novas ações preventivas. Dados coletados na última campanha mostram que os brasileiros estão longe de se protegerem adequadamente do sol⁴.

De acordo com as classificações internacionalmente aceitas, as pessoas podem ser agrupadas em seis fototipos de pele (Quadro 1). Estes seis tipos, por sua vez, podem ser reagrupados em três grandes categorias: melano-comprometidos, melano-competentes e melano-protetidos. A susceptibilidade individual aos efeitos agudos e tardios do sol varia consideravelmente com o fototipo de pele (resposta frente à exposição solar) e a história de exposição. Em indivíduos melano-comprometidos, bronzeamento e queimadura ocorrem com uma única exposição e não há bronzeamento sem queimadura. Para indivíduos com pele melano-competente, um bronzeamento significativo pode ser obtido sem queimadura⁵.

Os protetores solares são preparações para uso tópico que reduzem os efeitos deletérios da radiação ultravioleta. Para garantir uma fotoproteção efetiva, o produto deve proteger contra os raios UV-A e UV-B e ser estável química e fotoquimicamente. Com relação ao uso, a efetividade também depende de outros fatores, entre eles, a escolha do produto adequado, a distribuição homogênea sobre a pele, a reaplicação sempre que houver remoção e respeito ao tempo máximo de permanência ao sol que o produto permite.

Para calculá-lo é importante saber quanto tempo conseguimos permanecer ao sol, sem nenhum protetor solar, até aparecer na pele uma leve vermelhidão (eritema) e multiplicar o valor encontrado pelo FPS do produto. Por exemplo, se o tempo máximo de exposição ao sol, sem filtro solar, for de seis minutos e o fator de proteção solar do produto utilizado for quinze, o tempo máximo de exposição será de noventa minutos. A reaplicação do produto não ampliará o tempo de permanência ao sol. Para um tempo maior deve-se utilizar um protetor solar com FPS superior⁶⁻¹¹.

Quadro 1. Classificação dos fototipos de pele (5)

Fototipo	Aparência típica	Resposta ao sol
I	Pele bem clara, olhos azuis, sardas; pele não exposta é branca	Queima fácil e severamente, (queimadura dolorosa), descasca; bronzeia pouco ou nada.
II	Pele clara, louros ou ruivos, olhos azuis ou castanhos; pele não exposta é branca	Em geral, queima fácil e dolorosamente, descasca; bronzeia levemente.
III	Pele branca quando não exposta; geralmente cabelo escuro	Queima moderadamente, e bronzeia
IV	Pele clara ou levemente morena quando não exposta; cabelo e olhos escuros	Queima minimamente e bronzeia fácil e consideravelmente.
V	Pele morena	Raramente queima, bronzeia fácil e substancialmente.
VI	Pele negra	Nunca queima e bronzeia profusamente

Os princípios ativos presentes nas formulações dos protetores solares possuem diferentes mecanismos de ação: os físicos refletem ou dissipam a radiação, os químicos, absorvem a radiação. Os protetores físicos, predominantes nos filtros com alto fator de proteção solar, bloqueiam os raios UV-A e UV-B, mas são menos aceitos pelos usuários por deixarem uma coloração esbranquiçada na pele. Para conferir proteção equivalente sem consequências estéticas ou desconfortáveis, muitos filtros utilizam, em altas concentrações, mistura de substâncias químicas que absorvem a radiação, no entanto, quanto maior a concentração do agente químico, maior o potencial de irritação e sensibilização. Já os produtos para bronzeamento oferecem pouquíssima proteção, pois sua finalidade não é proteger, mas sim bronzear.

A definição do fator de proteção solar (FPS) é feita através de experimentos “in vivo”, em que se determina a Dose Mínima Eritematosa (dose mínima de UV-B necessária para produzir a primeira reação eritematosa), sem levar em conta a proteção anti-UV-A. A radiação UV-B por possuir maior energia (290 a 320 nm) é responsável pelos efeitos agudos com vários graus de queimaduras, modificações sistêmicas e alterações pigmentares, provocando lesões tumorais benignas e malignas. A UV-A, mais prevalente e de menor energia (320 a 400 nm), causa problemas em longo prazo, atingindo mais a derme do que a epiderme, em virtude de sua maior capacidade de

penetração, resultando em foto-envelhecimento cutâneo e podendo provocar também lesões tumorais. A escolha do produto adequado dependerá principalmente do tipo de pele, bem como, do tempo de exposição solar pretendido pelo consumidor.¹²⁻¹⁵

Com relação à legislação brasileira os filtros solares são classificados como cosméticos, submetidos ao sistema de Vigilância Sanitária, lei 6360/1976, sendo regulamentados pelos Decretos 79.094/1977 e 83.239/1979 e complementados por Resoluções da Diretoria Colegiada (RDC), através de regulamentos técnicos, harmonizados no âmbito do Mercosul, que adotam definições, metodologias analíticas para a determinação do FPS, resistência à água, estabelecem listas das substâncias permitidas e proibidas, suas concentrações, critérios e procedimentos para o registro de produtos, dizeres obrigatórios que devem figurar nos rótulos¹⁶⁻²².

Os fotoprotetores estão incluídos na lista de cosméticos Grau 2, produtos com risco potencial, possuindo indicações específicas, cujas características exigem comprovação de segurança e eficácia, bem como informações, cuidados, modo e restrições de uso.

A Vigilância Sanitária é compreendida como parte da Saúde Pública dentro do Sistema Único de Saúde de natureza eminentemente preventiva, fundamentada no conceito de risco. Sua prática está diretamente relacionada às atividades de vigilância e monitoramento, identificando

condições que representem risco, com objetivo de proteção à saúde da população.

Nesse contexto, o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), unidade da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) que atua com a Vigilância Sanitária como referência nacional para as questões científicas e tecnológicas relativas ao controle da qualidade de produtos, ambientes e serviços, vem realizando análises para verificar a segurança, como também, a eficácia dos produtos.

O rótulo é parte integrante do produto, sendo um instrumento fundamental de informação para o consumidor, como também, para o sistema de Vigilância Sanitária, devendo conter informações sobre a fabricação, origem, modo de uso e atributos dos produtos de forma clara e objetiva, seguindo as exigências das normas^{23,24}.

Desta forma, a pesquisa objetivou avaliar se os dizeres contidos nas embalagens dos protetores solares estão em conformidade com as normas vigentes e se eles orientam adequadamente o consumidor quanto à escolha e uso do produto para obter uma efetiva proteção solar.

Como resultado, espera-se que o levantamento destes dados sirva de subsídios para discussões e contribuam para alertar as autoridades competentes para a necessidade de rever a legislação atual.

MATERIAL E MÉTODOS

A amostra estudada foi escolhida por conveniência, com tamanho amostral considerando uma estimativa de 95% de confiança. Para tanto, foram selecionadas 38 amostras de protetores solares de 13 fabricantes diferentes, os mais comercializados no Brasil, segundo a Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos. Essas amostras foram coletadas em um estabelecimento comercial, pertencente a uma grande rede de drogarias, no Estado do Rio de Janeiro. Os produtos foram selecionados com FPS variando de 2 a 100 sendo: 10 (dez) produtos com FPS 30, 6 (seis) com FPS 15, 5 (cinco) com FPS 60, 4 (quatro) com FPS 20, 4 (quatro) com FPS 4, 2 (dois) com FPS 8. Com FPS 2, 6, 25, 40, 45, 50 e 100 foi selecionado apenas 1 (um) produto por fator de proteção solar.

Este estudo foi realizado em duas etapas: uma qualitativa e outra quantitativa

Qualitativa. Foi realizada uma análise crítica com o objetivo de avaliar, baseado na literatura, se nos dizeres das embalagens dos 38 produtos estão contidas as informações

básicas necessárias quanto à escolha do produto e sua utilização para uma efetiva proteção. Os parâmetros analisados foram: fator de proteção solar recomendado para cada fototipo de pele, tempo máximo de exposição solar que o produto oferece, quantidade do produto que deverá ser usado, as regiões do corpo onde também deve ser aplicado o produto⁸⁻¹².

Quantitativa. Para verificar se as informações contidas nos rótulos dos protetores solares estão de acordo com a legislação vigente foram avaliados 33 requisitos técnicos nos rótulos dos 38 produtos. Como instrumento de coleta de dados foi utilizado o roteiro de inspeção para análise de rotulagem, elaborado e empregado pelo INCQS, com base nas normas, (Lei 6360/1976; Decretos 79.094/1977 e 83.239/1979 e RDC nº 211/2005, nº 237/2005, nº 48/2006 e nº 47/2006). Os dados obtidos foram processados e analisados pelo programa estatístico SPSS, versão 12.0. O teste estatístico empregado foi o X^2 ($p > 0,05$)¹⁶⁻²².

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise qualitativa

Verificou-se a insuficiência de informações necessárias para a escolha e uso, em todos os produtos analisados. Sugere-se, em adição às recomendações exigidas pelas normas, a utilização de embalagem secundária (caixa), contendo uma tabela com todos os fototipos de pele e os respectivos fatores de proteção solar. Estes dados permitirão ao consumidor classificar o seu tipo de pele e fazer a escolha do produto adequado com maior segurança. O fabricante deve declarar o tempo máximo de proteção solar que o produto oferece ao consumidor, incluindo também a descrição quantitativa dos componentes ativos na formulação, facilitando assim, o monitoramento dos produtos postos ao consumo pelos órgãos de Vigilância Sanitária.

O produto deve conter instruções de uso com tamanho de letra que possibilite a fácil leitura, redigido de forma clara e objetiva, descrevendo a quantidade do produto que deverá ser usado para garantir a proteção e as regiões do corpo onde devem também ser aplicado como, por exemplo, orelhas, pescoço, nuca, nariz, pés, mão, antebraços, couro cabeludo e lábios (dependendo do tipo de produto). Estes locais mais expostos ao sol são os mais pré-dispostos ao desenvolvimento do câncer de pele. Deverá conter também a recomendação para reaplicar o produto, toda a vez que houver remoção, informando que a reaplicação não ampliará o tempo máximo de exposição solar.

Análise quantitativa

Dos 33 requisitos avaliados nos rótulos dos 38 protetores solares. Verificou-se que 76,3% não estavam em conformidade com a legislação. Em 63,2% não constava a data de fabricação do produto, dado importante para a determinação do cumprimento das normas vigentes, visto que o produto está sujeito às normas pertinentes a data em que foi fabricado. O nome do responsável técnico, o número de sua inscrição e a sigla da autarquia profissional não estavam presentes em 27% dos produtos analisados. Este profissional é habilitado junto à autoridade sanitária para a atividade que a empresa realiza, sendo responsável pela fabricação dos produtos sob sua direção técnica e elaboração de relatórios aos órgãos de vigilância. Os esclarecimentos obrigatórios, como as frases de orientação, advertência e indicação específica do produto não constavam em 36,8%. Foram encontrados produtos com até 4 diferentes não conformidades. Apenas 23,7% estavam em conformidade.

CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho indicam que 76% dos rótulos dos produtos analisados estavam em desacordo com a legislação vigente, deixando de apresentar importantes requisitos técnicos e que as informações referentes à escolha e uso do produto que foram analisadas não são suficientes e nem adequadas para orientar o consumidor de modo a obter a proteção solar necessária.

AGRADECIMENTOS

A Farmacêutica Layla Maria Correa Oliveira por ter disponibilizado os protetores solares e o estabelecimento comercial, possibilitando a realização deste estudo. Ao Professor Armando Meyer pela análise de dados e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo.

REFERÊNCIAS

1. Radiação Solar: exposição excessiva. Instituto Nacional do Câncer - INCA [acesso em 26/09/2008]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo-view.asp?id=21>
2. Protetor Solar: Resumo da análise. Instituto Nacional de Metrologia - INMETRO [acesso em 02/08/2006]. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/protosolar.html>
3. Bakos L.et al. Melanoma hereditario: prevalência de fatores de risco em um grupo de pacientes no Sul do Brasil, *An Bras Dermatol*. 2004;79(1):53-60.
4. Campanha Nacional do Câncer de pele: contra o câncer de pele. Sociedade Brasileira de Dermatologia. [acesso em: 05.11.2008]. Disponível em: <http://www.sbd.org.br/publico/cancer/campanha.aspx>.
5. The International Commission on Non-ionizing Radiation Protection. Guidelines on limits of exposure to ultraviolet radiation of wavelengths between 180nm and 400nm (incoherent optical radiation), *Health Physics*. 2004;87(2):171-86.
6. Serpone N, Salinaro A, Emeline AV, Horikoshi S, Hidaka H and Zhao J. An in vitro systematic spectroscopic examination of the photostabilities of a random set of commercial sunscreen lotions and their chemical UVB-UVA active agents, *Photochem Photobiol Sci*. 2002;(1):970-81.
7. Pattanaargson S and Limphong P. Stability of octyl methoxycinnamate and identification of its photo-degradation product, *Int J Cosmetic Sci*. 2001;23:153-60.
8. Kimrough DR. The photochemistry of sunscreens. *J Chem Educ*.1997;74(1):51-3.
9. Autier P.et.al. Quantity of sunscreen used by European students. *Br J Dermatol*. 2001;144:288-91.
10. Azurdia RM.et.al. Sunscreen application by photosensitive patients is inadequate for protection. *Br J Dermatol*. 1999;140:255-8.
11. Szepietowski JC.et.al. Application of sunscreen preparations among Young Polish people. *J Cosmet Dermatol*. 2004: 369-72.
12. Gasparro PF, Mitchnic M and Frank JN. A review of sunscreen safety and efficacy, *Photochem Photobiol*. 1998;3(68):243-56.
13. Shaath NA, Fares HM. and Klein K. Photodegradation of sunscreens chemical: solvent considerations, *Cosmet Toil*. 1990;105:41-4.
14. Maes D, Marenus K and Smith WP. New advances in photoprotection, *Cosmet Toil*. 1990;105(12):50-2.
15. Honeyman JM. VI Regional Conference of IFSC, *Cosmet Toil*. 1989;1:18-21.
16. Brasil. Congresso Nacional. Lei nº 6360 de 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos, e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 24 de set. 1976.
17. Brasil. Presidência da República. Decreto nº 79.094, de 05 de janeiro de 1977. Regulamenta a Lei nº 6.360 de 23 de setembro de 1976, que submete a sistema de vigilância sanitária os medicamentos, insumos farmacêuticos, drogas, correlatos, cosméticos, produtos de higiene, saneantes e outros. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 07 jan. 1977.
18. Brasil. Presidência da República. Decreto nº 83.239 de 06 de março 1979. Altera o Decreto nº 79.094, de 5 de janeiro de 1977, que regulamenta a Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 07 mar. de 1979.
19. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 237 de 22 de agosto de 2002. Aprova Regulamento Técnico Sobre Protetores Solares em Cosméticos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 23 ago. 2002.
20. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 47 de 16 de março de 2006. Aprova o Regulamento Técnico "Lista de filtros ultravioletas permitidos para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes". Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 17 mar. 2006.

21. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 211 de 14 de julho de 2005. Ficam estabelecidas a Definição e a Classificação de Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes, conforme Anexos I e II desta Resolução. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 18 de jul. 2005.
22. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2006. Aprova o Regulamento Técnico "Lista de substâncias que não podem ser utilizadas em produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 17 de mar. 2006.
23. Costa EA, Rozenfeld S. Constituição da Vigilância Sanitária no Brasil. In: Rosenfeld, S (org.) Fundamentos da Vigilância Sanitária. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ. 2000, p.15-40.
24. Buss PM. Promoção da Saúde e qualidade de vida, Cien Saúde Colet. 2000;5(1): 163-77.
25. Pesquisa Cooperativa 2008: Brasileiro consome pouco protetor solar. Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos.[acesso em: 15.10.2008]. Disponível em:<http://www.abihpec.org.Br/noticias-texto.php?id=276>

Activity of nematophagous fungi *Pochonia chlamydosporia* and *Paecilomyces lilacinus* on *Dipylidium caninum* egg capsules

Atividade dos fungos nematófagos *Pochonia chlamydosporia* e *Paecilomyces lilacinus* sobre cápsulas de ovos de *Dipylidium caninum*

RIALA6/1248

Juliana Milani ARAUJO^{1*}, Fabio Ribeiro BRAGA¹, Jackson Victor de ARAÚJO¹, Rogério Oliva CARVALHO¹

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

¹Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil

Recebido: 03.09.2008 – Aceito para publicação: 07.12. 2009

ABSTRACT

Nematophagous fungi are potential agents to be employed for biological control of helminthes. The ovicidal activity of the nematophagous fungi *Pochonia chlamydosporia* (isolates VC1 and VC4) and *Paecilomyces lilacinus* on egg capsules of *Dipylidium caninum*, a cestoda parasite of dogs, cats and men, was evaluated on Petri dishes cultures. One thousand of *D. caninum* egg capsules were placed onto Petri dishes containing 2% water-agar medium and grown fungal isolates, and also onto dishes without fungi, as control. The ovicidal activity of these fungi was evaluated after 5, 10 and 15 days. After the beginning of the interaction and at the end of the experiment, fungi *P. chlamydosporia* and *Paecilomyces lilacinus* demonstrated ovicidal activity ($p < 0.05$) when compared to the control. *Pochonia chlamydosporia* showed ovicidal activity of 49.0% (isolate VC1) and 41.9% (isolate VC4), while ovicidal activity of *Paecilomyces lilacinus* was 42.7% after fifteen days of interaction. The fungi *Pochonia chlamydosporia* and *Paecilomyces lilacinus* showed ovicidal activity on *Dipylidium caninum* egg capsules, thus it could be used as potential biological controllers of this cestoda.

Key words. Nematophagous fungi, *Pochonia chlamydosporia*, *Paecilomyces lilacinus*, *Dipylidium caninum*, Biological control.

RESUMO

Os fungos nematófagos são potenciais agentes empregados no controle biológico de helmintos. A atividade ovicida dos fungos nematófagos *Pochonia chlamydosporia* (isolados VC1 e VC4) e *Paecilomyces lilacinus* sobre cápsulas ovíferas de *Dipylidium caninum*, foi avaliada em culturas em placas de Petri. Mil cápsulas ovíferas de *D. caninum* foram colocadas em placas de Petri contendo 2% do meio ágar-água e isolados fúngicos cultivados e também em placas sem fungo, como controle. A atividade ovicida desses fungos foi avaliada após cinco, 10 e 15 dias. Após o começo da interação e ao final do experimento, os fungos *P. chlamydosporia* e *Paecilomyces lilacinus* demonstraram atividade ovicida ($p < 0,005$) quando comparados ao controle. *Pochonia chlamydosporia* demonstrou atividade ovicida de 49.0% (isolado VC1) e 41.9% (isolado VC4), e a atividade ovicida do *Paecilomyces lilacinus* foi de 42.7% após 15 dias de interação. Os fungos *Pochonia chlamydosporia* e *Paecilomyces lilacinus* apresentaram atividade ovicida sobre cápsulas ovíferas de *Dipylidium caninum*, o que indica a viabilidade de efetuar o seu emprego como potencial controlador biológico desse cestoda.

Palavras chaves. fungos nematófagos, *Pochonia chlamydosporia*, *Paecilomyces lilacinus*, *Dipylidium caninum*, Controle biológico.

According to the World Health Organization (WHO), about 2 billion people infected by zoonoses live in underdeveloped countries. 300 million people are seriously ill, and 50% of them are children at school age. In developing countries, verminosis represents one of the main causes of epilepsy in children¹. Lack of sanitation is one of the main reasons for the increase in the occurrence of zoonoses which endemically attack the Third World. Helminths are endemic cosmopolitan parasites whose permanence in the contaminated environment depends on several factors that allow their evolution cycle to develop. *Dipylidium caninum* is among those parasites. It is a cestoda that belongs to the family Dilepididae, a gastrointestinal parasite of canidae and felidae, which sometimes parasites human beings, especially children at school age^{1,2}.

According to Pereira et al.¹ close contact with animals that live in endemic areas and unhygienic conditions, as regards both human and animal health are also great predisponent factors for the occurrence of zoonoses. The contamination of the definitive host (dogs, cats and, accidentally, humans) is caused by the ingestion of infected intermediate hosts (fleas and lice)³.

The fungus species *Pochonia chlamydosporia* and *Paecilomyces lilacinus* are considered ovicides and have proven efficiency on eggs of gastrointestinal parasite helminths in domestic animals and human beings^{4,5}. Therefore, the use of these fungi might help in the control of egg capsules and eggs of *D. caninum* that are present in the environment.

The objective of this study was to evaluate the activity of nematophagous fungi of the species *P. chlamydosporia* and *P. lilacinus* on egg capsules of *D. caninum*.

The fungi *P. chlamydosporia* (VC1 and VC4) and *P. lilacinus* were stored in test tubes at 4°C containing 2% corn-meal-agar and maintained, in the dark, for 10 days. After their growth, new culture discs (4mm in diameter) were transferred to Petri dishes (9cm in diameter) containing 20mL of 2% water-agar (2%WA) for 10 days.

The egg capsules of *D. caninum* were recovered from the dissection of proglottids of an adult individual and morphologically evaluated as to their integrity in optical microscope with 10x objective lens.

The egg capsules were placed on the surface of Petri dishes (9cm in diameter) containing the 2%WA medium, with fungus free fungal isolates grown for 10

days, as control. Twenty-five replications were performed for each group. In the treatments, each dish contained one thousand egg capsules of *D. caninum* with only one of the fungal isolates. In the intervals of 5, 10 and 15 days, approximately one hundred egg capsules were removed from each dish containing the fungus and from those containing the control (fungus free), according to the technique described by Araújo et al.⁶. They were evaluated with 40x objective lens, according to the parameters established by Lysek et al.⁷: type 1, lytic effect without morphological damage to the eggshell, with hyphae adhered to the eggshell; type 2, lytic effect with morphological change of embryo and eggshell, without hyphal penetration through eggshell; and type 3, lytic effect with morphological change of embryo and eggshell, besides hyphal penetration and internal egg colonization. The data of the studied interval were submitted to the non-parametric Friedman test, with 5% of probability.

Table 1 shows the percentage results of types 1, 2 and 3 effects presented by the fungi *P. chlamydosporia* (VC1 and VC4) and *P. lilacinus*, over the experimental assay of 5, 10 and 15 days. The isolate VC1 presented the following percentages for type 1 effect: (23.0%, 5% and 10.7%); type 2 effect (19.6%, 32.9% and 32.3%); and for type 3 effect (19.6%, 44.2% and 49.2%) after 5, 10 and 15 days, respectively. The isolate VC4 presented the following percentage results (18.4%, 15.7% and 11.5%) for type 1 effect; (28.4%, 30.3% and 35%) for type 2 effect; and (20%, 31.5% and 41.9%) for type 3 effect, over the days studied. According to Lysek et al.⁷, the type 3 effect classifies the fungus as a potential ovicide. In the present work, the isolates VC1 and VC4 presented this type of effect, but with no difference ($P > 0.05$) between them. Similarly, the fungus *P. lilacinus* presented the percentages (9.9%, 9.4% and 6.4%) for type 1 effect; (11.7%, 10.4% and 9.9%) for type 2 effect, and (28.4%, 37.1% and 42.7%) for type 3 effect after 5, 10 and 15 days, respectively. Therefore, it was also considered an ovicidal fungus^{5,6,8}.

No difference ($P > 0.05$) was observed between fungi *P. chlamydosporia* and *P. lilacinus* after their ovicidal activity was compared. It suggests that both fungi could be used in the biological control of the capsules of *D. caninum*, since they presented very similar percentage results for type 3 effect^{9,10,11}.

The results of the present study can be compared to the works of Araújo et al.⁹ and Braga et al.^{4,10,11} on eggs of *Ascaris*, *Fasciola* and *Schistosoma*, corroborating the activity potential of these isolates on eggs of several

Table 1. Percentages and standard deviations of the ovicidal activity (types 1, 2 and 3 effects) of the fungi *Pochonia chlamydosporia* (VC1 and VC4) and *Paecilomyces lilacinus* and the fungus-free control group on the egg capsules of *Dipylidium caninum* after 5, 10 and 15 days of interaction.

Isolates	Effect after 5 days		
	Type 1 effect*	Type 2 effect **	Type 3 effect ***
VC1	23.0 ^B ± 33.5	19.6 ^{AB} ± 23.7	19.6 ^A ± 25.6
VC4	18.4 ^B ± 24.1	28.4 ^A ± 23.8	20.0 ^A ± 26.6
P. lilacinus	9.9 ^B ± 10.6	11.7 ^B ± 13.7	28.4 ^A ± 18.2
Control	0 ^C ± 0	0 ^C ± 0	0 ^B ± 0
Isolates	Effect after 10 days		
	Type 1 effect *	Type 2 effect **	Type 3 effect ***
VC 1	5.0 ^B ± 16.5	32.9 ^A ± 36.6	44.2 ^A ± 41.2
VC 4	15.7 ^C ± 22.8	30.3 ^A ± 26.6	31.5 ^A ± 32.0
P. lilacinus	9.4 ^{BC} ± 12.8	10.4 ^B ± 12.9	37.1 ^A ± 19.5
Control	0 ^D ± 0	0 ^C ± 0	0 ^B ± 0
Isolates	Effect after 15 days		
	Type 1 effect *	Type 2 effect **	Type 3 effect ***
VC1	10.7 ^B ± 20.3	32.3 ^A ± 26.0	49.2 ^A ± 36.5
VC4	11.5 ^B ± 21.4	35.0 ^A ± 26.6	41.9 ^A ± 36.4
P. lilacinus	6.4 ^B ± 9.5	9.9 ^B ± 12.8	42.7 ^A ± 32.8
Control	0 ^C ± 0	0 ^C ± 0	0 ^B ± 0

Percentages followed by the same capital letter in the same column do not differ statistically ($P > 0.05$) – Friedman test. *Physiological and biochemical effect, without morphological damage to the egg shell, where the hyphae are observed to be adhered to the shell. **Lytic effect with morphological change of the egg shell and the embryo, without hyphal penetration through the shell. ***Lytic effect with morphological change of the shell and the embryo, besides hyphal penetration and internal colonization of the egg.

helminth genera. These fungi, therefore, can be classified as ovicides.

The activity capacity of the fungus *P. lilacinus* was demonstrated in the works of Araújo et al.⁶ on eggs of *Toxocara canis*, for types 1, 2 and 3 effects, respectively. In the work of Braga et al. (2008c), the authors recorded that this fungus presented percentages of type 3 effect of 19%, 20% and 23% on eggs of *Moniezia* sp after 5, 10 and 15 days, respectively.

Pereira et al.¹ carried out a study in 2005 with children ranging in age from 4 months to 14 years old in the city of Campos dos Goytacazes, in the state of Rio de Janeiro. The authors observed egg capsules of *D. caninum* in the feces of children at school age and believe the children were probably contaminated through the contact with local companion animals, thus ingesting fleas from such animals. Therefore, since the source of infection of *D. caninum* for the intermediate host (fleas) is an environment contaminated with feces, the use of the

fungi *P. chlamydosporia* (VC1 and VC4) and *P. lilacinus* is suggested for the biological control of this cestoda because its action could be concentrated in the fecal environment.

The fungi *P. chlamydosporia* and *P. lilacinus* presented ovicidal activity on the egg capsules of *Dipylidium caninum* and could be used as potential biological controllers of this cestoda.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank FAPEMIG, CAPES / FINEP and CNPq for financial support.

REFERENCES

1. Pereira, MAV, Castro, VMA, Gonçalves, EM, Vita, LM. Comparação de dois testes coproparasitológicos, paratest® e sedimentação/flutuação de ovos, no diagnóstico de parasitoses em crianças de comunidade de baixa renda, de campos dos goytacazes, RJ. *Laes'Haes* 2007; 0:1-9.
2. Urquhart, GM, Armour, J, Duncan, JL, Dunn, AM, Jennings, FW. *Parasitologia Veterinária*, 2nd ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro; 1998.
3. Neves, DP, Melo, AL, Linardi, PM, Vitor, RWA. *Parasitologia Humana*, 11nd ed. Atheneu, São Paulo; 2005.
4. Braga, FR, Araújo, JV, Campos, AK, Carvalho, RO, Silva, AR, Tavela, AO, Maciel, AS. Observação *in vitro* da ação dos isolados fúngicos *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Verticillium chlamydosporium* sobre ovos de *Ascaris lumbricoides* (Lineu, 1758). *Rev Soc Bras Med Tropic* 2007; 40:356-8.
5. Braga, FR, Araújo, JV, Araujo, JM, Carvalho, RO, Silva, AR, Campos, AK, Tavela, AO. Ovicidal activity of *Paecilomyces lilacinus* on *Moniezia* sp. eggs. *J Helmint* 2008c; 10:1-3.
6. Araújo, JV, Santos, MA, Ferraz, S. Efeito ovicida de fungos nematófagos sobre ovos embrionados de *Toxocara canis*. *Arq Bras Med Vet Zootec* 1995; 47:32-42.
7. Lysek, H, Fassatióvá, O, Pineda, NC, Hernández, NL. Ovicidal fungi in soils of Cuba. *Folia Parasitol* 1982; 29:265-70.
8. Morgan-Jones, G, Rodríguez-Kábana, R. Phytonematode pathology: Fungal modes of action. A perspective. *Nematropica* 1985; 15:107-14.
9. Araújo, JV, Braga, FR, Silva, AR, Araujo, JM, Tavela, AO. *In vitro* evaluation of the effect of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium sinense* and *Pochonia chlamydosporia* on *Ascaris suum* eggs. *Parasitol Res* 2008; 102:787-90.
10. Braga FR, Araújo JV, Campos AK, Araújo JM, Silva AR, Carvalho RO, Tavela AO. *In vitro* evaluation of the action of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium sinense* and *Pochonia chlamydosporia* on *Fasciola hepatica* eggs. *World J Microbiol Biotech* 2008a; 24:1559-64.
11. Braga, FR, Araújo, JV, Campos, AK, Araujo, JM, Carvalho, RO, Silva, AR, Corrêa, DN, Pereira, CAJ. *In vitro* evaluation of the effect of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium sinense* and *Pochonia chlamydosporia* on *Schistosoma mansoni* eggs. *World J Microbiol Biotech* 2008b; 25:2713-6.

Investigação da genotoxicidade de larvicidas biológicos e sintéticos utilizados para o controle de *Aedes aegypti*

Melo, MEB. **Genotoxicity investigation of biologic and synthetic larvicide utilized for the control of *Aedes aegypti***. Recife, Pernambuco, 2009 [Tese de Doutorado – Área de concentração: Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal de Pernambuco - UFPE]. Orientadoras: Profs. Maria Teresa Janssen de Almeida Catanho e Lêda Regis.

A dengue é atualmente considerada a mais importante arbovirose que afeta o homem. O agravamento desta situação epidemiológica tem acarretado um aumento expressivo no uso de inseticidas organofosforados no combate ao vetor, principalmente o temefós, que é amplamente e sistematicamente aplicado em ambientes urbanos em reservatórios de água, até para o consumo humano. Este projeto propôs investigar efeito genotóxico (clastogênico) em células de mamíferos, induzido pela exposição ao temefós (grau técnico 95,5%), e ao biolarvicida *Bacillus thuringiensis israelenses* (*Bti*) - IPS 82, ambos empregados no controle do *Aedes aegypti*. Na avaliação genotóxica foram utilizadas células da medula óssea de camundongos albinos *Swiss Webster* de ambos os sexos, empregando-se os testes de metáfase e de micronúcleos para detecção dos danos cromossômicos: aberrações cromossômicas e micronúcleos. Os camundongos foram tratados com temefós (grau técnico 95,5%) nas concentrações de 27,75; 55,5 e 111 mg/kg ou com água destilada 10 ml/kg, via gavagem, como controle negativo ou com Ciclofosfamida a 25 mg/kg, via i.p., como controle positivo por 24, 48 e 72h, em dose única ou em 9 doses repetidas (1 dose/semana). Outros grupos foram tratados com *Bti* nas doses de 204 e 122,4 UFC (Unidades Formadoras de Colônias) ou água destilada (200 µl) como controle negativo, via gavagem, por 24 e 48h. Os resultados observados confirmaram a ação genotóxica induzida pelo inseticida temefós em camundongos de ambos os sexos, com a formação de micronúcleo em eritrócitos policromáticos (PCE MN), em todas as concentrações testadas 24h após o tratamento único. Na concentração de 111,00 mg/kg induziu PCE MN também após 48 e 72h em dose única e após tratamento com 9 doses. O temefós induziu também aberrações cromossômicas nas células em metáfases, em todas as concentrações testadas, 24h após tratamento único, e na concentração de 111,00 mg/kg, também após 48 e 72h de tratamento único. A Ciclofosfamida padronizada como controle positivo, para detecção de genotoxicidade, assegurou a confiabilidade dos experimentos realizados nos padrões estabelecidos. O *Bti*, através dos experimentos realizados, não induziu formação de micronúcleos, portanto, não foi considerado como um agente mutagênico e/ou genotóxico. A citotoxicidade do *Bti* também foi avaliada em diferentes doses e tempos de permanência em ambos o sexo, não apresentando diferença estatisticamente significativa ao nível de 5% em comparação com o controle negativo. Esta investigação veio comprovar a preocupação pelos potenciais riscos que o uso sistemático, constante ou mesmo esporádico de inseticidas de síntese em ambiente antropico, na agricultura e em programas de controles de vetores, pode induzir ao homem ao nível mutagênico e/ou genotóxico. É imprescindível, para o uso seguro para a saúde e o meio ambiente, a investigação do potencial mutagênico e/ou genotóxico de produtos utilizados para o controle de insetos.

Tese disponível: www.bdttd.ufpe.br; www.bdttd.ibict.br/bdttd

E-mail: melomeb@cpqam.fiocruz.br

INSTRUÇÃO AOS AUTORES

A Revista do Instituto Adolfo Lutz (RIAL) iniciada em 1941 é uma publicação trimestral tem como objetivo publicar e divulgar resultados de investigações científicas básicas, tecnológicas, laboratoriais e aplicadas, relacionadas às ações de promoção, prevenção de agravos e doenças, abrangendo as diversas áreas de interesse em saúde pública.

Publica artigos de pesquisa original, artigos de revisão, comunicações breves, notas científicas, relatos de casos, resumos de teses e dissertações.

1. **MISSÃO:** Editado nos formatos impresso e eletrônico, a RIAL tem o objetivo de divulgar textos científicos relacionados às diversas áreas de atividades laboratoriais em saúde pública, de maneira rápida e precisa. Além de disseminar informações entre os profissionais das áreas biomédicas e bromatológicas, a RIAL propõe o incentivo à produção de artigos científicos desenvolvidos na prática da investigação científica nas áreas de vigilância epidemiológica e sanitária. Nesse sentido, proporciona a atualização e, conseqüentemente, o aprimoramento dos profissionais que atuam na prevenção e controle de agravos à saúde no âmbito nacional e internacional.
2. **ARBITRAGEM:** Os manuscritos submetidos à publicação na RIAL devem atender às instruções aos autores, que seguem as diretrizes dos Requisitos Uniformes para Manuscritos Apresentados a Periódicos Biomédicos, editados pela Comissão Internacional de Editores de Revistas Médicas (Committee of Medical Journals Editors – Grupo de Vancouver), disponíveis em: <http://www.icmje.org/>.
3. **PROCESSO DE REVISÃO:** Todos os textos publicados na RIAL passam por processo de revisão por especialistas. Os editores fazem uma revisão inicial para avaliar se os autores atenderam aos padrões da RIAL, bem como ao atendimento das normas para o envio dos originais. Em seguida o artigo é encaminhado a dois pareceristas da área pertinente, sempre de instituições distintas daquela de origem do artigo, e cegos quanto à identidade e vínculo institucional dos autores. 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 pareceristas.
4. **TIPOS DE ARTIGO:** A Revista do Instituto Adolfo Lutz (RIAL) recebe textos científicos nas seguintes modalidades:
5. **ARTIGOS ORIGINAIS:** Apresentam resultados originais provenientes de estudos sobre quaisquer aspectos da prevenção e controle de agravos e de promoção à saúde, desde que no escopo da saúde pública. Esses artigos devem ser baseados em novos dados ou perspectivas relevantes para a saúde pública.

Destinados à divulgação de resultados de pesquisa original inédita, que possam ser replicados e/ou generalizados. Devem ter no máximo 20 laudas impressas, incluindo 20 ilustrações (tabelas, figuras, gráficos e fotos) e 40 referências. Resumo em Português e em Inglês (Abstract), com no máximo 200 palavras, e entre 3 e 6 palavras-chave (key words). Pode apresentar também, um Resumo Expandido em inglês e neste caso pode ter no máximo 22 laudas impressas.

6. **REVISÕES:** Elaboradas por especialista convidado pelo corpo editorial. Deve constar de uma avaliação crítica sistematizada da literatura sobre assunto relevante à saúde pública. Devem ser descritos os procedimentos adotados, esclarecendo a delimitação e limites do tema. Extensão máxima: 15 laudas impressas, incluindo Resumo (Abstract) de até 200 palavras; entre 3 e 6 palavras-chave (key words); 30 ilustrações (tabelas, figuras, gráficos e fotos); e 80 referências.
7. **COMUNICAÇÕES BREVES:** São artigos sucintos destinados à rápida divulgação de eventos significativos no campo da pesquisa. No máximo 10 laudas impressas, incluindo Resumo de até 200 palavras; entre 3 e 6 palavras-chave; 2 ilustrações (tabelas, figuras, gráficos e fotos); e 15 referências.
8. **NOTAS CIENTÍFICAS:** São textos que têm por objetivo apresentar ocorrências relevantes de uma pesquisa experimental que justifique a publicação de resultados parciais desta pesquisa para uma rápida divulgação. No máximo 06 laudas impressas, incluindo Resumo de até 200 palavras; entre 3 e 6 palavras-chave; 2 ilustrações (tabelas, figuras, gráficos e fotos); e 10 referências.
9. **RELATOS DE CASOS:** 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. Inclui novas técnicas, terapias, diagnóstico, patologias, materiais e soluções inovadoras para problemas especiais, fenômenos anatômicos e fisiológicos. No máximo 03 laudas impressas incluindo Resumo de até 200 palavras; entre 3 e 6 palavras-chave; 2 ilustrações (tabelas, figuras, gráficos e fotos); e 10 referências.
10. **RESUMOS DE TESES E DISSERTAÇÕES:** Serão aceitos resumos de teses e dissertações até um ano após a defesa. Devem conter os nomes do autor e do orientador, título do trabalho (em Português e Inglês), nome da instituição em que foi apresentado e ano de defesa. No máximo 400 palavras e entre 3 e 6 palavras-chave.

11. **APRESENTAÇÃO DOS MANUSCRITOS:** Ao manuscrito deverá ser anexada uma carta de apresentação, assinada por todos os autores, dirigida ao Corpo Editorial da RIAL. Nela deverão constar as seguintes informações: o trabalho não foi publicado, parcial ou integralmente, em outro periódico; nenhum autor tem vínculos comerciais que possam representar conflito de interesses com o trabalho desenvolvido; todos os autores participaram da elaboração do seu conteúdo (elaboração e execução, redação ou revisão crítica, aprovação da versão final).

Os critérios éticos da pesquisa devem ser respeitados. Nesse sentido, os autores devem explicitar em MÉTODOS que a pesquisa foi concluída de acordo com os padrões exigidos pela Declaração de Helsink e aprovada por comissão de ética reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), vinculada ao Conselho Nacional de Saúde (CNS), bem como registro dos estudos de ensaios clínicos em base de dados, conforme recomendação aos editores da Lilacs e Scielo, disponível em: <http://bvsmodelo.bvsalud.org/site/lilacs/homepage.htm>. O nome da base de dados, sigla e/ou número do ensaio clínico deverão ser colocados ao final do RESUMO. Assim como, os ensaios envolvendo animais deverão atender a Lei Federal 9605 contra crimes ambientais, a Lei Federal 6638-1976 e a Lei 11.794-2008 que normatiza a utilização de animais em pesquisas científicas – conhecida como Lei Arouca.

O texto deverá ser redigido em português ou em inglês (Resumos Expandidos exclusivamente em inglês), com entrelinhamento duplo. O manuscrito deve ser encaminhando em formato eletrônico (e-mail, disquete ou CD-ROM) ou impresso (folha A4), aos cuidados do editor da RIAL, no seguinte endereço: Revista do Instituto Adolfo Lutz (RIAL) - Biblioteca do Instituto Adolfo Lutz Setor de Publicações - Av. Dr. Arnaldo, 355 – Cerqueira César – São Paulo - SP – Brasil CEP: 01246-902 ou por meio eletrônico: rial@saude.sp.gov.br

12. **A ESTRUTURA DOS TEXTOS:** O manuscrito deverá ser apresentado segundo a estrutura das normas de Vancouver: Título; Autores e Instituições; Resumo e Abstract; Introdução; Metodologia; Resultados; Discussão; Conclusão; Agradecimentos; Referências; Tabelas; Figuras e Fotografias.
13. **PÁGINA DE IDENTIFICAÇÃO:** Título do artigo, conciso e completo, em português e inglês; nome completo de todos os autores; indicação da instituição à qual cada autor está afiliado (Laboratório, Setor, Seção, Serviço, Divisão, Departamento, Instituto, Faculdade e Universidade); indicação de um autor responsável pela troca de correspondência; se subvencionado, indicar nome da agência de fomento que concedeu o auxílio e respectivo nome do processo; se foi extraído de dissertação ou tese, indicar título, ano e instituição em que foi apresentada.
14. **RESUMO:** Todos os textos deverão ter resumo em português e em inglês (Abstract), dimensionado entre 200 palavras. Para os artigos originais, o resumo deve destacar os propósitos do estudo, procedimentos básicos adotados (seleção de sujeitos de estudo ou animais de laboratório, métodos analíticos e observacionais), principais descobertas e conclusões. Devem ser enfatizados novos e importantes aspectos do estudo ou das observações. Uma vez que o resumo é a principal parte indexada do artigo em muitos bancos de dados eletrônicos, e a única parte que alguns leitores lêem, os autores precisam lembrar que eles devem refletir, cuidadosamente, o conteúdo do artigo. Para os demais textos, o resumo deve ser narrativo, mas com as mesmas informações.
15. **DESCRIPTORIOS (UNITERMOS OU PALAVRAS-CHAVE):** Seguindo-se ao resumo, devem ser indicados no mínimo três e no máximo dez descritores do conteúdo, que têm por objetivo facilitar indexações cruzadas dos textos e podem ser publicados juntamente com o resumo. Em português, os descritores deverão ser extraídos do vocabulário “Descritores em Ciências em Saúde” (DeCS), da Bireme (disponível em www.bireme.br). Em inglês, do “Medical Subject Headings” (Mesh). Caso não sejam encontrados descritores adequados à temática abordada, termos ou expressões de uso corrente poderão ser empregados.
16. **INTRODUÇÃO:** Contextualiza o estudo, a natureza dos problemas tratados e sua significância. A introdução deve ser curta, definir o problema estudado, sintetizar sua importância e destacar as lacunas do conhecimento abordadas.
17. **MATERIAIS E MÉTODOS:** A metodologia deve incluir apenas informação disponível no momento em que foi escrito o plano ou protocolo do estudo; toda a informação obtida durante a condução do estudo pertence ao item Resultados. Deve conter descrição, clara e sucinta, acompanhada da respectiva citação bibliográfica, dos procedimentos adotados, a população estudada (universo e amostra), instrumentos de medida e, se aplicável, método de validação e método estatístico.
18. **RESULTADOS:** Devem ser apresentados em seqüência lógica no texto, tabelas e figuras, colocando as descobertas principais ou mais importantes primeiro. Os resultados encontrados devem ser descritos – sem incluir interpretações e/ou comparações. Sempre que possível, devem ser apresentados em tabelas e figuras auto-explicativas e com análise estatística, evitando-se sua repetição no texto.
19. **DISCUSSÃO:** Deve enfatizar os novos e importantes aspectos do estudo e as conclusões que dele derivam. Deve ser apresentada as considerações das limitações do estudo, seguida da comparação com a literatura e da interpretação dos autores, e quando for o caso, novas hipóteses.
20. **CONCLUSÃO:** Traz as conclusões relevantes, considerando os objetivos do trabalho e formas de continuidade. Se tais aspectos já estiverem incluídos na discussão, a conclusão não deve ser escrita.
21. **AGRADECIMENTOS:** Deve-se limitar ao mínimo possível, sempre ao final do texto.

22. CITAÇÕES BIBLIOGRÁFICAS

A exatidão das referências bibliográficas é de responsabilidade dos autores.

Ao longo do artigo, o número de cada referência deve corresponder ao número sobrescrito, imediatamente após a respectiva citação. Devem ser numeradas consecutivamente.

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

23. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS: Listadas ao final do texto, devem ser numeradas de acordo com a ordem de citação. A quantidade de referências deve ser respeitada conforme definido em cada tipo de artigo aceito pela Revista do Instituto Adolfo Lutz (RIAL).

24. ORIENTAÇÕES GERAIS:

Os autores (pessoa física) devem ser referenciados pelo seu sobrenome (apenas a letra inicial colocada em maiúscula), seguido das iniciais do nome, sem ponto.

Quando o documento consultado possui até seis autores, citam-se todos os nomes, separados por vírgulas. Mais de seis autores, citar os seis primeiros, seguidos da expressão em Latim "*et al*".

Indicar as organizações quando estas assumem a autoria do documento. Se for mais de uma organização, devem ser separadas por ponto-e-vírgula. Para identificar a hierarquia dentro da organização, separar por vírgula.

Quando o documento é de autoria de pessoas físicas e organizações, os nomes devem ser separados por ponto-e-vírgula, de acordo com a hierarquia.

Quando o documento consultado não possui autoria, iniciar a referência bibliográfica pelo título.

A primeira letra do título deve ser grafada em maiúscula.

25. ARTIGOS DE PERIÓDICOS: As referências devem ser iniciadas pelo nome do autor, seguido dos títulos do artigo e do periódico, separados por ponto final, respectivamente. Os títulos dos periódicos devem ser abreviados conforme lista do *Index Medicus* (base de dados Medline), disponível no endereço: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=journals>.

Após o título do periódico, coloca-se um ponto final, seguido da data de publicação; volume (número); página inicial-final. Para consultar periódicos nacionais e latino-americanos: <http://portal.revistas.bvs.br/main.php?home=true&lang=pt>.

Exemplos:

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.

26. LIVROS: Na citação de livros deve constar a cidade de publicação, opcionalmente, a sigla do Estado ou província pode ser acrescentada, assim como o país, por extenso, entre parênteses; exemplos: São Paulo (SP) e São Paulo (Brasil). Quando se tratar da primeira edição, não é necessário indicar. A abreviação do número da edição seguirá a norma da língua portuguesa; exemplo: 4^a ed.

Exemplo: Lopez D, organizador. *Estudos epidemiológicos qualitativos*. São Paulo: James Martim; 2009.

27. CAPÍTULOS DE LIVRO: Para referenciar capítulos de livros, os autores deverão seguir o exemplo:

Wirdh L. História da Epidemiologia. In: Lopez D, organizador. *Estudos epidemiológicos qualitativos*. São Paulo: James Martim; 2009. p. 64-76.

Arnau JM, Laporte JR. Promoção do uso racional de medicamentos e preparação de guias farmacológicos. In: Laporte JR, Tognoni G, Rozenfeld S. *Epidemiologia do medicamento: princípios gerais*. São Paulo: Hucitec; Rio de Janeiro: Abrasco; 1989.

28. DISSERTAÇÕES, TESES E MONOGRAFIAS:

Santos EP. Estabilidade química da manteiga da terra. [dissertação de mestrado]. Bananeiras, Paraíba: 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:Universidade de São Paulo; 2006.

- 29 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].

30. PERIÓDICOS E DADOS ELETRÔNICOS:

Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo - SABESP. O que fazemos/Qualidade da água. [acesso em 17 de setembro de 2008.]. Disponível em: [<http://www.sabesp.com.br/CalandraWeb/CalandraRedirect/?temp=4&roj=sabesp&pub=T&db=&doci.>].

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. [base de dados na internet] Tabelas de Resultados: Tabela 1.1.20 – População recenseada e estimada, segundo os municípios – São Paulo 2007. Disponível em: [<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/contagem2007/defaulttab.shtm>].

Legislação: Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). 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.

31. 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; 2005.1018pp.

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).

Casos não contemplados nesta instrução devem ser citados conforme indicação do Committee of Medical Journals Editors (*Grupo Vancouver*), disponível <http://www.cmje.org>.

32. TABELAS: Devem ser apresentadas em folhas ou arquivo separados, numeradas consecutivamente com algarismos arábicos, na ordem em que forem citadas no texto. A cada uma deve ser atribuído um título breve. Notas explicativas devem ser limitadas ao menor número possível e colocadas no rodapé. A quantidade de tabelas deve ser respeitada conforme definido em cada tipo de artigo aceito pela Revista do Instituto Adolfo Lutz (RIAL).

33. QUADROS: São identificados como tabelas, seguindo uma única numeração em todo o texto.

34. FIGURAS: Fotografias, desenhos, gráficos etc., citados como figuras, devem ser numerados consecutivamente com algarismos arábicos, na ordem em que foram mencionados no texto. As legendas devem ser apresentadas em folha à parte; as ilustrações devem ser suficientemente claras para permitir sua reprodução. A quantidade de figuras deve ser respeitada conforme definido em cada tipo de artigo aceito pela Revista do Instituto Adolfo Lutz (RIAL).

35. ORIENTAÇÕES GERAIS: Tabelas, ilustrações e outros elementos gráficos devem ser nítidos e legíveis, em alta resolução. Se não for de própria autoria, mencionar a fonte e anexar a permissão para reprodução. O número de elementos gráficos está limitado ao definido em cada tipo de artigo aceito pela RIAL. Abreviaturas devem ser explicitadas por extenso, quando citadas pela primeira vez.

■ COLABORADORES

Agradecimentos aos relatores

O Corpo Editorial agradece a todos os relatores abaixo relacionados que, com seu trabalho voluntário e anônimo ao longo de 2009 contribuíram para o bom andamento das atividades e elevação do nível dos artigos publicados pela Revista.

- **Adelaide Beleia** Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, Londrina, PR
- **Adriano Gomes da Cruz** Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Tecnologia de Alimentos. Campinas, SP
- **Aguinaldo Ribeiro Pinto** Universidade Federal de Santa Catarina, Laboratório de Imunologia Aplicada, Departamento de Microbiologia e Parasitologia. Florianópolis, SC
- **Alexandre da Trindade Alfaro** Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus de Francisco Beltrão. PR
- **Alexandre Matthiensen** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Boa Vista, RR
- **Almir Carlos Andrade** Universidade Federal do Paraná, Setor Litoral. Matinhos, PR
- **Ana Flávia Santos Coelho** Universidade Federal do Tocantins, Laboratório de Microbiologia de Alimentos. Palmas, TO
- **Ana Maria Centola Vidal Martins** Centro Universitário de Rio Preto (UNIRP), Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal, Curso de Medicina Veterinária. São José do Rio Preto, SP
- **Ana Maria Rauem de Oliveira Miguel** Instituto de Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos (CCQA). Campinas, SP
- **Ana Marta Ribeiro Machado** Universidade Federal de São Carlos Coordenadoria Especial para o Meio Ambiente (CEMA). São Carlos, SP
- **Ana Paula Santos** Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Nutrição. São Paulo, SP
- **Anderson de Souza Sant'Ana** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Laboratório de Microbiologia de Alimentos. São Paulo, SP
- **Antonio Carlos Rosário Vallinoto** Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Virologia. Belém, PA
- **Benedito Correa** Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Microbiologia, São Paulo, SP
- **Berta Maria Heinzmann** Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Farmácia Industrial, Centro de Ciências da Saúde. Santa Maria, RS
- **Carla R B Mendonça** Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Ciência do Alimentos. Pelotas, RS
- **Carlos Prentice Hernández** Universidade Federal do Rio Grande, Laboratório de Tecnologia de Alimentos, Departamento de Química Rio Grande RS
- **Cesar Reis** Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Química. Viçosa, MG
- **César Damian** Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Ciências e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias. Florianópolis, SC
- **Cintia de Moraes Borba** Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Departamento de Micologia. Rio de Janeiro, RJ

- **Clarice Pinto Máximo Espíndola** Instituto Butantan, Laboratório de Parasitologia-Entomologia. São Paulo, SP
- **Claudia Lúcia de Oliveira Pinto** Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Centro Tecnológico da Zona da Mata. Viçosa, MG
- **Claúdio Celestino de Oliveira** Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas. Maringá, PR
- **Claudio Dias Timm** Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária. Pelotas, RS
- **Conceição Angelina dos Santos Pereira** Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Nutrição e Saúde. Viçosa, MG
- **Cristiana Ferreira Jardim de Miranda** Secretaria de Estado da Saúde de Minas Gerais. Belo Horizonte, MG
- **Cristiane Gattini Sbampato** Universidade Vale do Rio Verde. Três Corações, MG
- **Cristiane Yumi Koga Ito** Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal. São José dos Campos, SP
- **Deborah Helena Markowicz Bastos** Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Nutrição. São Paulo, SP
- **Deborah Ines Teixeira Favaro** Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN). São Paulo, SP
- **Djalva Maria da Nóbrega Santana** Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos. Seropédica, RJ
- **Dulcecleide Bezerra de Freitas** Universidade Estadual do Piauí. Parnaíba, PI
- **Durval Ribas Filho** Faculdade Integrada Padre Albino, Curso de Medicina. Catanduva, SP
- **Eduardo Aléxis Lobo Alcayaga** Universidade de Santa Cruz do Sul, Departamento de Biologia e Farmácia. Santa Cruz do Sul, RS
- **Eduardo Purgatto** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Nutrição Experimental. São Paulo, SP
- **Eliana de Fátima Marques de Mesquita** Universidade Federal Fluminense, Faculdade de Veterinária, Laboratório do Pescado. Rio de Janeiro, RJ
- **Elton Nunes Britto** Coordenação de Pesquisas em Biologia Aquática, Manaus, AM
- **Elizabeth Accioly** Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Nutrição "Josué de Castro". Rio de Janeiro, RJ
- **Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres** Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Nutrição. São Paulo, SP
- **Elza Kimura Grimshaw** Universidade Estadual de Maringá. Maringá, PR
- **Erika Rosa Kedor** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. São Paulo, SP
- **Ernani Porto** Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Departamento de Alimentos Agroindústria e Nutrição. Piracicaba, SP
- **Fabiana Amaral Araujo** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. São Paulo, SP
- **Fabiane Cristina Cerutti** Universidade Estadual do Centro-oeste, Departamento de engenharia Ambiental, Setor de Ciências Agrárias e Ambientais. Irati, PR
- **Fabiano Cleber Bertoldi** Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Florianópolis - SC
- **Fernando Mauro Pereira Soares** Universidade Federal do Amazonas, Instituto de Saúde e Biotecnologia. Coari, AM
- **Francisca Martins Boni** Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Nutrição. Recife, PE

- **Flavia Saldanha Kubrusly** Instituto Butantan, Centro de Biotecnologia, São Paulo SP
São Paulo, SP
- **Gizeli Scotti do Canto** Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia Industrial. Santa Maria, RS
- **Giselle Ibette Silva Lopez Lopes** Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, Seção de Microbiologia Alimentar. São Paulo, SP
- **Gislaine Ricci Leonardi** Universidade Metodista (UNIMEP). Piracicaba, SP
- **Glauca Celeste de Souza Amâncio** Fundação Ezequiel Dias, Instituto Octávio Magalhães, Divisão de Vigilância Sanitária, Serviço de Ciências Bioquímicas, Laboratório de Biologia Molecular. Belo Horizonte, MG
- **Graça Maria de Castro Viana** Universidade Federal do Maranhão, Departamento de Patologia, Centro de Ciências da Saúde. São Luís, MA
- **Helena Rodrigues Lopes** Universidade Federal Fluminense, Instituto Biomédico, Centro de Ciências Médicas. Niterói, RJ
- **Heloisa de Mello** Universidade Federal de Sergipe, Núcleo de Química. Itabaiana, SE
- **Hércia Stampini Duarte Martino** Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Nutrição e Saúde. Viçosa, MG
- **Irmtraut Araci Hofmann Pfrimer** Universidade Católica de Goiás, Departamento de Ciências Biomédicas, Laboratório de Imunologia. Goiânia, GO
- **Jacinto da Costa Silva Neto** Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Histologia e Embriologia. Recife, PE
- **Jane Selia dos Reis Coimbra** Universidade Federal de Viçosa, Departamento Tecnologia de Alimentos. Viçosa, MG
- **Jaqueline Macruz Peresi** Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Regional de São José do Rio Preto, Seção de Bromatologia e Química. São José do Rio Preto, SP
- **Jéfferson Malveira Cavalcante** Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia. Limoeiro do Norte, CE
- **Jesui Vergilio Visentainer** Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Química, Centro de Ciências de Saúde. Maringá, PR
- **João Carlos Mello** Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Farmácia e Farmacologia. Maringá, PR
- **João Evangelista Fiorini** Universidade José do Rosário Vellano, Instituto de Farmácia e Nutrição, Departamento de Biologia. Alfenas, MG
- **Jorge Mancini Filho** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. São Paulo, SP
- **José Almiro da Paixão** Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde. Recife, PE
- **José Ricardo Jansen**, Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Biologia Médica, Seção Parasitose Sistêmica. São Paulo, SP
- **Jovita Eugênia Gazzinelli Cruz Madeira** Fundação Ezequiel Dias, Instituto Octávio Magalhães, Núcleo de Micologia e Micotoxinas. Belo Horizonte, MG
- **Kátia Gianni de Carvalho Lima** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Microbiologia de Alimentos. São Paulo, SP
- **Kleber Raimundo Freitas Faial** Instituto Evandro Chagas, Seção de Meio Ambiente, Laboratório de Toxicologia. Belém, PA
- **Larissa Lagoa Ribeiro Furtini** Universidade Federal de Lavras, Departamento de Ciência dos Alimentos. Lavras, MG

- **Leda Maria Silva Kimura** Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro (PESAGRO RIO), Laboratório de Biologia Animal. Niterói, RJ
- **Leonor Almeida de Souza Soares** Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Departamento de Química. Rio Grande, RS
- **Lílian Maria Nery de Barros Góes** Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina Veterinária, Inspeção de Produto de Origem Animal. Recife, PE
- **Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman** Universidade de São Paulo, Instituto de Medicina Tropical. São Paulo, SP
- **Luiz Carlos Severo** Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Laboratório de Micologia. Porto Alegre, RS
- **Maisa Splendore Della Casa** Instituto Butantan, Laboratório de Imunopatologia. São Paulo, SP
- **Márcia Regina Beux** Universidade Federal do Paraná, Departamento de Patologia Básica, Centro Politécnico, Setor de Ciências Biológicas. Curitiba, PR
- **Márcio Sobreira Silva Araújo** Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Instituto René Rachou. Belo Horizonte, MG
- **Marco Antonio Moreira Furtado** Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Juiz de Fora, MG
- **Maria Cláudia Dantas Porfirio Borges** Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública. Goiânia, GO
- **Maria Cristina Zborowski de Paula** Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Ciências Biológicas. Toledo, PR
- **Maria Helena Wohlers Morelli Cardoso** Fundação Instituto Oswaldo Cruz, INCQS, Departamento de Química, Laboratório de Alimentos e Contaminantes. Rio de Janeiro, RJ
- **Maria José Cavaliere** Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Araraquara, SP
- **Maria Lucia Ribeiro** Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Instituto de Química de Araraquara, Departamento de Química Orgânica. Araraquara, SP
- **Maria Petronilia Oliveira Hellqvist** Laboratório de Ciências do Mar, Laboratório de Macroalgas. Fortaleza, CE
- **Marilde Terezinha Bordignon Luz** Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Florianópolis, SC
- **Maristela do Nascimento Silva** Instituto de Tecnologia de Alimentos, Laboratório de Microbiologia. Campinas, SP
- **Maristela Pereira** Universidade Federal de Goiás Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Laboratório de Biologia Molecular. Goiânia, GO
- **Miracy Muniz de Albuquerque** Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos. Recife, PE
- **Myrna Sabino** Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, Seção de Química Biológica. São Paulo, SP
- **Nathália Ramos de Melo** Universidade Federal Fluminense, Pólo de Volta Redonda. Volta Redonda, RJ
- **Nancy dos Santos Dorna** Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Humanas e Sociais, Departamento de Economia Doméstica. Seropédica, RJ
- **Neide Hiromi Tokumaru Miyazaki** Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Departamento de Microbiologia. Rio de Janeiro, RJ

- **Nelma de Mello Silva Oliveira** Universidade Federal de Lavras, Laboratório de Biologia e Fisiologia de Microrganismo. Lavras, MG
- **Neura Bragagnolo** Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciência de Alimentos. Campinas, SP
- **Obdulio Gomes Miguel** Universidade Federal do Paraná, Departamento de Farmácia, Setor de Ciências da Saúde. Curitiba, PR
- **Patrícia Haas** Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Análises Clínicas. Florianópolis, SC
- **Patrícia Sartorelli** Universidade Federal de São Paulo, Curso Química, Campus Diadema. Diadema, SP
- **Paula Dias Bevilacqua** Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Veterinária, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Viçosa, MG
- **Regina Baptista dos Reis** Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Nutrição, Departamento de Alimentos e Nutrição. Cuiabá, MT
- **Renata Fernandes Rabello** Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Microbiologia Médica, Instituto de Microbiologia Pro. Paulo de Góes. Rio de Janeiro, RJ
- **Rinaldo Cardoso dos Santos** Universidade Federal de Ouro Preto, Escola de Nutrição, Departamento de Alimentos. Ouro Preto, MG
- **Rita Goreti Amaral** Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Farmácia, Departamento de Análises Clínicas Toxicológicas e Bromatológicas. Goiânia-GO
- **Roberta Hilsdorf Piccoli** Universidade Federal de Lavras, Departamento de Ciência dos Alimentos. Lavras, MG
- **Ronaldo Zucatelli Mendonça** Instituto Butantan, Seção de Imunologia Viral, Laboratório de Imunologia Viral. São Paulo SP
- **Roseane Fett** Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Florianópolis, SC
- **Sandra Garcia** Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, CCA. Londrina, PR
- **Silvana Gonçalves Brito de Arruda** Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória. Vitória de Santo Antão, PE
- **Silvana Regina Favoretto** Instituto Pasteur, Núcleo de Pesquisas em Raiva do Laboratório de Virologia Clínica e Molecular. São Paulo, SP
- **Sueli Regina Baggio** Instituto Tecnológico de Alimentos, Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos. Campinas, SP
- **Suzana Cristina de Toledo Camacho Lima** Instituto do Câncer do Estado de São Paulo "Octavio Frias de Oliveira". São Paulo, SP
- **Sydney Hartz Alves** Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências da Saúde. Santa Maria, RS
- **Telma Elita Bertolin** Universidade de Passo Fundo, Instituto de Ciências Biológicas, Centro de Pesquisa em Alimentação. Passo Fundo, RS
- **Vera Regina Werner** Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS
- **Veronice Slusarski Santana** Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Engenharia Química, Centro de Tecnologia. Maringá, PR

- **Agradecimento especial pela revisão do inglês**
Dra. Mirthes Ueda

- **Diagramação visual e layout**
Oficina Editorial

ISSN 0073-9855



9 770073 985009