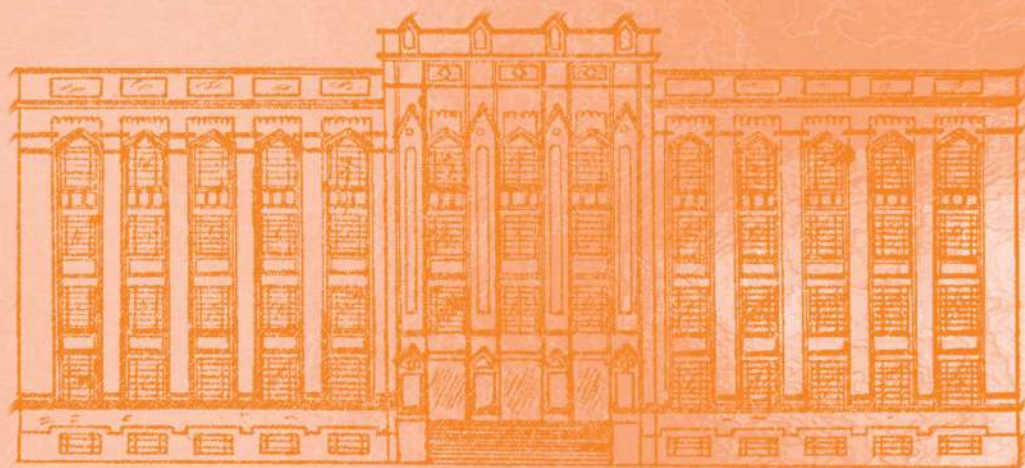


REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

ISSN 0073-9855
RIALA6



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE

Volume 68 número 2, 2009

ISSN 0073-9855



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

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Volume 68 número 2, 2009
Maio-Agosto 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 Ruffno 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.
Ligia 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(2)

ISSN 0073-9855 CDD₁₆ 614.07205
RIALA 6
ISSN 1983-3814 versão *on-line*
ISSN 2176-3844 versão CD-ROM

(*) ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE BIBLIOTECÁRIOS. Grupo de Bibliotecários Bio-médicos.
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

- 1205 **Lipídios totais e ácidos graxos na informação nutricional do rótulo dos alimentos embalados: aspectos sobre legislação e quantificação**
Total lipids and fatty acids in nutritional label information of packed foods: aspects on legislation and quantification
SABRIA AUED-PIMENTEL, ODAIR ZENEBO 167-181
- 1206 **Diagnóstico de infecção por vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos 1 (HTLV-1) e -2 (HTLV-2) em população de risco: passado, presente e futuro**
Diagnosis of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and type 2 (HTLV-2) infection in at-risk populations: past, present and future
ADELE CATERINO-DE-ARAÚJO..... 182-186

■ ARTIGOS ORIGINAIS/ ORIGINAL ARTICLES

- 1207 **Vitamins B₁, B₂, B₆ and PP contents in royal jelly**
Vitaminas B₁, B₂, B₆ e PP em geléia real
ELAINE CRISTINA PINTO MORESCHI, LIGIA BICUDO DE ALMEIDA-MURADIAN..... 187-191
- 1208 **Estudo das condições de extração de compostos fenólicos de cebola (*Allium cepa* L.)**
Study on the extracting conditions of phenolic compounds from onion (*Allium cepa* L.)
MICHELE MORAES DE SOUZA, VÂNIA MACHADO RECARTE, MERITAINE DA ROCHA,
ELIANA BADIALE-FURLONG 192-200
- 1209 **Análise da estabilidade e da composição em ácidos graxos em manteiga de garrafa produzida artesanalmente**
Stability and fatty acids composition evaluation in bottled butter craftsmanly produced
BRUNA APARECIDA SOUZA MACHADO, JANICE IZABEL DRUZIAN..... 201-208
- 1210 **Farinhas mistas de trigo e de soja agregam valor nutricional e sensorial em pães**
Wheat-soybeans mix flours improve the bread nutritional and sensorial characteristics
MARIA INÊS DE SOUZA DANTAS, GLÁUCIA FERREIRA ANDRADE, NEWTON DENIZ PIOVESAN,
HÉRCIA STAMPINI DUARTE MARTINO..... 209-214
- 1211 **Efeito *in vitro* de concentrações de metabisulfito de sódio, benzoato de sódio e sorbato de potássio sobre fungos termorresistentes**
In vitro effect of concentrations of sodium metabisulphite, sodium benzoate and potassium sorbate on heat-resistant fungi
ANA MARIA QUEIJEIRO LÓPEZ, SHEYLA FERREIRA LIMA-COELHO, LUIS FERNANDO ROMANHOLO FERREIRA 215-223
- 1212 **Qualidade microbiológica de polpas de frutas congeladas**
Microbiological quality of frozen fruit pulps
ESTELA SEBASTIANY, ELIZANILDA RAMALHO DO REGO, MARCOS JOSÉ SALGADO VITAL..... 224-231

-
- 1213 Eficiência do Agar R2A na contagem de bactérias heterotróficas em água tratada para diálise**
The efficiency of Reasoner'2 Agar for counting heterotrophic bacteria isolated from water for dialysis
ADRIANA APARECIDA BUZZO ALMODOVAR, TATIANA CALDAS PEREIRA, ADRIANA BUGNO232-236
- 1214 Qualidade da água de bicas localizadas nos municípios de Santos e São Vicente, estado de São Paulo, Brasil**
Quality of water from spouts located in Santos and São Vicente municipalities, São Paulo state, Brazil
DANIEL SANTOS TAVARES, ANA CAROLINA BUCHALLA ALONSO, ANA RUTH PEREIRA DE MELLO, CÍCERO VÁGNER DE SOUSA, EDUARDO GONZALEZ, ESTEVÃO DE CAMARGO PASSOS, FABIANA CORTEZ PIMENTEL, MARIA DE LOURDES PAIXÃO DA SILVA, MÁRIO TAVARES, ROBERTO CARLOS FERNANDES BARSOTTI237-244
- 1215 Iodoterapia: avaliação crítica de procedimentos de precaução e manuseio dos rejeitos radioativos**
Iodotherapy: critical assessment of the precautionary and handling procedures of radioactive wastes
MARIA LÚCIA RISSATO, MARIA LÚCIA RIBEIRO, NEUSA REGINA PARRAS SIMÕES DE CASTRO, MARCUS CÉSAR AVEZUM ALVES DE CASTRO, LUCIANA CAMARGO OLIVEIRA245-253
- 1216 O desinfetante hipoclorito de sódio como barreira sanitária: condições de atividade frente a *Staphylococcus aureus* isolados em alimentos envolvidos em surtos de toxinfecções alimentares**
The disinfectant sodium hypochlorite as a sanitary barrier: activity conditions against *Staphylococcus aureus* isolated from foods implicated in foodborne disease outbreaks
JANE MARI CORRÊA BOTH, SOLANGE MENDES LONGARAY, CÉSAR AUGUSTO MARCHIONATTI AVANCINI.....254-258
- 1217 Avaliação microbiológica e físico-química de açúcares mascavo comerciais**
Physical-chemical and microbiological evaluation of commercial brown sugar
WESLEY CARDOSO GENEROSO, MARIA TERESA MENDES RIBEIRO BORGES, SANDRA REGINA CECCATO-ANTONINI, AUGUSTO FILIP MARINO, MARCUS VINICIUS MERFA E SILVA, RENATA TIEKO NASSU, MARTA REGINA VERRUMA-BERNARDI259-268
- 1218 *Staphylococcus aureus* portadores de genes de toxinas isolados em amostras de diferentes fontes de transmissão durante a ordenha**
Toxin gene-carrier *Staphylococcus aureus* isolated from diverse transmission sources during the milking
LUIZ FRANCISCO ZAFALON, JULIANA RODRIGUES POZZI ARCARO, ANTÔNIO NADER FILHO, LUCIANO MENEZES FERREIRA, JOSIR LAINE APARECIDA VESCHI269-277
- 1219 Validação intralaboratorial de metodologia quantitativa para determinação de L-fenilalanina em farinha de trigo por espectrofotometria derivada segunda**
Single-laboratory validation of a quantitative methodology for determination of L-phenylalanine in wheat flour by second derivative spectrophotometry
RAQUEL LINHARES CARREIRA, CAMILA SALLES RAMOS, LIDIANE AMORIM MUNDIM, LETÍCIA GONÇALVES LIMA, SCHELLA VITORINO CARVALHO DE SOUZA, MARIALICE PINTO COELHO SILVESTRE278-288
- 1220 Conformidade da rotulagem de repositores hidroeletrólitos prontos para consumo de marcas nacionais em relação à legislação brasileira**
Label conformity of carbohydrate-electrolyte beverages ready to drink from national brands in respect to Brazilian law
ÂNGELA ANTUNES SILVA, CAROLINA GOMES DA ROCHA, MARCELO ANTÔNIO MORGANO, NIURKA MARITZA ALMEYDA HAJ-ISA, KÉSIA DIEGO QUINTAES289-298

Comunicação breve/ Brief communication

- 1221 Avaliação da qualidade físico-química de alimentos comercializados em restaurantes *self-service***
Evaluation of quality of foods commercialized in *self-service* restaurants
JULIANNA SHIBAO, ROBERTO CARLOS FERNANDES BARSOTTI, ESTEVÃO DE CAMARGO PASSOS, LUIZ CARLOS MARONO,
YARA LUCIA DE CASTRO ROUSSENG, MARIA DE LOURDES PAIXÃO DA SILVA, ANDRÉ LUIS MONTEIRO ARAÚJO,
EDUARDO GONZALEZ, MÁRIO TAVARES299-304
- 1222 Contaminação bacteriológica de águas subterrâneas da região oeste de Santa Catarina, Brasil**
Bacteriological contamination of groundwater of the western area of Santa Catarina, Brazil
PATRÍCIA DA SILVA MALHEIROS, DANIELA FERNANDA SCHÄFER, INDIANARA MARIA HERBERT, SÔNIA MARI CAPUANI,
ELIANE MACHADO DA SILVA, CASSIUS UGARTE SARDIGLIA, DIANE SCAPIN, ELIANDRA MIRLEI ROSSI,
ADRIANO BRANDELLI305-308
- 1223 Infecção por *Giardia lamblia* em crianças de 0 a 10 anos no município de Chapadinha, Maranhão, Brasil**
Giardia lamblia infection in children under 10 years old in the municipality of Chapadinha, Maranhão state, Brazil
FRANCINALDO SOARES SILVA309-313
- **NOTA CIENTÍFICA / SCIENTIFIC NOTE**
- 1224 Falha na implantação de um novo algoritmo de testes laboratoriais para o diagnóstico de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 em população de risco**
Lack in introducing a new algorithm of laboratorial tests for detecting HTLV-1 and HTLV-2 infections in at-risk population
EMANUELA AVELAR SILVA COSTA, FABRÍCIO JACOB, REGIANE DOS SANTOS FELICIANO,
ELIZABETH DE LOS SANTOS-FORTUNA, ADELE CATERINO-DE-ARAUJO314-317
- 1225 Ação ovicida do fungo *Pochonia chlamydosporia* sobre ovos de *Enterobius vermicularis***
Ovicidal activity of *Pochonia chlamydosporia* fungus on *Enterobius vermicularis* eggs
FABIO RIBEIRO BRAGA, ANDRÉ RICARDO E SILVA, JULIANA MILANI ARAUJO, SEBASTIÃO RODRIGO FERREIRA,
JACKSON VICTOR DE ARAÚJO, LUIZA NEME FRASSY318-321
- **RESUMOS DE TESES E DISSERTAÇÕES**
- Evaluation of fatty acid lipid extraction methods in human plasma**
Avaliação de métodos de extração lipídica em plasma humano
MORAIS, DR. 322

Lipídios totais e ácidos graxos na informação nutricional do rótulo dos alimentos embalados: aspectos sobre legislação e quantificação

Total lipids and fatty acids in nutritional label information of packed foods: aspects on legislation and quantification

RIALA6/1205

Sabria AUED-PIMENTEL^{1*}, Odair ZENEON²

*Endereço para correspondência: Laboratório de Cromatografia, Divisão de Bromatologia e Química, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355 CEP 01246-902, São Paulo, SP, Brasil, e-mail: spimente@ial.sp.gov.br

¹Laboratório de Cromatografia, Divisão de Bromatologia e Química, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil.

²Divisão de Bromatologia e Química, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil.

Recebido: 21.01.2009 – Aceito para publicação: 03.08.2009

RESUMO

A ingestão excessiva de ácidos graxos saturados e *trans* na dieta tem sido correlacionada ao aumento do risco de doenças cardiovasculares. No Brasil, conforme a Resolução RDC 360/03 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é exigida a declaração do teor de gordura total (GT) ou lipídios, ácidos graxos saturados (AGS) e *trans* (AGT) na rotulagem dos alimentos embalados, entre outros nutrientes, como estratégia de prevenção das doenças crônicas. Cabe aos laboratórios oficiais verificarem os teores declarados por meio da análise. No entanto, não estão uniformizadas as definições quanto aos componentes lipídicos, tão pouco quanto aos métodos analíticos a serem adotados, inclusive nos laboratórios brasileiros. Considerando-se as exigências legais, a diversidade dos métodos analíticos disponíveis e, principalmente, o direito do consumidor de obter informações confiáveis, a presente revisão teve como objetivo abordar aspectos sobre a legislação de rotulagem nutricional obrigatória dos alimentos, bem como sobre as etapas críticas dos métodos analíticos de quantificação dos componentes lipídicos. Estas etapas podem levar a divergências significativas nos teores obtidos para os nutrientes. Reforçam-se as evidências da necessidade de padronização das metodologias nos laboratórios brasileiros. Tal padronização contribuirá para garantir o direito do consumidor em obter informações uniformes e exatas sobre os alimentos que adquire, e possibilitará a escolha dos mais saudáveis, além de favorecer a inserção dos produtos brasileiros no mercado internacional.

Palavras-chave. lipídios, ácidos graxos, métodos/determinação, rotulagem nutricional, legislação.

ABSTRACT

The excessive ingestion of saturated and *trans* fatty acids on a diet has been associated with an increased risk of getting cardiovascular diseases. In Brazil, the Federal Directive RDC 360/03 of the National Agency for Sanitary Surveillance (ANVISA) demands the declaration of the contents of total fat (TF) or total lipid (TL), saturated fatty acid (SFT) and *trans* fatty acid (TFA), among other nutrients, on the labels of packed foods as an strategy to prevent chronic diseases. One of the attributions of official laboratories is to certify the stated nutritional contents on food package labels by means of analytical investigation. However, definitions about lipidic components of foods, as well as the analytical methods to be used in their determination, have not been uniformed yet. Considering the legal requirements, the diversity of available analytical methods, and mainly to the rights of customers to obtain reliable information, the present review aims to discuss aspects of the legislation on obligatory nutritional food labeling and the critical steps of analytical methods employed to quantify the lipidic components. These methods may lead to significant divergence on the values of contents of such nutrients. Emphasis is made on evidences of the need for standardization of methodologies for this specific purpose at Brazilian laboratories. This strategy surely will contribute to guarantee the rights of customers to receive uniform and exact information on available foods, so they are able to choose those considered healthier and to facilitate the insertion of Brazilian food products into the international trade.

Key words. lipids, fatty acids, determination/methods, nutritional labeling, legislation.

INTRODUÇÃO

A legislação brasileira exige a declaração nos rótulos dos alimentos embalados de alguns nutrientes, como a gordura total (GT), ácidos graxos (AG) saturados e *trans*. Esta é uma das estratégias da Organização Mundial de Saúde (OMS) e do Ministério da Saúde brasileiro para prevenir as doenças crônicas.^{1,2,3,4} As abordagens e legislações sobre rotulagem nutricional dos alimentos são temas novos. Não estão uniformizados as definições e os métodos analíticos para aqueles componentes, inclusive nos laboratórios brasileiros. Quanto à determinação de gordura total, pela definição da legislação brasileira, diferentes métodos gravimétricos podem ser aplicados. Os valores de GT e, conseqüentemente dos AG, estarão sujeitos a variações do método analítico.

Nos Estados Unidos e Canadá, por outro lado, a obrigatoriedade da declaração dos nutrientes no rótulo do alimento é mais antiga e foram desenvolvidos métodos hidrolíticos, como o AOAC 996.06, de extração e determinação da GT por cálculo a partir dos AG obtidos por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (GC/DIC)^{5,6,7}.

Considerando as exigências da legislação, a diversidade dos métodos analíticos, a globalização dos mercados e, principalmente, o direito do consumidor de informações precisas para a escolha de uma alimentação saudável, a presente revisão teve como objetivo abordar aspectos sobre a legislação de rotulagem nutricional obrigatória dos alimentos e as etapas críticas dos métodos analíticos de quantificação dos componentes lipídicos para fins daquela informação, as quais podem gerar discrepâncias nos resultados.

■ Os lipídios dos alimentos: fatores de risco para as doenças cardiovasculares

Os lipídios da dieta, quando consumidos com moderação, são importantes para o crescimento, desenvolvimento e manutenção da saúde. O avanço das pesquisas tem demonstrado o enorme potencial biológico destas moléculas⁸. Os ácidos graxos (AG), constituintes principais dos lipídios das dietas, podem modular a função de vários sistemas e reduzir ou favorecer a ocorrência de diversas doenças^{9,10}. A ingestão inadequada de certos componentes, como os ácidos graxos saturados e os insaturados *trans*, tem sido correlacionada ao aumento no risco de doenças cardiovasculares, que é a principal causa de mortalidade no mundo^{4,11,12,13}.

A partir de meados do século XX, o mundo tem sofrido mudanças que se refletem nos hábitos alimentares, a princípio nos países desenvolvidos e, mais recentemente, naqueles em desenvolvimento. As dietas tradicionais baseadas principalmente em alimentos de origem vegetal foram substituídas por dietas com alto teor de gordura e, portanto, mais calóricas. Em resposta a estas mudanças houve um aumento das enfermidades crônicas e os principais fatores de risco estão relacionados à dieta e à atividade física^{4,12}.

Estudos realizados na década de 90 mostram que nos países do ocidente a gordura consumida diariamente correspondia de 35 a 45% da energia total da dieta (80 a 150 g/dia); os ácidos graxos saturados contribuíam com cerca de 13% (30 g/dia) e os *trans* de 1,0 a 2,5% (2,5-5,5 g/dia)^{13,14}. Entretanto, as recomendações da OMS é que a gordura total da dieta não exceda a 30% da energia, os AGS não passem de 10% e os *trans* contribuam com menos que 1% desta energia (até 2 g por dia)^{2,4}.

■ A informação nutricional como estratégia de prevenção das doenças crônicas

As doenças crônicas oneram o sistema de saúde e atingem uma grande parte da população economicamente ativa. Em função disto, os países membros da OMS têm interesse de adotar políticas eficazes e sustentáveis para prevenir estas enfermidades. As informações nutricionais na rotulagem têm facilitado aos consumidores conhecerem as propriedades nutricionais dos alimentos sendo uma estratégia da Organização Mundial de Saúde no combate às doenças crônicas³.

A Comissão do *Codex Alimentarius*, criada em 1962 pela OMS, tem como objetivos estabelecer padrões para os alimentos, protegendo assim a saúde do consumidor e incentivando práticas justas no comércio internacional. Esta comissão recomenda que a declaração dos nutrientes na rotulagem seja voluntária. A declaração obrigatória deve ser feita para aqueles alimentos cujos rótulos apresentem alguma alusão ou apelo nutricional e alimentos para fins especiais. Diversos países têm adotado esta orientação, principalmente os da Europa. Outros países, considerando a condição de saúde de sua população, têm adotado a rotulagem obrigatória, sendo que este grupo tem aumentado².

As legislações em diversos países do mundo têm exigido maior detalhamento na rotulagem dos alimentos sobre determinados grupos de ácidos graxos, como por exemplo, os ácidos graxos saturados e *trans*, os quais estão

relacionados com o risco de doenças cardiovasculares, além do nível de ácidos graxos essenciais^{1,4,15,16,17, 18}.

Israel e os Estados Unidos, em 1993, foram os primeiros países a exigirem a declaração de nutrientes na rotulagem dos alimentos embalados. Esta exigência entrou em vigor no Brasil a partir de setembro de 2001¹⁶. Outros países como Nova Zelândia, Canadá e Malásia adotaram a declaração obrigatória sendo que a partir de 2006 tal exigência foi estendida aos países do Mercosul, além do Brasil^{2,19}.

Com relação à declaração de ácidos graxos *trans*, esta passou a ser obrigatória nos Estados Unidos desde julho de 2003 e a partir de dezembro do mesmo ano, no Brasil e países do Mercosul^{1,5}. Na Dinamarca, em 2004, foi estabelecida uma legislação limitando a 2% os níveis de AGT, obtidos por processos industriais, nos alimentos comercializados naquele país²⁰. Em 2005, na cidade de Nova York, Estados Unidos, o Departamento de Saúde e Higiene Mental passou a exigir dos restaurantes e fornecedores de alimentos que eliminassem de suas cozinhas as gorduras vegetais parcialmente hidrogenadas (GVPH), principais fontes de AGT provenientes de processo industrial, visando produzir alimentos livres destes ácidos graxos¹².

■ Legislação brasileira sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados

A política de Alimentação e Nutrição do Ministério da Saúde (MS) brasileiro, em sintonia com os objetivos da OMS, é voltada para a redução da prevalência das doenças nutricionais e orientação para o consumo de alimentos saudáveis. A partir de 2001 passou a vigorar a resolução RDC 40/01 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Ministério da Saúde Brasileiro, com exigências de declarações de rotulagem nutricional¹⁶. Esta foi substituída pela RDC nº 360/03, que é uma legislação harmonizada entre os países do Mercosul. Nela consta a exigência da declaração de valor energético e teores de carboidratos, proteínas, gorduras totais, gorduras saturadas, gorduras *trans*, fibra alimentar e sódio. Empresas de alimentos, brasileiras e do Mercosul, tiveram como prazo até 31 de julho de 2006 para se adequarem¹⁹.

Abaixo são relacionados alguns pontos importantes que foram estabelecidos pela legislação em vigor:

- A obrigatoriedade da Informação Nutricional do valor energético (Kcal e KJ), carboidratos, proteínas, gorduras totais, gorduras saturadas, gorduras *trans*, fibra alimentar e sódio.

- A padronização dos rótulos para facilitar a leitura e o entendimento das informações pelo consumidor.
- Tolerância:
 1. É admitida uma tolerância de 20% com relação aos valores de nutrientes declarados no rótulo.
 2. Para os produtos que contenham micronutrientes em quantidade superior a tolerância estabelecida no item anterior, a empresa responsável deve manter a disposição os estudos que justifiquem tal variação.
- A informação Nutricional deve ser apresentada na porção e em medidas caseiras. Pela legislação em vigor não é obrigatória a declaração em 100 g ou 100 mL do produto.
- Todas as informações contidas nos rótulos dos alimentos devem ser apresentadas em porções.
- Porção é a quantidade média do alimento que deveria ser consumida por pessoas saudáveis, maiores de 36 meses de idade em cada ocasião de consumo, com a finalidade de promover uma alimentação saudável. Esta definição consta na RDC 359/03 da Anvisa/MS que apresenta o Regulamento Técnico de Porções de Alimentos para fins de Rotulagem Nutricional¹⁷.

A tolerância de 20 % estabelecida para o valor declarado no rótulo é ainda um ponto que merece discussão e maior clareza na definição, considerando principalmente os teores dos nutrientes. No regulamento técnico dos Estados Unidos, sobre informação nutricional, é prevista também uma tolerância de variação até 20% (para mais) com relação à declaração no rótulo de gordura total e gordura saturada. Entretanto, é enfatizado que nenhuma ação administrativa será fundamentada em resultados superiores àquela margem, quando é reconhecida uma variabilidade superior para os nutrientes, pelos métodos analíticos usuais, no nível de concentração considerado. Com relação aos ácidos graxos mono (AGM) e poli-insaturados (AGP) o teor do nutriente deve ser pelo menos igual a 80% do valor declarado no rótulo¹⁸.

Pela legislação brasileira em vigor, os teores de ácidos graxos saturados e *trans* podem ser declarados como zero, quando presentes no alimento em quantidade menor ou igual a 0,2 g na porção. Para gordura total, o teor é considerado não significativo, ou zero, quando menor ou igual a 0,5 g na porção do alimento e nenhum outro tipo de gordura seja declarado com quantidades superiores a zero¹.

Quanto aos ácidos graxos monoinsaturados ou poli-insaturados e o teor de colesterol, a declaração na rotulagem dos alimentos tem caráter opcional segundo

a Portaria 27/98, da ANVISA/MS, a qual dispõe sobre a informação nutricional complementar, entretanto, quando são apresentados apelos na embalagem, relativos à presença destes nutrientes no alimento, a declaração na rotulagem é obrigatória. Alegações para ácidos graxos *trans* tais como: “zero *trans*”, “livre de *trans*” e outras, previstas na Portaria nº 27/98 podem ser utilizadas desde que o alimento pronto para o consumo atenda às seguintes condições: máximo de 0,2 g de gordura *trans* por porção¹⁵. Como uma recomendação complementar da ANVISA o alimento deve conter também no máximo 2 g de gordura saturada por porção²¹. Aos laboratórios brasileiros credenciados cabe, por meio da análise, verificar tais teores declarados.

Cabe também ressaltar, que a não obrigatoriedade da declaração do nutriente em 100 g do produto pode induzir o consumidor a engano, pois muitas vezes a quantidade consumida é maior que a porção sugerida, acarretando uma ingestão significativa de AGT.

■ **Determinação de gordura total (GT) e ácidos graxos (AG) nos alimentos**

Um dos objetivos da determinação de GT (ou lipídios) e da composição de AG nos alimentos é gerar dados para a informação nutricional. Dependendo da legislação sobre rotulagem nutricional em vigor em cada país, teremos diferentes definições para a GT que deve constar na rotulagem nutricional dos alimentos.

Na legislação Brasileira a gordura total (GT), para fins de rotulagem nutricional, é definida como o conjunto de substâncias de origem vegetal ou animal, formada de triacilglicerol (TAG) e pequenas quantidades de não glicerídios, principalmente fosfolipídios¹. Já pelas legislações dos Estados Unidos e Canadá, a GT é a soma dos ácidos graxos (AG) das diferentes classes de lipídios expressa como TAG. Esta definição limita o que é considerado gordura para fins de rotulagem nutricional¹⁸. Os ácidos graxos saturados (AGS), mono, poli-insaturados e *trans* (AGT) devem ser expressos como ácidos graxos livres, de acordo com as três legislações.

A legislação brasileira não especifica metodologias analíticas para a determinação de GT e de AG que farão parte da informação nutricional. A técnica de cromatografia em fase gasosa é a recomendada para a análise de rotina de ácidos graxos²². Quanto à determinação de gordura total, pela definição da legislação brasileira, diferentes metodologias podem ser aplicadas^{23,24,25}. Portanto a determinação da GT e, conseqüentemente, dos AG estará

sujeita a variações que dependerão da metodologia analítica. Trabalhos atuais têm reforçado esta premissa. Aued-Pimentel e colaboradores²⁶ em um estudo realizado com amostras de alimentos de referência (leite, ovo, bolacha de chocolate, pudim de baunilha), evidenciaram diferenças significativas quanto aos teores de GT, AGS, AGP e AGT quando aplicados diferentes procedimentos analíticos. Kus, Aued-Pimentel e Mancini-Filho (2009)²⁷, em outro estudo realizado com fórmula infantil, também mostraram que o método de extração de lipídios influenciou de maneira significativa na quantificação final dos lipídios totais e ácidos graxos poli-insaturados naquele produto.

Lobanco e colaboradores (2009)²⁸ avaliando 153 alimentos industrializados, comercializados no município de São Paulo (SP) entre os anos de 2001 e 2005, observaram grande porcentagem de inconformidades relativa ao conteúdo de gordura saturada obtido em laboratório e o declarado pelo fabricante na rotulagem. Os autores apontam como um dos fatores que, provavelmente, contribuíram para tal discrepância os diferentes métodos empregados pelos laboratórios.

Com relação aos métodos analíticos, três etapas são críticas: extração e quantificação dos lipídios, preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos a partir dos lipídios extraídos e quantificação dos AG.

■ **Extração e quantificação dos lipídios totais**

A extração de lipídios é uma etapa importante no estudo nutricional dos alimentos e, especialmente, na determinação da composição de ácidos graxos. A preparação da amostra para esta determinação deve ser cuidadosa sendo que em alguns procedimentos e matrizes pode ocorrer a co-extração dos não lipídios, oxidação indesejada, perda dos compostos mais voláteis e dificuldade de extração dos lipídios ligados a outras moléculas, influenciando na qualidade final do óleo, e no perfil de ácidos graxos^{23,24,25,29}.

A quantificação dos lipídios dos alimentos é realizada, tradicionalmente, por extração com solventes orgânicos e determinação gravimétrica. A habilidade de recuperar os vários componentes dos lipídios varia com o solvente de extração. A ampla faixa de polaridade dos lipídios, os diferentes tipos de ligações e energias fazem com que a escolha do solvente seja uma tarefa difícil. Os solventes mais utilizados são: éter etílico, éter de petróleo e clorofórmio-metanol. Todos estes solventes extraem triacilgliceróis. O éter etílico e o de petróleo extraem

mono, di e triacilgliceróis, esteróis e ácidos graxos. Solventes mais polares, como a mistura de clorofórmio e metanol, também extraem lipídios polares como fosfolipídios, esteróis, terpenos, ceras, hidrocarbonetos e outros componentes não lipídicos^{7,23,29,30}.

Os métodos que empregam a mistura clorofórmio metanol, como por exemplo, o de Bligh e Dyer (1959)³¹ e de Folch, Lees, Stanley (1957)³², são reconhecidos como os mais adequados para a extração de todos os componentes dos lipídios, sendo que o extrato obtido pode ser empregado para a caracterização das frações^{7,33,34}. Nestes métodos, as proporções entre os solventes de extração, massa da amostra e solventes, o modo de preparação da amostra, o tempo de agitação, o teor de gordura, água e o tipo de produtos, são críticos, influenciando a eficiência de extração^{35,36,37}.

Para facilitar a extração dos lipídios ligados a outros componentes dos alimentos, as matrizes alimentares são frequentemente tratadas. Estes tratamentos incluem hidrólises ácida, básica, mista ou enzimática, secagens, pré-lavagens, entre outros^{7,23,24,25}.

Os métodos que envolvem hidrólise ácida tendem a decompor os fosfolipídios e, possivelmente, os triacilgliceróis, dependendo da concentração do ácido utilizado. A hidrólise ácida, seguida da extração com éter de petróleo, extrai os lipídios neutros e também pode extrair outros constituintes que não compõem a gordura, tais como: glicerol, carboidratos de baixo peso molecular e seus produtos de polimerização, aminoácidos e sais de ureia. Os resultados obtidos por este método normalmente superestimam o valor da gordura total, comprometendo, também, a avaliação da composição de ácidos graxos dos alimentos^{23,34}.

Apesar de existirem métodos analíticos de extração de lipídios recomendados para certas classes de alimentos, estes estão em constante avaliação devido a grande variedade de produtos lançados no mercado, elaborados com novas tecnologias (por exemplo, o micro-encapsulamento de nutrientes), e contendo variados aditivos, o que certamente interfere na extração dos lipídios.

Nos Estados Unidos, a partir do estabelecimento, em 1990, da lei sobre educação nutricional e rotulagem dos alimentos⁶, uma força tarefa organizada pela "Association of Official Analytical Chemists", AOAC, reconheceu alguns métodos que deveriam ser aplicados para análise de gordura em diferentes matrizes alimentares para fins de rotulagem nutricional, mas considerou que tais métodos deveriam ser aperfeiçoados³⁰. Foi adotada

uma definição química para gordura, para fins de rotulagem nutricional, a qual limita o que é quantificado, evitando, assim, o emprego de diferentes metodologias que forneçam resultados muito discrepantes²⁸. Foram desenvolvidos métodos hidrolíticos de extração de lipídios e ácidos graxos do alimento e de determinação da gordura total, por cálculo matemático, a partir dos AG obtidos por CG/DIC. O método AOAC 996.01 (1996) foi avaliado e adotado como oficial para a determinação de gordura e ácidos graxos para produtos a base de cereais contendo de 0,5 a 13% de GT^{7,38}. O método AOAC 996.06, semelhante ao anterior, foi desenvolvido para a extração e determinação da gordura total dos alimentos em geral, a partir da análise de ácidos graxos por CG/DIC^{7,39,40}.

Algumas técnicas mais modernas de extração de gordura têm sido propostas para reduzir significativamente o tempo e o consumo de solvente e fornecer resultados equivalentes. Entre estas técnicas, destacam-se a extração acelerada com solvente (EAS), a extração com fluido supercrítico (EFSC), a extração dinâmica por ultra-som e com auxílio de microondas^{25,41}. Entretanto, a desvantagem destes métodos é a necessidade de otimizar as variáveis que influenciam na extração para cada tipo de produto, uma vez que os teores de gordura e de água dos alimentos afetam a eficiência de extração^{29,41}.

Nas análises de rotina de muitos laboratórios brasileiros dois tipos de extração de gordura são empregados, visando gerar dados para a informação da rotulagem nutricional. Uma delas objetiva a determinação da GT do alimento e a outra a de AG. Para determinação da composição dos AG emprega-se extração a frio como no método de Bligh e Dyer, utilizando a mistura de solventes de extração clorofórmio/metanol, ou éter etílico visando não alterar a gordura original do alimento e, portanto, os AG^{28,31}. Este procedimento de trabalho, entretanto, implica em maior tempo de análise e exposição do analista, custos com solventes, materiais, energia, entre outros.

A Tabela 1 apresenta um resumo sobre os principais métodos convencionais de extração de lipídios, campo de aplicação, vantagens e limitações.

Preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos

A análise por cromatografia em fase gasosa dos ácidos graxos, livres ou ligados aos diferentes componentes lipídicos dos alimentos, requer sua prévia transformação em derivados mais voláteis e, normalmente, são preparados ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAG).

Tabela 1. Métodos convencionais de extração de lipídios: princípio, campo de aplicação, vantagens e limitações^{7,23,24,25,29,30,32,33}.

Método	Princípio	Campo de aplicação/ métodos oficiais	Vantagens	Limitações
Extração com éter etílico ou de petróleo/ gravimetria	Extração por passagem contínua ou intermitente de solvente na amostra em equipamento como Soxhlet	Sementes oleaginosas AOAC 948.22 Produtos cárneos AOAC 960.39 Cereais AOAC 945.18 A Manteiga AOAC 938.06 Rações AOAC 920.39B,C	Automação Boa repetitividade Padronização	Procedimento demorado Não extrai lipídios polares Não aplicado a alimentos com muita umidade Subestima teor de gordura total
Extração a frio com clorofórmio/ metanol/ gravimetria	Extração baseada nos métodos de: Folch, Lees e Stanley (1957) Clorofórmio:Metanol (2:1) solvente/amostra 20:1 Bligh e Dyer (1959) Clorofórmio:Metanol:água (1:2:0,8)	Tecidos biológicos (produtos cárneos, ovos, produtos lácteos). Qualquer alimento que não possua metodologia estabelecida: AOAC 983.23, AOAC 969.24.	Extração de lipídios neutros e polares Preservação de AG de baixo PM e poli-insaturados	Procedimento demorado. Co-extração de proteínas Proporções entre os solventes e amostra são críticas Solventes tóxicos Custos - descarte de resíduos
Hidrólise ácida/ extração com solventes/ gravimetria	Hidrólise com aquecimento e extração com solventes (éter petróleo e/ou etílico)	Produtos de cacau AOAC 963.15 Ovos AOAC 925.32 Molhos AOAC 950.54 Farinhas pães e produtos de panificação AOAC 922.06 Macarrão AOAC 925, 12; 935.39D; 935.38 Frutos do mar AOAC 948.15 e outros	Métodos oficiais Boa repetitividade Extração de lipídios neutros e polares	Procedimento demorado Hidrólise de TAG e FL Extração de compostos não lipídicos (glicerol, carboidratos de baixo PM, e produtos de polimerização) Emprego de ácidos fortes Comprometimento de ácidos graxos com sítios reativos (insaturações)
Hidrólise alcalina/ extração com solventes/ gravimetria	Hidrólise com NH ₄ OH etanólico/ extração com éter de petróleo+éter etílico/gravimetria. (Mojonier ou Roese Gottlieb)	Leite e produtos lácteos AOAC 989.05 AOAC 905.02 AOAC 932.06	Método oficial Extração de lipídios neutros e polares	Hidrólise de TAG Perda de componentes dos lipídios na fase aquosa

As reações de derivação são geralmente catalisadas por ácidos (Ex: trifluoreto de Boro (BF_3)), ou bases, e envolvem os processos de hidrólise e esterificação (normalmente metilação) ou transesterificação. Os ésteres metílicos se formam a partir de: 1) ácidos graxos livres em meio ácido ou com diazometano (esterificação); 2) ácidos graxos ligados a lipídios por ligações ésteres, (triacilgliceróis, fosfolipídios) em meio ácido ou básico e, 3) ácidos graxos ligados a grupamento N-acila em lipídios complexos em meio ácido⁴².

São descritos muitos procedimentos e cada método possui vantagens e limitações, dependendo das características da gordura a ser analisada, como apresentado na Tabela 2.

Com o intuito de abreviar o tempo de reação, pode ser feita uma transesterificação direta na presença de catalisadores básicos (NaOH , KOH , metóxido de sódio) ou ácidos (HCl , H_2SO_4 , BF_3). Entretanto, a reação não ocorre para ácidos graxos livres e, no caso da catálise básica, pode não esterificar óleos e gorduras com alta acidez^{42, 43}. Por outro lado, a transesterificação alcalina ocorre em condições mais amenas de temperatura e tempo reduzido. Este procedimento tem sido aplicado na preparação de EMAG de gordura de leite, produto com quantidade considerável de ácidos graxos saturados voláteis e de baixo peso molecular⁴²; de EMAG ciclopropenídicos que são grupamentos altamente lábeis⁴⁴, em óleos vegetais refinados^{45,46,47} e também na análise de produtos alimentícios diversos, mostrando resultados comparáveis a procedimentos com catálise mista⁴⁸.

Nas reações com catálise ácida pode ocorrer isomerização de ácidos graxos insaturados, principalmente os conjugados, quebra de grupamentos reativos como os grupos ciclopropenídicos, além dos processos em meio ácido necessitem de aquecimento, o que pode comprometer os ácidos graxos de baixo peso molecular presentes, por exemplo, na gordura do leite⁴².

Os métodos mais eficientes de preparação dos EMAG empregam os dois tratamentos, ácido e básico, como o procedimento de Hartman e Lago⁴⁹, amplamente utilizado nos laboratórios brasileiros.

Na literatura, são descritos procedimentos de transesterificação direta (*in situ*) sem extração prévia de gordura, para pequenas quantidades de amostras de óleos vegetais, gorduras dos alimentos, tecidos ou fluidos biológicos^{41,50,51,52}. Os procedimentos consistem da mistura da amostra com os reagentes de esterificação, aqueles já utilizados para a reação nos lipídios previamente extraídos,

tais como: cloreto metanólico de hidrogênio; metóxido de sódio metanólico, hidróxido de sódio metanólico e solução de BF_3 ^{41,50,51,52,53}. O método AOCS Ce 1k-07, utiliza hidrólise alcalina e metilação com BF_3 metanólico e aplica-se a matrizes contendo óleos vegetais (alimentos, bebidas, tecidos e óleos), mas não se aplica a produtos lácteos e gorduras de animais ruminantes⁵². Nestes procedimentos diretos há economia de tempo de análise e solventes, pois ocorre a síntese de ésteres de ácidos graxos por extração e derivação simultâneas. A diminuição na manipulação da amostra contribui para diminuir o erro experimental. Por outro lado, o teor de água dos alimentos, a tomada de amostra, a escolha dos reagentes (catalisador) e as condições da análise, como por exemplo a temperatura, são fatores decisivos na eficiência das reações diretas^{41,51}.

■ Determinação de AG em produtos alimentícios

A evolução da técnica de cromatografia em fase gasosa está diretamente associada com a análise de ácidos graxos. James e Martin (1952)⁵⁴ foram os primeiros a separar uma série de ácidos graxos voláteis em um cromatógrafo a gás com coluna empacotada.

A partir dos anos 70, os teores de ácidos graxos dos alimentos passaram a ser determinados por cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama. A base para a separação dos componentes na CG é a partição da amostra no estado de vapor entre duas fases, uma fase estacionária (FE) (sólida ou líquida) e uma fase gasosa móvel. Na separação de ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAG) as FE mais adequadas são de polímeros polares como poliésteres (Carbowax 20M) e cianosiliconas (SP 2340, SP 2560). Após a separação, na coluna cromatográfica, os componentes são direcionados ao sistema de detecção. Na análise de EMAG, normalmente, é empregado um detector de ionização de chama⁵⁵.

Os teores dos EMAG eram inicialmente expressos em porcentagens de área ou massa no total de ésteres metílicos. Esta é uma maneira simplificada de apresentar a concentração dos componentes sem a empregar cálculos mais complexos ou padrões de alta pureza

Entretanto, a necessidade de expressar o teor dos ácidos graxos em gramas por cem gramas do alimento, principalmente nos estudos nutricionais, levou a publicação, na década de 70, de vários trabalhos pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (U.S.D.A) sobre os dados analíticos de lipídios e ácidos graxos de diversas classes de alimentos. Os dados foram levantados, para diferentes produtos, isto é, lácteos,

Tabela 2. Principais reagentes para preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos, vantagens e limitações^{31,34,41,42,48,49,53}.

Reagente/ catalisador	Grupos de moléculas esterificadas	Vantagens	Limitações
5% HCl anidro em metanol Ácido	Ácidos graxos livres ou ligados ao glicerol ou colesterol	Reagente eficiente na esterificação	Não derivam ácidos graxos ligados a amidas Tempo longo de reação e aquecimento Destroi grupos funcionais ligados aos ácidos graxos tais como: epóxi, ciclopropano e ciclopropeno
NaOH 0,5N/ NH ₄ Cl/ metanol/H ₂ SO ₄ (Hartman e Lago ⁴⁹) Ácido/básico	Ácidos graxos livres ou ligados ao glicerol ou colesterol	Reagente barato, procedimento rápido e simples Tempo e temperatura reduzidos	Não derivam todos os componentes ligados aos ácidos graxos Destroi grupos funcionais ligados aos ácidos graxos tais como: epóxi, ciclopropano e ciclopropeno
Metanol + H ₂ SO ₄ (1-2%) Ácido	Ácidos graxos livres ou ligados ao glicerol ou colesterol	Reagente barato e eficiente na esterificação	Tempo longo de reação e aquecimento. Pode alterar os ácidos graxos poli-insaturados Destroi grupos funcionais ligados aos ácidos graxos tais como: epóxi, ciclopropano e ciclopropeno
BF ₃ / metanol (7% - 14%) + NaOH metanol 0,5N Ácido/Básico	Ácidos graxos livres ou ligados ao glicerol ou colesterol.	Método Oficial AOAC AOCS	Reagente instável. e tóxico Não derivam todos os componentes ligados aos ácidos graxos Formação de produtos secundários Tempo longo de reação e aquecimento
KOH/ metanol 2M Básica	Ácidos graxos ligados ao glicerol Transesterificação	Reação rápida e a frio Preserva AG de baixo peso molecular, poliinsaturados, cíclicos e conjugados poli-insaturados	Saponificação de ácidos graxos de baixo peso molecular Não se aplica a ácidos graxos livres Não se aplica a óleos com acidez alta
Metóxido de sódio (NaOCH ₃) Básica	Ácidos graxos ligados ao glicerol. Básica Transesterificação	Preserva AG de baixo peso molecular, poliinsaturados, cíclicos e conjugados poli-insaturados	Não se aplica a ácidos graxos livres e ligados a amidas (esfingolípídios). Não se aplica a gorduras com acidez alta

ovos e derivados, sementes oleaginosas, sopas, óleos e gorduras, carne suína e derivados, carne bovina, cereais, entre outros^{56,57}. Foram calculados fatores apropriados que ponderam a contribuição das diferentes frações dos lipídios (ex: triacilgliceróis, fosfolipídios) no fornecimento dos ácidos graxos nos alimentos. Desta forma foi calculado um fator de conversão médio aplicável ao total de lipídios^{56,57}. Para expressar o conteúdo de AG em gramas por cem gramas do alimento a porcentagens de área ou massa no total de ésteres metílicos, obtido na análise por CG, deve ser multiplicada pelo teor de lipídios do alimento e pelo fator de conversão médio teórico. Na Tabela 3 encontram-se os fatores teóricos para diferentes classes de alimentos^{31,56}.

Tabela 3. Fatores de conversão teóricos de gordura para ácidos graxos em diferentes alimentos⁵⁶.

Alimento	Fator g de ácidos graxos/ g de lipídios
Óleos, gorduras e sementes oleaginosas	0,956
Produtos lácteos	0,945
Ovos	0,830
Frutas e vegetais	0,800
Carnes gordas bovina, suína e ovina	0,953
Carne magra bovina e ovina	0,916
Carne magra suína	0,910
Carne de frango	0,945
Carne gorda de peixe	0,900
Carne magra de peixe	0,700

Dependendo do alimento, os lipídios terão diferentes quantidades de triacilgliceróis, fosfolipídios e outros componentes que fornecerão teores variados de ácidos graxos⁵⁶. Os lipídios de óleos, gorduras e sementes oleaginosas são constituídos essencialmente de TAG, os quais contêm cerca de 0,956g de ácidos graxos por grama de gordura. Por outro lado, os lipídios de diversos alimentos, como os ovos e os produtos cárneos, contêm quantidades consideráveis das outras frações lipídicas. Na

gordura do ovo encontramos, por exemplo, cerca de 65% TAG e 29% de fosfolipídios (FL), sendo que um grama de FL contém, em média, 0,720 g de AG. Sendo assim, um grama dos lipídios do ovo terá cerca de 0,62 g de AG, provindos dos TAG e cerca de 0,21g dos FL⁵⁸. Na elaboração de tabelas de composição de alimentos de vários países são empregados aqueles fatores de conversão teóricos.

A demanda de informações mais precisas sobre o conteúdo dos ácidos graxos nos alimentos, aliada a uma maior disponibilidade de padrões e a evolução nas tecnologias das colunas e equipamentos de CG, tem proporcionado um maior rigor quantitativo dos métodos oficiais. Nestes, os EMAG são analisados por CG/DIC empregando colunas capilares, com fases estacionárias polares, e quantificados com padrão interno (PI). Dependendo das condições operacionais, das fases estacionárias e do comprimento da coluna cromatográfica, é possível obter a separação dos isômeros geométricos e de posição dos ácidos graxos^{31,51,59,60,61}.

O padrão interno é normalmente um EMAG (13:0, 11:0, 23:0) ou um TAG (13:0; 17:0, 19:0, 21:0, 23:0) com número ímpar de carbonos, uma vez que muitos destes não são encontrados na gordura dos alimentos. O cálculo da composição dos analitos de interesse é feito com relação à área e massa daqueles padrões. São empregados fatores de correção de resposta do detector de ionização de chama (DIC), experimentais ou teóricos^{7,31,51,59,60,61}.

Dependendo do tipo de cálculo adotado para a quantificação dos AG por CG/DIC podem-se gerar variações significativas dos resultados expressos em gramas por cem gramas do alimento^{26,27}. Realizar o cálculo por normalização de área empregando os fatores teóricos, como descrito acima, é uma maneira simplificada de apresentar a concentração dos componentes. Entretanto, os métodos quantitativos por normalização de área têm a desvantagem da propagação do erro, pois os resultados de todos os componentes estão correlacionados, e os teores são normalmente superestimados. Contudo, este é ainda um procedimento amplamente empregado nos laboratórios brasileiros^{31,26}.

O método mais acurado emprega PI e os fatores de correção de resposta do DIC são calculados, a fim de corrigir a não linearidade da resposta com a massa dos EMAG, principalmente, para aqueles de baixo peso molecular (menor que 12 átomos de carbono). Os fatores teóricos são calculados por uma fórmula, considerando a resposta proporcional à porcentagem relativa de carbonos ativos nas diversas moléculas. A utilização deste fator nos

cálculos requer uma prévia otimização das condições do cromatógrafo. Por outro lado, o fator de correção empírico ou experimental (FCE), considera tanto os desvios químicos como os instrumentais. Este é calculado a partir da análise de padrões de EMAG^{31,62,63}. O emprego de um outro fator de correção nos cálculos depende da recomendação do método oficial^{7,51,61}, e pode também gerar discrepâncias nos resultados^{26,64}.

■ Determinação de ácidos graxos *trans* (AGT)

As metodologias descritas na literatura para a análise dos ácidos graxos *trans* incluem: análise por espectroscopia no infravermelho com leitura em 966 cm^{-1} , onde ocorre absorção das insaturações que possuem hidrogênios na configuração *trans*. Por esta metodologia oficial são determinados os ácidos graxos *trans* totais, isto é, ligações duplas isoladas, entretanto sem diferenciar os isômeros, sendo apropriada para análise de óleos e gorduras contendo mais de 5% de ácidos graxos *trans*^{61,65}. O método envolve a preparação de EMAG e a varredura da amostra na região de $900\text{ a }1050\text{ cm}^{-1}$. A quantificação para teores de AGT inferiores a 5% é prejudicada em gorduras que contenham, por exemplo, ligações duplas *trans* de sistemas conjugadas e outros interferentes que alterem a região de absorção dos AGT. Avanços na técnica de infravermelho utilizando células, para atenuação da reflexão total, associada ao processamento matemático dos espectros por transformada de Fourier tem tornado possível a determinação dos AGT de forma mais rápida e/ou mais acurada^{22,65,66}. A ressonância magnética nuclear (RMN) também é utilizada para determinar ácidos graxos *trans* em gordura vegetal parcialmente hidrogenada (GVPH). Entretanto, trata-se de uma técnica cara e aplicada para níveis superiores a 3% de AGT⁶⁷.

As legislações atuais sobre rotulagem nutricional não exigem a diferenciação dos isômeros *trans*. Entretanto, devido às evidências científicas que alguns isômeros *trans* podem ser nutricionalmente ou fisiologicamente benéficos à saúde, tais como o isômero conjugado 18:2 (9*c*,11*t*) e seu precursor, o ácido *trans* vacênico 18:1(11*t*), o emprego de técnicas que permitam a separação dos vários componentes torna-se o mais apropriado⁶⁸.

■ Determinação de AG *cis/trans* por CG em colunas capilares

O método indicado para as análises de rotina de ácidos graxos, inclusive *trans*, devido à sensibilidade, ao custo e

por possibilitar a determinação de toda a composição de ácidos graxos em uma única corrida, emprega a técnica de cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama (CG/DIC). Para a separação dos isômeros são utilizadas colunas capilares de sílica fundida longas (100 m) com fases estacionárias de alta polaridade (ciano propil siloxano), com os nomes comerciais: SP 2560, CPSil 88, SP 2380, BPX 70, CP 7420^{51,61}. Entretanto, mesmo com a otimização dos parâmetros cromatográficos não é possível a resolução de todos os isômeros geométricos e de posição presentes numa amostra de GVPH ou gordura de animais ruminantes. Existem diferenças no desempenho da separação de componentes críticos, empregando colunas comerciais de 100 m de fabricantes diferentes ou mesmo entre as colunas de mesmo fabricante, mas de diferentes lotes. Fatores como gás de arraste e quantidade de amostra injetada na coluna influenciam também no desempenho da separação^{65,68}. A separação dos isômeros geométricos e de posição presentes numa amostra de GVPH ou gordura de animais ruminantes pode ser otimizada em análise prévia por cromatografia em camada delgada ou cromatografia líquida de alta eficiência com íon prata para fracionar os diversos isômeros. Os íons de prata formam complexos com os ácidos graxos insaturados possibilitando o fracionamento. O ponto desfavorável desta associação de técnicas é o tempo elevado de análise, não sendo apropriado nos procedimentos rotineiros^{22,65,68}.

■ Isômeros do ácido octadecenóico (18:1)

Os isômeros do ácido octadecenóico são os mais abundantes e em maior número nas GVPH e de animais ruminantes. A adequada separação destes componentes é um ponto importante na definição da melhor metodologia de quantificação do total de ácidos graxos *trans*.

As colunas cromatográficas comerciais citadas anteriormente fornecem uma boa resolução (a partir da linha de base) para a maioria dos isômeros *cis* e *trans* do ácido octadecenóico presentes nas gorduras. Os isômeros *trans* encontrados naquelas gorduras são: 18:1(4*t*) a 18:1(16*t*) e o principal *cis* é o 18:1(9*c*), além de quantidades menores de 18:1(11*c*) a 18:1(16*c*). Considerando uma determinada posição da dupla ligação, os isômeros *trans* sempre eluem antes do correspondente isômero *cis* majoritário, nas colunas acima citadas^{45, 69,70}.

A extensão das sobreposições dos isômeros depende da fase estacionária, da concentração dos diferentes componentes da amostra, do comprimento, tipo, marca e até o lote da coluna capilar, além das temperaturas de ope-

ração do cromatógrafo a gás⁶⁵. As colunas de 100 m são as mais eficientes, sendo que a sobreposição dos isômeros pode ser minimizada. A otimização da temperatura de operação é fundamental para evitar co-eluições. Tem sido demonstrado que numa coluna SP 2560 aquecida a 180°C (isotérmica) obtém-se a melhor condição para determinação de ácidos graxos *trans* totais para fins de rotulagem nutricional em óleos vegetais e produtos que contenham gorduras parcialmente hidrogenadas⁶¹.

■ Isômeros dos ácidos octadecadienóico (18:2) e octadecatrienóico (18:3)

Os isômeros dos ácidos octadecadienóico (18:2) e octadecatrienóico (18:3) estão sempre presentes tanto nas GVPH como nas gorduras de animais ruminantes e nos óleos vegetais poli-insaturados refinados, porém em baixas concentrações. Para uma determinação mais exata dos isômeros *trans* nos alimentos é necessária a inclusão destes componentes. Os principais isômeros do ácido 18:2, presentes na GVPH, são: 9*t*,13*t*; 9*c*,12*t*; 9*t*,12*c*, podendo chegar a 6% na gordura submetida à hidrogenação moderada^{45,70,71}.

Os principais isômeros do ácido octadecatrienóico (18:3) estão presentes em menores quantidades nas gorduras. Os mais comuns são: 9*t*,12*c*,15*t*; 9*c*,12*c*,15*t*; 9*t*,12*t*,15*c*; 9*t*,12*c*,15*c* e 9*c*,12*c*,15*c* (ácido alfa-linolênico), sendo esta a ordem de eluição numa coluna com FE de cianopropil siloxano. Em algumas programações, dependendo da temperatura da coluna de 100 m, da diluição da amostra e da quantidade dos componentes no óleo ou gordura, o ácido eicosaenóico 20:1 (11*c*), presente em pequenas quantidades em óleos vegetais, pode eluir antes ou depois do ácido alfa linolenico (18:3 (9*c*,12*c*,15*c*)) ou mesmo coeluirem. A análise isotérmica a 180°C, em coluna SP 2560 ou equivalente, é a que tem apresentado a melhor separação para aquele par crítico de ácidos graxos^{45,61,68,69}.

Os principais isômeros *cis/trans* formados, no caso dos óleos vegetais refinados poli-insaturados, são 18:2 e 18:3, principalmente quando se empregam temperaturas de desodorização altas (230-250°C)⁷⁰. Os níveis destes ácidos variam normalmente entre 0-2% e os teores obtidos são muitas vezes utilizados na avaliação do processamento ou como critério de rejeição de produto nas transações comerciais. A análise nesta faixa de concentração requer a otimização dos parâmetros analíticos tais como: tipo e temperatura da coluna, quantidade de amostra injetada, parâmetros de processamento dos picos como mínima

área, visando detectar picos com cerca de 0,01% (% p/p de ésteres metílicos)^{71,72}.

■ Ácidos graxos da gordura de animais ruminantes

A gordura de animais ruminantes contém AGT, porém com características diferentes da GVPH. Quando comparado a GVPH, o número de isômeros é inferior e as sobreposições ocorrem em menor extensão (principalmente do 18:1). Dentre as gorduras de animais ruminantes, a dos produtos lácteos são as mais complexas. Podem conter centenas de ácidos graxos, isto é, saturados de 4 a 24 átomos de carbono, monoinsaturados, poli-insaturados, ramificados e diversos isômeros *trans*, principalmente do 18:1 além dos isômeros conjugados do ácido linoleico (CLA). Face às evidências benéficas à saúde destes últimos componentes e à variedade de matrizes alimentares disponíveis, tem sido necessário o desenvolvimento de métodos adequados à quantificação dos diversos ácidos graxos na mesma corrida. Kramer, Blackadar, Zhou⁷³, realizaram um estudo bastante minucioso, comparando o desempenho de duas colunas cromatográficas, uma de alta polaridade (FE cianopropil siloxano) e longa (CP Sil 88, 100 m) e outra mais curta com polaridade inferior (Supelcowax 10 de 60 m, FE polietilenoglicol) para separação de ácidos de baixo peso molecular, isômeros *cis/trans*, inclusive CLA, em gordura de leite de vaca. Neste estudo ficou bastante evidente que colunas longas (100 m), e de alta polaridade, como CP Sil 88 ou SP 2560, são as mais eficientes para a separação de uma ampla gama de ácidos graxos que estão presentes na gordura do leite, inclusive os isômeros *cis/trans*.

Destailats et al⁷⁴ compararam diferentes técnicas para a determinação de AGT, especialmente o total dos isômeros *trans* 18:1 e o *trans* vacênico (18:1 11*t*), em gordura de animais ruminantes. Aqueles pesquisadores, por intermédio da otimização da análise direta por CG/DIC, em coluna de 100 m, CP Sil 88, obtiveram resultados similares às outras técnicas que empregam fracionamento prévio dos isômeros tais como CCD e CLAE com íons de prata e posterior análise por CG/DIC.

Golay et al⁵⁰, validaram uma metodologia para a determinação de ácidos graxos em produtos lácteos, inclusive *trans*, na qual não é necessária a extração prévia da gordura e a transesterificação dos lipídios é feita diretamente. As condições da análise cromatográfica também foram otimizadas, para evitar o fracionamento previamente dos isômeros *cis/trans* por CCD.

Em 2007 a AOCS publicou uma metodologia oficial (AOCS Ce 1j-07) para a determinação de ácidos

graxos, inclusive *trans* em gorduras lácteas e de animais ruminantes⁵², levando em conta as condições analíticas estabelecidas nos trabalhos de Kramer, Blackadar, Zhou⁷³ e Golay et al⁵⁰.

Considerando que uma única técnica cromatográfica não é capaz de resolver todos os EMAG da gordura láctea, alternativas mais modernas como as técnicas de cromatografia multidimensional têm sido propostas para melhorar esta separação. Neste tipo de técnica são empregadas combinações de colunas com fases estacionárias de diferentes polaridades e tamanhos e são moduladas as concentrações dos analitos a serem analisados, sendo apropriada para amostras com analitos em concentrações bem diversas⁷⁵.

■ Determinação de GT e AG *cis/trans* visando à informação nutricional na rotulagem dos alimentos

Uma vez que as legislações sobre rotulagem nutricional não especificam a metodologia analítica para a determinação de ácidos graxos *trans*, vários grupos de pesquisa têm se empenhado em estabelecer procedimentos rápidos e confiáveis, aplicáveis a um grande número de amostras, isto é, óleos refinados, produtos lácteos e produtos alimentícios que contenham gordura hidrogenada. Este é um grande desafio analítico, uma vez que a natureza e nível de concentração dos isômeros presentes são bastante variados.

A aplicabilidade dos métodos AOAC 996.01 e 996.06, para determinação de GT e AG, visando à informação na rotulagem nutricional tem sido comprovada para diversas matrizes de alimentos com variadas quantidades de gordura^{26,76-80}.

Um grupo de pesquisadores do FDA (Food and Drug Administration), dos Estados Unidos, da Divisão de Rotulagem Nutricional, modificou o método oficial AOAC 996.01 originalmente desenvolvido para análise de ácidos graxos em produtos derivados de cereais. O método foi empregado na quantificação dos AG, incluindo os *trans*, em materiais certificados (fórmulas infantis)^{78,79} e em uma grande variedade de produtos⁸⁰.

De Vries et al.⁸¹ propuseram alterações no método AOAC 996.06, as quais prevêem a utilização de colunas cromatográficas mais longas (SP 2560, 100 m), e de um número maior de padrões cromatográficos de EMAG para a separação e identificação dos componentes, além da utilização da técnica de cromatografia gasosa com detector de massas (CG/DM) para confirmar a identidade de ácidos graxos. Neste trabalho sugeriu-se a introdução

de tabelas com valores de retenção relativa dos AG e recomenda-se que a coluna empregada seja capaz de resolver os picos adjacentes 20:1/18:3 e 22:1/20:3/20:4, com valores de resolução mínima de 1,0. Estas recomendações foram introduzidas no método AOAC 996.06 na revisão publicada em 2001. Rozena et al. (2008) propuseram novas modificações no método visando principalmente otimizar a separação dos AGT⁸².

Vários métodos oficiais da American Oil Chemists Society foram publicados considerando o cálculo da gordura total a partir dos ácidos graxos obtidos por CG/DIC, com fins para a informação nutricional. O método AOCS Ce1h-05 (2005) foi desenvolvido por um grupo de especialistas de indústrias e laboratórios do Estados Unidos com o apoio do Food and Drug Administration (FDA) e do Ministério da Saúde do Canadá. Está no campo de aplicação a determinação de ácidos graxos *cis/trans* em amostras de GVPH e em óleos vegetais refinados, não sendo indicado para a determinação daqueles ácidos graxos em outras gorduras como a de animais ruminantes. O método AOCS Ce 1j-07 (2007) é aplicado à análise de gorduras lácteas e de outros animais ruminantes.

Tendo em vista a globalização dos mercados, os países que adotam a declaração obrigatória de GT e AG nos rótulos dos produtos embalados, como o Brasil, devem buscar a padronização dos métodos analíticos. Adicionalmente, é fundamental aprofundar os conhecimentos sobre os métodos oficiais recomendados pela AOAC e AOCS para a informação nutricional, uma vez que a Comissão do *Codex Alimentarius* tem proposto o endosso de métodos como o AOAC 996.06 para a determinação de GT e dos ácidos graxos saturados nos alimentos e o AOCS Ce 1h-05 para a quantificação de ácidos graxos poli-insaturados e *trans*⁸³, no caso de disputas comerciais entre países.

CONCLUSÃO

Os aspectos abordados nesta revisão evidenciam a grande influência que o conjunto de variáveis escolhidas nos procedimentos de análise e quantificação de lipídios totais e ácidos graxos exercem nos valores obtidos, culminando em distorções sérias apresentadas nos rótulos dos produtos alimentícios disponíveis no mercado. Tais evidências reforçam a necessidade de padronização das metodologias analíticas nos laboratórios brasileiros, o que é primordial para uma informação mais uniforme e

exata ao consumidor, garantido o seu direito de escolha de alimentos saudáveis, além de favorecer a inserção dos produtos brasileiros no mercado internacional.

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Dispõe sobre o Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, p.33-4, . 26 de dez. 2003. Seção 1.
2. Hawke C. Nutrition labels and health claims: the global regulatory environment. Geneva: World Health Organization; 2004.
3. Organización Mundial de la Salud - OMS -. Estrategia mundial sobre régimen alimentario, actividad física e salud. 57º Asamblea Mundial de la Salud Ginebra; 2004 (WHA 57.17).
4. Organización Mundial de la Salud. – OMS. Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas. Ginebra; 2003 (Serie de informes técnicos. 916).
5. Federal Register, Washington, Food and Drug Administration, Food labeling: *trans* fatty acids in nutrition labeling; consumer research to consider nutrient content and health claims and possible footnote or disclosure statements. Final rule and proposed rule. Acesso em: 12 out. 2003. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov>.
6. Federal Register, Washington, Food and Drug Administration. Nutritional and Labeling Educational Act. NLEA. 1990; 55, 29487.
7. Official Methods of Analysis of AOAC. 18th ed., Gaithersburg: AOAC International, 2005.
8. Fahy E, Subramaniam S, Brown HA, Glass CK, Merrill AH, Murphy RC et al. A comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res* 2005; 46:840-61.
9. Curi R, Pompeia C, Miyasaka CK, Procópio J. Entendendo as gorduras – os ácidos graxos. 1ª ed., São Paulo: Ed. Manole 2002 580p.
10. Simopoulos AP. Evolutionary aspects of diet the omega6/omega3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. *Biomed Pharm* 2006; 60:502-507.
11. Ascherio A, Katan MB, Stampfer MJ, Willet WC. *Trans* fatty acids and coronary heart disease. *N Engl J Med*. 1999; 340:1994–8.
12. Mozaffarian D, Katan MB, Ascherio A, Stampfer MJ, Willett, WC. *Trans* fatty acids and cardiovascular disease. *N Eng J Med* 2006; 354:1601-13.
13. Martinez TLR, Santos RD, Armaganijan D, Torres KP, Loure-Vale A, Magalhães ME et al. National alert campaign about increased cholesterol, determination of cholesterol levels in 81,262 Brazilians. *Arq Bras Cardiol*. 2003; 80:635-8.
14. Hulshof K, Erp-Baart MA, Anttolainen M, Becker W, Church SM, Couet C et al. Intake of fat and fatty acids in Western Europe with emphasis on *trans* fatty acids: the transfair study. *Eur J Clin Nutr* 1999; 53,143-57.
15. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 27 de 13 de janeiro de 1998. Aprova regulamento técnico referente à Informação nutricional complementar (declarações relacionadas ao conteúdo de nutrientes), constantes do anexo desta portaria. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, p. 1 - E-4 de 16 de jan. 1998. Seção 1-E.
16. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 40, de 21 março de 2001. Dispõe sobre Regulamento Técnico Obrigatório sobre rotulagem nutricional de alimentos e bebidas embalados. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, p.22-5, 22 de mar. 2001. Seção 1.
17. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 359, de 23 dez. 2003. Dispõe sobre o regulamento técnico sobre porções de alimentos embalados para fins de rotulagem nutricional. . Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, p.34-7, 26 de dez. 2003. Seção 1.
18. Federal Register, Washington, Food and Drug Administration. Food labeling: mandatory status of nutrition labeling and nutrient content revision, format for nutritional label. Part 101- Food labeling. 1993; 58: 2175-205.
19. Mancini-Filho J, Takemoto E, Aued-Pimentel S. Parâmetros de identidade e qualidade de óleos e gorduras. In: Almeida-Muradian LB, Penteado MVC. Vigilância sanitária: tópicos sobre legislação e análise de alimentos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2007 p. 81-107.
20. Leth T, Jensen HG, Mikkelsen AE, Bysted A. The effect of the regulation on *trans* fatty acid content in Danish food. *Atherosclerosis (Suppl)* 2006; 7:53-6.
21. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA [Sistema de Perguntas e Respostas]. Gordura *trans* FAQ 1571. [Acesso em 16 set 2007]. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/faqdinamica>.
22. Mossoba MM, Kramer JKG, Delmonte P, Yurawecz MP, Rader JL. Official methods for the determination of *trans* fat. Champaign: AOCS press 2003.
23. Carpenter DM, Ngeh-Ngwainbi J, Lee S. Lipid Analysis. In: Carpenter DE, Sullivan DM. Methods of analysis for nutritional labeling. Arlington: AOAC International 1993 p 85-104.
24. Antoniassi R, Lago RCA. Lipid Extraction from different Matrices. In: International workshop on fats, oils and oilseed analysis. Rio de Janeiro: IUPAC 2000. p.160-8.
25. Lago RC, Piombo G, Antoniassi R. Lipid extraction from different matrices. In: IUPAC/AOCS Workshop on fats oils and oilseeds, analysis and production. Tunis, Tunísia. 6-8 dez. Conferência. 2004.
26. Aued-Pimentel S, Kus MMM, Kumagai EE, Ruvieri V, Zenebon O. Comparison of gas chromatographic and gravimetric methods for quantization of total fat and fatty acids in foodstuffs. *Química Nova* (no prelo, on-line).
27. Kus MMM, Aued-Pimentel S, Mancini-Filho J. Comparação de metodologias analíticas para a determinação de lipídios e ácidos graxos poli-insaturados por cromatografia gasosa em fórmula infantil. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2009; 68 (1):12-20.
28. Lobanco CM, Vedovato GM, Cano C, Bastos DHM. Fidedignidade de rótulos de alimentos comercializados no município de São Paulo, SP *Rev Saúde Pública* 2009; 43:499-505.
29. Lutheia DL. Oil extraction and analysis. Critical issues and comparative studies, Champaign (IL): AOCS press 2004.
30. Report of the AOAC International task forces on methods for nutrient labeling analysis. *J AOAC*. 1993; 76:180A-201A.
31. 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.
32. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid. Extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*. 1959; 37:911-7.

33. Folch J, Lees M, Stanley GHS. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 1957; 226: 497-509.
34. Christie WW. The lipid library. 2006 [Acesso em: 11 nov. 2006] Disponível em: <http://www.lipidlibrary.co.uk/infores/lipids.htm>.
35. Pérez-Palacio T, Ruiz J, Martín D, Murial E, Antequera T. Comparison of different methods for total lipid quantification in meat and meat products. *Food Chemistry*. 2008; 110: 1025-9.
36. Iverson SJ, Lang SLC, Cooper MH. Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue. *Lipids*. 2001; 36:1283 -7.
37. Ametaj BN, Bobe G, Lu Y, Young JW, Beitz DC. Effect of sample preparation, length of time and sample size on quantification of total lipids from bovine liver. *J Agric Food Chem*. 2003; 51:2105- 10.
38. Ngeh-Ngwainbi J, Lin J, Chandler A. Determination of total, saturated, unsaturated, and monounsaturated fats in cereal products by acid hydrolysis and capillary gas chromatography: collaborative study. *J AOAC Int*. 1997; 80:359-72.
39. House SD, Larson PA, Johnson RR, DeVries JW, Martin DL. Gas chromatographic determination of total fat extracted from food samples using hydrolysis in the presence of antioxidants. *JAOAC Int*. 1994; 77:960-5.
40. House SD. Determination of total, saturated and monounsaturated fats in foodstuffs by hydrolytic extraction and gas chromatographic quantitation: collaborative study. *JAOAC Int* .1997; 80:555-563.
41. Carrapiso AI, Garcia C. Development in lipid analysis: some new extraction techniques and in *situ* transesterification. *Lipids*. 2000; 35:1167-77.
42. Christie WW. Preparation of esters derivatives of fatty acids for chromatographic analysis. In: *Advances in lipid methodology – two*. 1993 p.69-111. [Acesso em: 05 out.2004]. Disponível em: <http://www.lipid.co.uk/infores/topics/methests/index.htm>.
43. Kramer JKG, Fellner V, Dugan MER, Sauer FD, Massoba MM, Yurawecz MP. Evaluating acid and base catalysis in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total *trans* fatty acids. *Lipids* 1997 32:1220-8.
44. Aued-Pimentel S, Lago JHG, Chaves MH, Kumagai EE. Evaluation of a methylation procedure to determine cyclopropenoids fatty acids from *Sterculia striata* st. *Hil. et Nauds* seed oil. *J Chromatogr A*. 2004; 1054: 235-9.
45. Ratnayake WMN. Overview of methods for the determination of *trans* fatty acids by gas chromatography, silver-ion thin layer chromatography, silver-ion liquid chromatography and gas chromatography/mass spectrometry. *JAOAC Int*. 2004; 87: 523-39.
46. Aued-Pimentel S, Kumagai EE, Kus MMM, Caruso MSF, Tavares M, Zenebon O. Ácidos graxos *trans* em óleos vegetais poli-insaturados refinados comercializados no Estado de São Paulo, Brasil. *Ciênc Tecnol Alim* 2009 29:646-51.
47. Milinsk MC, Matsushita M, Visentainer JV, Oliveira CC, Souza NE. Comparative Analysis of Eight Esterification Methods in the Quantitative Determination of Vegetable Oil Fatty Acid Methyl Esters (FAME) *J Braz Chem Soc*. 2008; 19:1475-83.
48. Aued-Pimentel S, Caruso MSF, Kumagai EE, Ruvieri V, Zenebon O. Ácidos graxos saturados em produtos alimentícios: comparação de procedimentos na análise por cromatografia em fase gasosa. *Rev Inst Adolfo Lutz* .2005; 64:167-72.
49. Hartman L, Lago RCA. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Lab Prac*. 1973; 22: 475-6.
50. Golay PA, Dionisi F, Hug B, Giuffrida F, Destailats F. Direct quantification of fatty acids in dairy powders with special emphasis on *trans* fatty acid content. *Food Chemistry*. 2006; 101:1115-20.
51. Mazalli MR, Bragagnolo N. Validation of two methods for fatty acids analysis in eggs. *Lipids*. 2007; 55:2743-8.
52. Official methods and recommended practices of the AOCS. 5th ed, Champaign (IL): AOCS. Additions and revisions 2007-2008. Method Ce 1k-07, Method Ce 1j-07
53. ISO - International Organization for Standardization. Animal and vegetable fats and oils Preparation of methyl ester of fatty acids (ISO 5508). Switzerland: ISO;1990.
54. James AT, Martin AJP Gas liquid partition chromatography: the separation and micro estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid. *Biochem J*. 1952; 50:679-90.
55. Lanças FM. Cromatografia em fase gasosa. São Paulo: Acta;1993.
56. Mc Cance, Widdowson's editors. The composition of food. 6thed. Cambridge: Royal Society of Chemistry 2002.
57. 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.
58. Posati LP, Kinsella JE, Watt BK. Comprehensive evaluation of fatty acids in food. III. Egg and egg products. *J Am Diet Assoc*. 1975 67:111-5.
59. International Organization for Standardization – ISO. Animal and vegetable fats and oils. Analysis by gas chromatography of methyl esters of fatty acids (ISO 5509E). Switzerland: ISO 1978.
60. International Organization for Standardization – ISO. Animal and vegetable fats and oils. Determination of the content of *trans* fatty acid isomers of vegetable fats and oils. Gas chromatographic method (ISO15304(E)). 2 ed. Switzerland: ISO 2002.
61. Official methods and recommended practices of the AOCS. 5th ed, Champaign (IL): AOCS. Additions and revisions 1999-2006. Method Ce 1h-05. Method Cd 14d 99. Method Cd 14-95.
62. Ackman RG, Sipos JC. Application of specific response factors in the gas chromatographic analysis of methyl esters of fatty acids with flame ionization detector. *J Am Oil Chem Soc*. 1964; 41:377-8.
63. Bannon CD, Graske JD, Hillker AE. Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability V. Validation of theoretical relative response factors of unsaturated esters in the flame ionization detector. *J Am Oil Chem Soc*. 1986; 63:105-10.
64. Schreiner M. Quantification of long chain polyunsaturated fatty acids by gas chromatography. Evaluation of factors affecting accuracy. *J Chromatogr A*. 2005; 1095:126-30.
65. Mosoba M, Kramer J. Official Methods for Determination of *Trans* fat. 2nd ed, Champaign: AOCS press 2009.
66. Kodali DR, List GR. *Trans* fat alternatives. Champaign: AOCS press; 2005.
67. Miyake Y, Yokomizo K. Determination of *cis*- and *trans*-18:1 fatty acid isomers in hydrogenated vegetable oils by high-resolution carbon nuclear magnetic resonance. *J Am Oil Chem Soc*. 1998; 75: 801-5.
68. Cruz-Hernandez C, Deng Z, Zhou J, Hill AR, Yurawecz MP, Delmonte P, Mossoba MM, Dugan MER, Kramer JKG. Methods for analysis of conjugated linoleic acids and *trans*-18:1 isomers in dairy fats by using a combination of gas chromatography, silver-ion thin layer chromatography/gas chromatography, and silver-ion liquid chromatography. *JAOAC Int*. 2004; 87: 545-62.

69. Ratnayake WMN, Plouffe LJ, Pasquier E, Gagnon C. Temperature sensitive resolution of partially hydrogenated vegetable oils on SP-2560 and SP-Sil 88 capillary columns. *JAOAC Int.* 2002; 85:1112-8.
70. Ratnayake WMN, Hansen SL, Kennedy MP. Evaluation of the CP-Sil 88 and SP-2560 GC columns used in the recently approved AOCS official method Ce 1h-05: determination of *cis-trans* -,saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids in vegetable or non-ruminant animal oils and fats by capillary GLC method. *J Am Oil Chem Soc.* 2006; 83:475-88.
71. Ceriani R, Meirelles AJA. Formation of *trans* PUFA during deodorization of canola oil: a study through computational simulation. *Chem Eng Proc.* 2007; 46:775-85.
72. Buchgraber M, Ulberth F. Determination of low level *trans* unsaturation in physically refined vegetable oils by capillary GLC - results of 3 intercomparison studies. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2002; 104: 792-99.
73. Kramer JKG, Blackadar CB, Zhou J. Evaluation of two GC columns (60-m SUPELCOWAX 10 and 100 m CP-Sil 88) for analysis of milkfat with emphasis on CLA, 18:1, C18:2 and C18:3 isomers, and short- and long-chain FA. *Lipids.* 2002; 37: 823-35.
74. Destailats F, Golay PA, Joffre F, Wispelaere M, Hug B, Giuffrida F et al. Comparison of available analytical methods to measure *trans*-octadecenoic acid isomeric profile and content by gas-liquid chromatography in milk fat. *J Chromatogr A.* 2007;1145:222-8.
75. Vlaeminck B, Harynuk J, Fievez V, Marriott P. Comprehensive two-dimensional gas chromatography for the separation of fatty acids in milk. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2007; 109: 757-66.
76. Ali LH, Angyal G, Weaker CM, Rader JI. Comparison of capillary column gas chromatographic and AOAC gravimetric procedures for total fat and distribution of fatty acids in food. *Food Chemistry.* 1997; 58:149-160.
77. Rader JI, Anguila G, O'Dell RG, Weaver CM, Sheppard AJ, Bueno P. Determination of total fat and saturated fat in foods by packed column gas-liquid chromatography after acid hydrolysis. *Food Chemistry.* 1995; 54:419-27.
78. Satchithanandam S, Fritsche J, Rader JI. Extension of AOAC Official Method 996.01 to the analysis of standard reference material (SRM) 1846 and infant formulas. *JAOAC Int.* 2001; 84:805-14.
79. Satchithanandam S, Fritsche J, Rader JI. Gas chromatographic analysis of infant formulas for total fatty acids, including *trans* fatty acids. *J AOAC Int.* 2002; 85:86-94.
80. Satchithanandam S, Carolyn J, Oles Spease CJ, Brandt MM, Yurawecz MP, Rader JI. *Trans*, Saturated, and Unsaturated Fat in Foods in the United States Prior to Mandatory *Trans*-Fat Labeling. *Lipids.* 2004; 39:11-8.
81. De Vries JW, Kjos L, Grof L, Martin B, Cernohous K, Patel H et al. Studies in improvement of Official Method 996.06. *JAOAC Int.*1999; 82:1146-55.
82. Rozena B, Mitchell B, Winters D, Kohn A, Sullivan D, Meinholz E. Proposed modifications to AOAC 996.06, optimizing the determination of *trans* fatty acids: presentation of data. *JAOAC Int.* 2008; 92: 92-7.
83. *Codex Alimentarius* Commission. Report of the the twenty eighth session of the *Codex* Committee on methods of analysis and sampling. Budapest, Hungary. 5-9 March, 2007.

Diagnóstico de infecção por vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos 1 (HTLV-1) e -2 (HTLV-2) em população de risco: passado, presente e futuro

Diagnosis of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and type 2 (HTLV-2) infection in at-risk populations: past, present and future

RIALA6/1206

Adele CATERINO-DE-ARAÚJO*

*Endereço para correspondência: Seção de Imunologia, Divisão de Biologia Médica, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil, Av. Dr. Arnaldo, 351, CEP 01246-902, e-mail: caterino@ial.sp.gov.br
Recebido: 26.05.2009 – Aceito para publicação: 02.07.2009

RESUMO

O Brasil é o país com o maior número de pessoas infectadas pelos vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos 1 e -2 (HTLV-1 e HTLV-2) com mais de 2,5 milhões de indivíduos infectados. Em 1993, a realização de testes sorológicos específicos tornou-se obrigatória em Bancos de Sangue. O HTLV-1 causa leucemia/linfoma de células T do adulto e mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical além de outras doenças, enquanto o HTLV-2 pode causar alguns quadros neurológicos e alterar a evolução de HIV/Aids. Os testes sorológicos que identificam anticorpos específicos disponíveis no mercado têm falhado no diagnóstico, principalmente de infecção por HTLV-2. Vários algoritmos de testes de triagem e confirmatórios têm sido propostos, mas nenhum deles se mostrou 100% eficiente com casuística de alto risco. Muitos soros resultam em padrão indeterminado no Western blot, e os isolados virais utilizados na composição dos kits podem ser a causa desses resultados. As técnicas de biologia molecular têm sido descritas como testes confirmatórios, mas não têm sido empregadas na rotina. Desde 1991, a Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz tem estudado a infecção por HTLV-1/2, contribuindo para o diagnóstico sorológico e molecular, e tem como desafio implantar um teste laboratorial capaz de detectar infecção causada por cepas brasileiras de HTLV-2.

Palavras-chave. vírus linfotrópicos de células T humanas tipo 1 (HTLV-1); vírus linfotrópicos de células T humanas tipo 2 (HTLV-2); diagnóstico laboratorial; sorologia; ensaio imunoenzimático (EIA); Western blot (WB); reação em cadeia da polimerase (PCR).

ABSTRACT

Brazil presents the major number of human T lymphotropic virus type 1 and type 2 (HTLV-1 and HTLV-2) infections worldwide, with more than 2.5 million infected individuals. In 1993, HTLV serology was considered mandatory in blood banks. HTLV-1 causes adult T-cell leukemia and mielopathy associated with HTLV-1/tropical spastic paraparesis, in addition to other diseases. HTLV-2 has been pointed as the cause of some neurological manifestations and to interfere in HIV/AIDS progression. Commercially available serological assays, which identify specific antibodies, lack in correctly diagnosing, mostly for HTLV-2 infection. Several screening and confirmatory testing algorithm for HTLV-1/2 infections have been proposed, but none of them showed 100% efficiency in diagnosing high-risk individuals. Remarkable number of sera has resulted in indeterminate Western blot, and this could be a consequence of the viruses isolates employed for the kits composition. It has been proposed the use of molecular assays as confirmatory test, but they have not been employed in routine yet. Since 1991, the Immunology Department of Instituto Adolfo Lutz has led to carrying out the serological and molecular studies on HTLV-1/2 infections, and presently it has a challenge for improving the laboratory diagnosis of HTLV-2.

Key words. human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1); human T-cell lymphotropic virus type 2 (HTLV-2); diagnosis; serology; enzyme immunoassay (EIA); Western blot (WB); polymerase chain reaction (PCR)

INTRODUÇÃO

Em 1983, o Instituto Adolfo Lutz (IAL) de São Paulo foi convidado a participar de um Programa de Controle, Diagnóstico e Prevenção da AIDS denominado Programa Especial de Dermatologia Sanitária (PEDS) da Secretaria de Estado da Saúde e coube à Seção de Imunologia deste Instituto o diagnóstico imunológico de casos suspeitos desta infecção/doença. Com os 110 primeiros casos suspeitos de Aids foi possível realizar um trabalho de Dissertação de Mestrado defendida na Escola Paulista de Medicina (EPM/UNIFESP) em 1986¹⁻², e implantar a quantificação de células CD4+/CD8+ na rotina diagnóstica deste Instituto³⁻⁴.

No ano de 1991, com a experiência adquirida no estudo do HIV/Aids, teve início a pesquisa de outros retrovírus: vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos 1 e -2 (HTLV-1 e HTLV-2), que compartilhavam as mesmas vias de transmissão/aquisição do HIV. Inicialmente, foram realizados estudos de soroprevalência buscando detectar anticorpos anti-HTLV-1/2 em pacientes infectados pelo HIV/Aids atendidos no Instituto de Infectologia Emílio Ribas⁵⁻⁷ e em Centro de Testagem Anônima de São Paulo (COAS)⁸. Naquela época, foram utilizados ensaios imunoenzimáticos comerciais (EIA) de 1ª geração que continham na fase sólida lisado viral do HTLV-1. Posteriormente, foram acrescentados lisado viral do HTLV-2, proteínas recombinantes e/ou peptídeos sintéticos e usada técnica indireta de pesquisa de anticorpos⁷⁻¹⁰. Mais recentemente, foram disponibilizados os EIAs de 3ª geração que usam o princípio do sanduíche¹¹.

Os testes sorológicos confirmatórios iniciais foram o Western blot (WB) e a imunofluorescência indireta (IFI), sendo a IFI um teste "in house"¹² e o WB disponível no mercado. Várias versões do WB foram feitas, inicialmente usando lisado viral do HTLV-1, posteriormente acrescentando-se proteína recombinante dos envelopes dos HTLV-1 e -2 [rgp46-I (MTA-1) e rgp46-II (K-55)] e uma proteína recombinante transmembrana comum aos HTLVs (rgp21e), e finalmente uma versão melhorada da rgp21e denominada GD21 (WB 2.4, Genelabs Diagnostics, Singapore)¹³⁻¹⁹. No entanto, apesar das modificações observou-se falha no diagnóstico sorológico de casos verdadeiramente infectados pelo HTLV-2⁷⁻²⁰⁻²³.

Com o passar dos anos e usando técnicas de biologia molecular, foi possível detectar um subtipo

diferente de HTLV-2 circulando no Brasil. A princípio pensou-se em uma variante do HTLV-2a, mas com estudos mais detalhados foi constatado tratar-se de um subtipo diferente, denominado HTLV-2c²⁴⁻²⁷. Este subtipo viral ocorre de forma endêmica em populações indígenas da Amazônia brasileira e em usuários de drogas endovenosas, HIV positivos ou não de regiões urbanas do Brasil²⁸⁻³¹.

Junto aos trabalhos de pesquisa sobre a infecção por HTLV conduzidos na Seção de Imunologia do IAL durante estes anos [três Dissertações de Mestrado defendidas³²⁻³⁴, um Projeto de Pós-Doutorado no Exterior (FAPESP 94/13315-8), além de vários trabalhos publicados]^{7-8,21,23,35-42}, foi oferecida a sorologia para a pesquisa de anticorpos anti-HTLV-1/2 como rotina para Unidades de Saúde que atendem pacientes do SUS. Isto vem sendo feito desde dezembro de 1998, sendo a clientela principalmente de Centros de Referência e Treinamento em AIDS (CRT-AIDS) de São Paulo e de Ambulatórios de Especialidades do SUS.

Uma análise detalhada desta prestação de serviço mostrou que: primeiro, apesar dos kits EIA de 3ª geração usarem a técnica de sanduíche e serem capazes de detectar anticorpos de todas as classes de imunoglobulinas, eles ainda não são suficientemente eficientes para detectar todos os casos de infecção por HTLV-2 no Brasil³⁸⁻³⁹. Segundo, tanto o HTLV-1 como o HTLV-2 circulam em São Paulo, com maior número de casos positivos para o HTLV-1 em Ambulatórios de Especialidades do SUS³⁸. Terceiro, há um número grande de casos que, mesmo após o teste confirmatório de WB, continuam sendo classificados como indeterminados para a infecção por HTLV-1/2 e isto se manteve com o passar dos anos⁴⁰. Quarto: há necessidade de se utilizarem dois kits de princípios e composição antigênica diferentes para a triagem sorológica de infecção por HTLV em população de risco de São Paulo e provavelmente de toda a América Latina³⁸⁻⁴¹. Quinto, os kits de 3ª geração, embora mais sensíveis que os de gerações anteriores, se mostraram menos específicos havendo necessidade de se determinar o "cutoff" ótimo para cada kit EIA usando análise ROC (*receiver operating characteristics*)⁴².

Em relação ao teste confirmatório de WB, o fato é que o kit disponível no mercado (WB 2.4, Genelabs Diagnostics, Singapore) foi produzido com cepas isoladas de casos japoneses e norte-americanos de infecção por HTLV-1 e -2¹⁷⁻¹⁹ e não tem mostrado bom desempenho com cepas de HTLV-2 brasileiras. Vários estudos conduzidos no Brasil e no exterior mostraram falha do

WB no diagnóstico de infecção por HTLV-2 em casos verdadeiramente positivos, confirmados por IFI e pela reação em cadeia da polimerase (PCR) ^{7,20-23}.

Nos anos de 1994 a 1997, pesquisadores da Seção de Imunologia do IAL realizaram estudos em colaboração com pesquisadores italianos e verificaram diferenças nas sequências de DNA de várias regiões do genoma de isolados de HTLV-2 brasileiros (obtidos de pacientes coinfectados pelo HIV/Aids de São Paulo) em relação aos protótipos internacionais (MoT e NRA) ⁴¹⁻⁴². Sugeriram que alterações no envelope viral poderiam ser as responsáveis pelos resultados indeterminados obtidos no WB 2.4 ⁴¹. Mais recentemente, usando casuística do norte do estado do Paraná foram observados casos com padrão indeterminado ao WB que estavam infectados pelo HTLV-2 e que foram confirmados e subtipados pelas técnicas de PCR e RFLP (*restriction fragment length polymorphism analysis*) ^{33,36}.

Em relação aos HTLV-1 que circulam no Brasil, estes pertencem ao grupo Cosmopolita, subgrupos A ou transcontinental e, B ou Japonês ^{42,44-46}. Não se tem observado dificuldades no diagnóstico de infecção por HTLV-1 no Brasil e no mundo, sendo possível utilizar na triagem sorológica e na confirmação diagnóstica os kits disponíveis no comércio.

Em populações de baixa prevalência de infecção por HTLV-1/2 (doadores de sangue, por exemplo), a triagem com um único teste EIA parece ser suficiente. No entanto, quando se trata de população de risco que apresenta maior número casos de infecção por HTLV-2 (pessoas HIV positivas, usuários de drogas endovenosas, índios da Amazônia, entre outros), o melhor esquema de triagem bem como o melhor teste confirmatório ainda está por ser definido. Para se ter uma ideia de custo/benefício, cada tira de WB custa cerca de US\$ 240,00 e 30% da população de alto risco continua resultando sorologia indeterminada ao teste de WB.

Junte-se a tudo o que foi comentado o fato do Brasil despontar como o país com o maior número de pessoas soropositivas para a infecção por HTLV-1/2 com mais de 2,5 milhões de infectados e sua sorologia ser obrigatória em Bancos de Sangue desde 1993 ⁴⁷. Apesar de somente 5% dos casos de infecção por HTLV-1 evoluírem para ATL e HAM/TSP, a gravidade dessas doenças (alta morbidade e mortalidade) e o grande número de infectados torna importante seu diagnóstico diferencial. Recentemente, a infecção por HTLV-2 em indivíduos coinfectados pelo HIV foi apontada como responsável por progressão lenta

da Aids, provavelmente pela produção de quimiocinas (MIP-1 alfa ou CCL3L1) que interferem nos receptores CCR5 (correceptores para o HIV) impedindo a penetração do HIV na célula hospedeira ⁴⁸⁻⁴⁹. Porém, mais estudos são necessários para confirmar esta associação.

Concluindo, estudo de cepas de HTLV-2 brasileiras, da resposta imune induzida por estas cepas e de um teste confirmatório de infecção por HTLV-2 são os desafios que se impõem para o futuro para a Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz.

REFERÊNCIAS

1. Adele Caterino de Araujo. Avaliação *in vitro* da resposta imune mediada por células na síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS) [Dissertação de Mestrado]. São Paulo, Brasil: Escola Paulista de Medicina, 1985. 136 pp.
2. Eles ajudaram a construir. Bandeiras positivas - uma revista do Programa Estadual de DST/Aids - SP. Ano I. Edição 1, Novembro 2008. p. 10-5
3. Araujo AC. Cell-mediated immunity in the Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Brazilian J Med Biol Res*. 1987; 20: 579-82.
4. Caterino-de-Araujo A, Santos-Fortuna E, Ueda M. Quantification of lymphocyte subsets in AIDS associated with suspected cytomegalovirus infection. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 1990; 50(1): 285-90.
5. Caterino-de-Araujo A, Casseb JSR, Neitzert E, Xavier de Souza ML, Mammano F, Del Mistro A, De Rossi A, Chieco-Bianchi L. Prevalência de infecção pelos HTLV-1 e HTLV-2 em pacientes infectados pelo HIV/AIDS em São Paulo, Brasil. In: Zacarias F and Weissenbacher M (eds). *Inventário de Recursos de Pesquisa em SIDA em América Latina e o Caribe*, PAHO, 1991-1994. p.98
6. Duarte AJS, Casseb JSR, Caterino-de-Araujo A. Prevalência de infecção pelo HTLV-1/II em indivíduos portadores do vírus HIV em São Paulo. In: Zacarias F and Weissenbacher M (eds). *Inventário de Recursos de Pesquisa em SIDA em América Latina e o Caribe*, PAHO, 1991-1994. p.104.
7. de-Araujo AC, Casseb JSR, Neitzert E, Xavier de Souza ML, Mammano F, Del Mistro A, De Rossi A, Chieco-Bianchi L. HTLV-1 and HTLV-2 infections among HIV-1 seropositive patients in São Paulo, Brazil. *Eur J Epidemiol*. 1994; 10: 165-71.
8. Casseb J, Caterino-de-Araujo A, Hong MA, Salomão S, Gallo D, Hendry RM, Duarte AJS. Prevalence of HTLV-1 and HTLV-2 infections among HIV-1-infected asymptomatic individuals in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1997; 39(4): 213-5.
9. Hartley TM, Malone GE, Khabbaz RF, Lal RB, Kaplan JE. Evaluation of a recombinant human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-1) p21E antibody detection enzyme immunoassay as a supplementary test in HTLV-1/II antibody testing algorithms. *J Clin Microbiol*. 1991; 29(6): 1125-7.
10. Horal P, Hall WW, Svennerholm B, Lycke J, Jeansson S, Rymo L, Kaplan MH, Vahlne A. Identification of type-specific linear epitopes in the glycoproteins gp46 and gp21 of human T- cell leukemia viruses type I and type II using synthetic peptides. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88: 5754-8.

11. Andersson S, Thorstensson R, Godoy Ramirez K, Krook A, von Sydow M, Dias F, Biberfeld G. Comparative evaluation of 14 immunoassays for detection of antibodies to the human T-lymphotropic virus types I and II using panels of sera from Sweden and West Africa. *Transfusion*. 1999; 39: 845-51.
12. Gallo D, Penning LM, Hanson CV. Detection and differentiation of antibodies to human T-cell lymphotropic virus types I and II by the immunofluorescence method. *J Clin Microbiol*. 1991; 29(10): 2345-7.
13. Matsushita S, Robert-Guroff M, Trepel J, Cossman J, Mitsuya H, Broder S. Human monoclonal antibody directed against an envelope glycoprotein of human T-cell leukemia virus type I. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986; 83: 2672-6.
14. Lillehoj EP, Alexander SS, Dubrulle CJ, Wiktor S, Adams R, Tai C-C, Manns A, Blattner WA. Development and evaluation of a human T-cell leukemia virus type I serologic confirmatory assay incorporation a recombinant envelop polypeptide. *J Clin Microbiol*. 1990; 28(12): 2653-8.
15. Lal RB, Brodine S, Kazura J, Mbidde-Katonga E, Yanagihara R, Roberts C. Sensitivity and specificity of a recombinant transmembrane glycoprotein (rgp21)-spiked western immunoblot for serological confirmation of human T-cell lymphotropic virus type I and type II infections. *J Clin Microbiol*. 1992; 30(2): 296-9.
16. Hadlock KG, Lipka JJ, Chow TP, Fong SKH, Reyes GR. Cloning and analysis of a recombinant antigen containing an epitope specific for human T-cell lymphotropic virus type II. *Blood*. 1992; 79(10): 2789-96.
17. Lipka JJ, Miyishi I, Hadlock KG, Reyes GR, Chow TP, Blattner WA, Shaw GM, Hanson CV, Gallo D, Chan L, Fong SKH. Segregation of human T cell lymphotropic virus type I and II infections by antibody reactivity to unique viral epitopes. *J Infect Dis*. 1992; 165: 268-72.
18. Roberts BD, Fong SKH, Lipka JJ, Kaplan JE, Hadlock KG, Reyes GR, Chan L, Heneine W, Khabbaz RF. Evaluation of an immunoblot assay for serological confirmation and differentiation of human T-cell lymphotropic virus types I and II. *J Clin Microbiol*. 1993; 31(2): 260-4.
19. Varma M, Rudolph DL, Knuchel M, Switzer WM, Hadlock KG, Velligan M, Chan L, Fong SK, Lal RB. Enhanced specificity of truncated transmembrane protein for serologic confirmation of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 infections by western blot (immunoblot) assay containing recombinant envelope glycoproteins. *J Clin Microbiol*. 1995; 33(12): 3239-44.
20. Casseb J, Souza T, Pierre-Lima MT, Yeh E, Hendry RM, Gallo D. Testing problems in diagnosing HTLV infection among intravenous drug users with AIDS in São Paulo city, Brazil. *AIDS Res Hum Retrovir*. 1997; 13(18): 1639-41.
21. Caterino-de-Araujo A, Santos-Fortuna E, Zandoná-Meleiro MC, Suleiman J, Calabrò ML, Favero A, De Rossi A, Chieco-Bianchi L. Sensitivity of two ELISA tests in relation to western blot in detecting HTLV-1 and HTLV-2 infections among HIV-1-infected patients from São Paulo, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1998; 30(3): 173-82.
22. Gallo D, Diggs JL, Hanson CV. Evaluation of two commercial human T-cell lymphotropic virus western blot (immunoblot) kits with problems specimens. *J Clin Microbiol*. 1994; 32(9): 2046-9.
23. Morimoto HK, Morimoto AA, Reiche EMV, Ueda LT, Matsuo T, Reiche FV, Caterino-de-Araujo A. Difficulties in the diagnosis of HTLV-2 infection in HIV/AIDS patients from Brazil. Comparative performances of serologic and molecular assays, and detection of HTLV-2b subtype. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2007; 49(4): 225-30.
24. Ishak R, Harrington Jr WJ, Azevedo VN, Eiraku N, Ishak MO, Guerreiro JF, Santos SB, Kubo T, Monken C, Alexander S, et al. Identification of human T cell lymphotropic virus type IIa infection in the Kayapo, an indigenous population of Brazil. *AIDS Res hum Retrovir*. 1995; 11(7): 813-21.
25. Eiraku N, Novoa P, da Costa Ferreira M, Monken C, Ishak R, da Costa Ferreira O, Zhu SW, Lorenço R, Ishak M, Azvedo V, Guerreiro J, de Oliveira MP, Loureiro P, Hammerschlag N, Ijichi S, Hall WM. Identification and characterization of a new and distinct molecular subtype of human T-cell lymphotropic virus type 2. *J Virol*. 1996; 70(3): 1481-92.
26. Lal RB, Pardi D, Switzer W, Segurado A, Black F. Immune reactivity of HTLV-2a-infected Kayapo Indians with HTLV-2b extended tax epitope. *J Acquir Immune Defic Syndr hum Retrovir*. 1997; 14: 476-7.
27. Lewis MJ, Novoa P, Ishak R, Ishak M, Salemi M, Vandamme AM, Kaplan MH, Hall WW. Isolation, cloning, and complete nucleotide sequence of a phenotypically distinct Brazilian isolate of human T-lymphotropic virus type II (HTLV-2). *Virology*. 2000; 271(1): 142-54.
28. Shindo N, Alcantara LCJ, Van Dooren S, Salemi M, Costa MC, Kashima S, Covas DT, Teva A, Pellegrini M, Brito I, Vandamme AM, Galvão-Castro B. Human retroviruses (HIV and HTLV) in Brazilian Indians: seroepidemiological study and molecular epidemiology of HTLV type 2 isolates. *Aids Res hum Retrovir*. 2002; 18(1): 71-7.
29. Ishak R, Vallinoto ACR, Azevedo VN, Ishak MQ. Epidemiological aspects of retrovirus (HTLV) infection among Indian populations in the Amazon Region of Brazil. *Cadern Saúde públ (Rio de J.)*. 2003; 19: 109-14.
30. Alcantara LCJ, Shindo N, Van Doren S, Salemi M, Costa MC, Kashima S, Covas DT, Vandamme AM, Galvão-Castro B. Brazilian HTLV type 2a strains from intravenous drug users (IDUs) appear to have originated from two sources: Brazilian Amerindians and European/North American IDUs. *AIDS Res hum Retrovir*. 2003; 19(6): 519-23.
31. Laurentino R, Lopes IGL, Azevedo VN, Machado LF, Moreira MR, Lobato L, Ishak MO, Ishak R, Vallinoto AC. Molecular characterization of human T-cell lymphotropic virus coinfecting human immunodeficiency virus 1 infected patients in the Amazon region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005; 100(4): 371-6.
32. Casseb J. Prevalência de anticorpos anti-HTLV-1 e anti-HTLV-2 em indivíduos infectados pelo HIV-1 em São Paulo, SP. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Universidade de São Paulo. 1995. 64 pp.
33. Morimoto HK. Infecção pelos vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos I (HTLV-1) e II (HTLV-2) em indivíduos portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) na região de Londrina. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Universidade de São Paulo. 2003. 171 pp.
34. Jacob F. Levantamento do perfil sorológico de infecção pelos vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos 1 e 2 (HTLV-1 e HTLV-2) em casuística encaminhada ao Instituto Adolfo Lutz de São Paulo para análise. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. 2007. 108 pp.

35. Caterino-de-Araujo A, Santos-Fortuna E. No evidence of vertical transmission of HTLV-1 and HTLV-2 in children at high risk for HIV-1 infection from São Paulo, Brazil. *J Trop Pediatr*. 1999; 45: 42-7.
36. Morimoto HK, Caterino-de-Araujo A, Morimoto AA, Reiche EMV, Ueda LT, Matsuo T, Stegmann JW, Reiche FV. Seroprevalence and risk factors for human T-cell lymphotropic virus type 1 and 2 infection in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients attending AIDS Referral Center Health Units in Londrina and other communities in Paraná, Brazil. *AIDS Res hum Retrovir*. 2005; 21(4): 256-62.
37. Caterino-de-Araujo A, Santos-Fortuna E, Magri MC, Schuelter-Trevisol F, Silva MV. Unpredicted HTLV-1 infection in female sex worker from Imbituba, Santa Catarina. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2006; 48(4): 237-8.
38. Jacob F, Santos-Fortuna, Azevedo RS, Caterino-de-Araujo A. Performances of HTLV serological tests in diagnosing HTLV infection in high-risk population of São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2007; 49(6): 361-4.
39. Jacob F, Santos-Fortuna E, Caterino-de-Araujo A. Algoritmo de testes sorológicos de triagem para infecção por HTLV-1/2 usado no Instituto Adolfo Lutz de São Paulo. *BEPA – Boletim Epidemiológico Paulista*, 5(49). Janeiro, 2008.
40. Jacob F, Santos-Fortuna, Azevedo RS, Caterino-de-Araujo A. Serological patterns of HTLV-1/II and its temporal trend in high-risk populations attended at Public Health Units of São Paulo, Brazil. *J Clin Virol*. 2008; 42(2):149-55.
41. Jacob F, Magri MC, Costa EAS, Santos-Fortuna E, Caterino-de-Araujo A. Comparison of signal-to-cutoff values in first, second, and third generation enzyme immunoassays for the diagnosis of HTLV-1/2 infection in "at-risk" individuals from São Paulo, Brazil. *J Virol Methods*. 2009; 159:288-90.
42. Caterino-de-Araujo A, Favero A, Santos-Fortuna E, Suleiman J, De Rossi A, Chieco-Bianchi L, Calabrò ML. Molecular characterization of HTLV strains from HIV-1-infected intravenous drug users from São Paulo, Brazil. In: *International Conference on Human Retrovirology: HTLV 8.*, Rio de Janeiro, 1997. Abstracts ME08.
43. Caterino-de-Araujo A, Favero A., Santos-Fortuna E, Suleiman J, Chieco-Bianchi L., Calabrò ML. HTLV-1/HTLV-2 coinfection in AIDS patient from São Paulo, Brazil. *AIDS Res hum Retrovir*. 2000; 16(8): 715-9.
44. Vallinotto ACR, Muto NA, Pontes GS, Machado LFA, Azevedo VN, Santos SEB, Ribeiro-dos-Santos AKC, Ishak MOG, Ishak R. Serological and molecular evidence of HTLV-1 infection among Japanese immigrants living in the Amazon region of Brazil. *Jpn J Infect Dis*. 2004; 57: 156-9.
45. Laurentino RV, Lopes IGL, Azevedo VN, Machado LFA, Moreira MRC, Lobato L, Ishak MOG, Ishak R, Vallinotto ACR. Molecular characterization of human T-cell lymphotropic virus coinfecting human immunodeficiency virus 1 infected patients in the Amazon region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 2005; 100(4): 371-6.
46. Vallinotto ACR, Pontes GS, Muto NA, Lopes IGL, Machado LFA, Azevedo VN, Carvalhaes FAPL, Santos SEB, Guerreiro JF, Ishak MOG, Ishak R. Identification of human T-cell lymphotropic virus infection in a semi-isolated Afro-Brazilian quilombo located in the Marajó island (Pará, Brazil). *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 2006; 101(1): 103-5.
47. Catalan-Soares B, Carneiro-Proietti AB, Proietti FA and Interdisciplinary HTLV Research Group. Heterogeneous geographic distribution of human T-cell lymphotropic viruses I and II (HTLV-1/II): serological screening prevalence rates in blood donors from large urban areas in Brazil. *Cad Saúde publ (Rio de J.)*, Rio de Janeiro. 2005; 21(3): 926-31.
48. Pilotti E, Elviri L, Vicenzi E, Bertazzoni U, Re MC, Allibardi S, Poli G, Casoli C. Postgenomic up-regulation of CCL3L1 expression in HTLV-2-infected persons curtails HIV-1 replication. *Blood*. 2007; 109(5): 1850-6.
49. Turci M, Pilotti E, Ronzi P, Magnani G, Boschini A, Parisi SG, Zipeto D, Lisa A, Casoli C, Bertazzoni U. Coinfection with HIV-1 and human T-cell lymphotropic virus type II in intravenous drug users is associated with delayed progression to AIDS. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2006; 41(1): 100-6.

Vitamins B₁, B₂, B₆ and PP contents in royal jelly

Vitaminas B₁, B₂, B₆ e PP em geleia real

RIALA6/1207

Elaine Cristina Pinto MORESCHI¹, Ligia Bicudo de ALMEIDA-MURADIAN^{1*}

*Endereço para correspondência: Laboratório de Análise de Alimentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil, e-mail: ligiab@usp.br

¹Laboratório de Análise de Alimentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

Recebido: 07.11.2008 – Aceito para publicação: 28.04.2009

ABSTRACT

Hydrosoluble vitamins B₁, B₂, B₆ and PP are essential organic substances for human organism, functioning as coenzymes on several metabolic cycles. In the present investigation four vitamins of B complex and its vitamers contents were determined in royal jelly samples marketed in São Paulo, Brazil. A single extraction process was employed, and each vitamin was determined by HPLC using C18 column and detected by fluorescence. Four samples from different suppliers were analyzed, and the results varied from 0.08 to 0.41 mg/100g (vitamin B₁ or thiamine); from 0.01 to 0.05 mg/100g (vitamin B₂ or riboflavin); from 0.13 to 0.38 mg/100g (piridoxal - vitamin B₆); from 0.26 to 1.38 mg/100g (piridoxamine - vitamin B₆); from 0.21 to 0.57 mg/100g (niacin - vitamin PP); and from 1.56 to 2.00 mg/100g (niacinamide - vitamin PP). These data show that royal jelly is not an important source of the analyzed vitamins, though the results indicate that the employed technique is suitable for determining these four vitamins and its vitamers.

Key words. royal jelly, vitamins, HPLC.

RESUMO

As vitaminas hidrossolúveis B₁, B₂, B₆ e PP são importantes substâncias para o organismo humano, que atuam como coenzimas em diversos ciclos metabólicos. No presente trabalho, foram determinados os teores de quatro vitaminas do complexo B e de seus vitâmeros em amostras de geleia real comercializadas no Estado de São Paulo. Foi utilizado um único processo de extração e a determinação de cada vitamina foi realizada por CLAE utilizando-se coluna C18 e a detecção foi feita por fluorescência. Quatro amostras de diferentes fornecedores foram analisadas e os resultados variaram de 0,08 a 0,41 mg/100g (vitamina B₁ ou tiamina); de 0,01 a 0,05 mg/100g (vitamina B₂ ou riboflavina); de 0,13 a 0,38 mg/100g (piridoxal – vitamina B₆); de 0,26 a 1,38 mg/100g (piridoxamina - vitamina B₆); de 0,21 a 0,57 mg/100g (niacina – vitamina PP) e de 1,56 a 2,00 mg/100g (niacinamida - vitamina PP). Conclui-se que a geleia real não é fonte importante dessas vitaminas, mas verifica-se que a técnica utilizada é adequada para efetuar as determinações das quatro vitaminas analisadas e de seus vitâmeros.

Palavras-chave. geleia real, vitaminas, tiamina, riboflavina, piridoxol, niacina.

INTRODUÇÃO

Vitamins are essential organic compounds for human metabolism. They are in most of the foods in low concentrations. Several compounds have vitamin activity and can be divided in two groups according to their solubility: liposoluble vitamins (A, D, E and K) and water-soluble vitamins (C, B₁, B₂, B₅ or pantothenic acid, B₆, B₁₂, PP ou niacin or B₃, folic acid, biotin, inositol and choline). The biological activity of each vitamin can be due to one or more compounds called vitamers^{1,2}.

Vitamin B₁ or thiamine was the first compound to be called vitamin at the beginning of 20th century and it was related to beriberi disease. Riboflavin or vitamin B₂ was firstly identified as a resistant factor to high temperature present in yeast extract. Three different compounds are called vitamin B₂: riboflavin, flavin mononucleotide or riboflavin 5-phosphate and flavin adenine dinucleotide or riboflavin 5'-adenosilphosphate^{2,3,4}.

Vitamin B₆ is a group of six compounds (pyridoxol and pyridoxol phosphate, pyridoxal and pyridoxal phosphate, pyridoxamine and pyridoxamine phosphate) that acts as coenzymes in fatty acids and lipids metabolism. Vitamin PP has two active forms, niacin and niacinamide, that are part of the coenzymes nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP)^{5,6,7,8,9}. These vitamins are wide spread throughout the food, as flour, milk and dairy products. Some bee products are known to have high vitamin content, mainly royal jelly (RJ).

RJ is a honeybee's secretion from hypopharyngeal and mandibular glands used for nutrition of honeybee workers, drones and queens, although only the queen receives RJ throughout its life¹⁰.

For the importance of vitamins in nutrition and the lack of knowledge about vitamin content in many foods, it is necessary to have reliable data obtained through validated methods.

The official methods for water soluble vitamins are microbiological or spectrophotometric ones, both time consuming and difficult to perform. Nowadays, chromatographic methods have been developed for vitamins B₁, B₂, B₆ and PP determination. The procedure described by Moreschi¹¹ has a common extraction procedure followed by specific chromatographic determination to identify and quantify the different vitamers of these 4 vitamins (riboflavin, thiamine, pyridoxol, pyridoxal, pyridoxamine, niacin and

niacinamide) and it was applied to determine these vitamins in RJ.

The objective of this work is to have preliminary data regarding B vitamins (B₁, B₂, B₆ and PP) in commercial samples of RJ from São Paulo and also to contribute to food composition databases.

MATERIAL AND METHODS

■ Material

Analytical standards of thiamine mononitrate, riboflavin, pyridoxol hydrochloride, pyridoxal hydrochloride, pyridoxamine dihydrochloride, niacin and niacinamide from Merck were used.

The stock solution of vitamin B₁ (thiamine mononitrate) was prepared by dissolving 25 mg of the component in a volumetric flask of 500 mL of hydrochloric acid 0,1M.

Riboflavin (vitamin B₂) was weighed (25 mg) in an erlenmeyer and 1.2 mL of acetic acid and about 50 mL of demineralized water was added; this solution was heated to boiling, cooled to room temperature and transferred to 500 mL volumetric flask and completed to mark with deionized water.

Niacin and niacinamide stock solutions were prepared by dissolving 25 mg of each vitamin in a 250 mL volumetric flask with deionized water.

Vitamin B₆ (pyridoxal, pyridoxol and pyridoxamine) standard solutions were prepared by dissolving 10 mg of each component in a 1000 mL volumetric flask with deionized water. These solutions were kept in dark glass volumetric flasks at 4°C in refrigerator for 1 month. Working solutions were prepared by dilution daily.

Mobile phase for vitamins B₁ and B₂ was prepared by dissolving 0.95g of hexanesulfonic (PIC-6) in 900 mL of deionized water, 95 mL of acetonitrile (HPLC grade) and 0.5 mL of ammonium hydroxide. The pH of this solution was adjusted to 3.6 with phosphoric acid and then 70 mL of deionized water and 22 mL of acetonitrile was added. The post-column reagent for vitamin B₁ determination is obtained by mixing 60 mL of 1% potassium ferricyanide solution and 440 mL of 15% sodium hydroxide solution.

Vitamin B₆ mobile phase was obtained by dissolving 6.80 g of potassium dihydrogenophosphate and 0.14g of heptanesulfonic sodium salt (PIC-7) in 500 mL of deionized water. The pH of this solution was adjusted

with phosphoric acid to 2.5. After the pH adjusted, the solution was transferred to 1000mL volumetric flask and made up to the mark with deionized water.

The mobile phase for vitamin PP determination was prepared by dissolving 9.54g of potassium dihydrogenophosphate in 500 mL of deionized water and adding 7.6 mL of peroxide of hydrogenium and 1.0 mL of copper sulfate solution 5mM. The volume was adjusted to 1000 mL with deionized water.

The reagents used to prepare the mobile phases were analytical grade and the solvents, HPLC grades. All the mobile phases, standards and sample solutions were filtered through 0.45 μ m filter prior to injection in the chromatographic system.

The reagents used during the extraction procedures were hydrochloric acid 0.1 M and sodium acetate 2.5M prepared using analytical grades reagents.

Few trademarks of RJ are found in the market, most of them are from China. It was chosen two frozen samples of the same trade market, one sample (lyophilized) from other trademark and one sample acquired direct from local producer. All samples were kept frozen until the analyses were performed.

METHODS

■ Instrumentation

Chromatographic systems (Waters®) were composed by isocratic pump (model 510), automatic injector (model WISP 717+) and fluorescence detector (model 474). For vitamin B₁ determination it was used a post column reagent pump (Water®) and for vitamin PP the post column reaction was performed under a UV radiation from a black light as described in Lahély et al.¹².

The fluorescence detector was adjusted at excitation wavelength (λ_{exc}) 360 nm and emission wavelength (λ_{em}) 435 nm for vitamin B₁. For vitamin B₂ determination it was used the λ_{exc} = 450 nm and λ_{em} = 530 nm, vitamin B₆ used λ_{exc} = 296nm and λ_{em} = 390nm and for vitamin PP the wavelength adjustment was λ_{exc} = 322 nm and λ_{em} = 380 nm.

Vitamin B₆ mobile phase flow was set up at 0.6 mL/min and the others vitamins were analyzed using a flow rate of 1.0 mL/min. The injection volume for all determinations was 20 μ L.

Chromatographic columns were all C₁₈ spherical, 5 μ m particle size and the length varying according to the vitamin. For vitamins B₁ and B₂ the column length was

Table 1. Analytical conditions for vitamins B₁, B₂, B₆ and PP determination

	Vitamin B ₁	Vitamin B ₂	Vitamin B ₆	Vitamin PP
Column	Lichrospher C18, 5 μ m, 125 mm		Lichrospher C18 endcapped, 5 μ m, 250 mm	Superspher C18, 5 μ m, 250 mm
Mobile Phase	PIC-6; acetonitrile; ammonium hydroxide - pH 3.6		Potassium dihydrogenophosphate; PIC-7; acetonitrile - pH 2.5.	potassium dihydrogenophosphate; peroxide of hydrogenium; copper sulfate
Flow rate	1,0 mL/min		0,6 mL/min	1,0 mL/min
Injection volume	20 μ L			
Wavelength	λ_{exc} - 360 nm λ_{em} - 435 nm	λ_{exc} - 450 nm λ_{em} - 530 nm	λ_{exc} - 296 nm λ_{em} - 390nm	λ_{exc} - 322 nm λ_{em} - 380 nm

Lichrospher C18, 5µm, 125 mm; for vitamin B₆ it was used a Lichrospher C18 endcapped, 5µm, 250 mm and for vitamin PP a Superspher C18, 5µm, 250 mm. All the columns were acquired from Merck.

■ Procedure

After the samples reach the room temperature, 5g were weighed in a dark glass 125 mL erlenmeyer. Add 50 mL of hydrochloric acid and take the erlenmeyer in a water bath with boiling water for 30 minutes. After this period, the samples are taken from the water bath, cooled to room temperature and adjusted the pH solution to 4.6 with sodium acetate 2.5 M. The solution is transferred to brown 100 mL volumetric flask and made up to the mark with deionized water. The extract was filtered through analytical paper filter and then through 0.45 µm filter into chromatographic vials.

The standard curves were prepared for vitamins B₁, B₂, B₆ (hydroxol hydrochloride) and PP (niacin and niacinamide) with concentration from 0.1 to 2.0 µg/mL; vitamin B₆ (hydroxal hydrochloride and hidroxamine dihydrochloride) from 0.05 to 1.0 µg/mL. Dilution was performed with Milli-Q water.

The summary of the analytical conditions are presented in Table 1.

RESULTS AND DISCUSSION

The performance characteristics for this method (linearity, precision, trueness, limit of detection and quantitation, specificity and ruggedness) were determined previously¹¹. To verify the method performance for royal jelly samples, it was evaluated precision under repeatability conditions

and trueness by recovery of added standards in the sample just after the weighing. The amount added for each vitamin was equivalent to about 0.80 mg/100g for vitamin B₁, B₂ and pyridoxol, 0.40 mg/100g for pyridoxal and piridoxamine and about 4.0 mg/100g for both vitamers of vitamin PP.

The recoveries varied depending on the vitamers analyzed from 79 to 112% as showed in Table 2.

The average recoveries and the standard deviation obtained for the vitamins showed that the method performance is in line with the vitamins methods in food in the literature.

As the method performance showed adequate for the determination, analyses were done using the samples collected at local markets. Results obtained are showed in Table 3.

Detection and quantitation limit for the method was calculated based on signal/noise procedure as described by Moreschi¹¹.

The results showed that the vitamin content varies within the samples, probably due to different sources of the royal jelly and no vitamin B₂ was found. The vitamin B₆ was presented in the forms of pyridoxal and piridoxamine.

When comparing these values to those found in literature^{4,8,9,10}, vitamin B₁ is within the limits of the literature (0.14 – 0.67 mg/100g) as the vitamin B₆ (0.10 – 0.48 mg/100g). The values from the literature for vitamin PP (4.8 – 8.8 mg/100g) are higher than the obtained in this paper as well the vitamin B₂ content in literature reaches 2.5 mg/100g, much higher than the results presented here. It is possible to have results comparable to the literature ones if a bigger and more representative sampling is conducted latter.

Table 2. Recoveries of added standard for vitamers of vitamins B1, B2, B6 and PP

	Vitamin B ₁ (*)	Vitamin B ₂ (*)	Vitamin B ₆			Vitamin PP (***)	
	Thiamin and mononitrate	Riboflavin	Hydroxol hydrochloride (*)	Hydroxal hydrochloride (**)	Hydroxamine dihydrochloride (**)	Niacin	Niacinamide
Average (%)	84	84	110	103	105	89	92
SD (%)	4	2	0.8	3	4	2	3

Average and standard deviation (SD) from 6 determinations for each vitamer.

(*) addition of about 0.80 mg/100g.

(**) addition of about 0.40 mg/100g.

(***) addition of about 4.0 mg/100g.

Table 3. Results of vitamins from different brands of royal jelly obtained from local market

Brand	Vitamin B ₁	Vitamin B ₂	Vitamin B ₆			Vitamin PP	
	Thiamine	Riboflavin	Hydroxol	Hydroxal	Hydroxamine	Niacin	Niacinamide
A	< 0.15(**)	< 0.02 (**)	< 0.02 (**)	0.17 ± 0.02	0.29 ± 0.04	0.51 ± 0.04	1.91 ± 0.07
B	0.22 ± 0.01	< 0.02 (**)	< 0.02 (**)	0.32 ± 0.01	0.38 ± 0.01	0.39 ± 0.01	3.4 ± 0.1
C	0.41 ± 0.02	< 0.02 (**)	< 0.02 (**)	0.34 ± 0.03	1.40 ± 0.02	0.22 ± 0.01	1.6 ± 0.1
D (*)	0.26 ± 0.06	< 0.02 (**)	< 0.02 (**)	1.25 ± 0.05	0.89 ± 0.02	1.1 ± 0.1	7.8 ± 0.2

(*) Lyophilized royal jelly

(**) Quantitation limit of the method

Results expressed in mg/100g

Results are average and standard deviation of 3 determinations.

Vitamin B₁, B₆ and PP content is very low compared to Brazilian RDI for adults (1.3 mg/100g for vitamins B1 and B6 and 16 mg/100g for vitamin PP)¹³.

CONCLUSION

Vitamin content in royal jelly was very low for most of vitamins analyzed and is below the limit of quantitation of the method for vitamin B₂.

Considering that royal jelly is a dietary supplement, the amount in the normal diet is very small so the vitamin intake from this supplement is not important.

Although the amount of vitamins found in the samples analyzed, the method showed to be adequate for the determination of vitamins B₁, B₂, B₆ and PP in royal jelly. Maybe more analyses should be carried out to determine the variation of the vitamins content in royal jelly coming from different bees and different regions.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Nestlé and CNPq.

REFERENCES

- Bobbio F, Bobbio P. *Introdução à química de alimentos*. 2.ed. Varela (São Paulo): 1989.
- Ball G. *Bioavailability and analysis of vitamins in foods*. 1.ed. Chapman & Hall (London): 1998.
- Cooperman, JM, Lopez R. Riboflavin. In: Machlin, J. *Handbook of Vitamins*. 2.ed. New York: M. Dekker; 1990. p. 299-328
- Bianchini-Pontuschka R, Penteadó MVC. Vitamina B₂. In: Penteadó, MVC. *Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos*. 1 ed. Barueri: Manole, 2003, p.279-316.
- Driskell JA. Vitamin B₆. In: Machlin, J. *Handbook of Vitamins*. 2.ed. New York: M.Dekker, 1990. p.379-402.
- Hankes LV. Nicotinic Acid and Nicotinamide. In: Machlin, J. *Handbook of Vitamins*. 2.ed. New York: M. Dekker, 1990. p. 329-78.
- Ottaway PB. *The technology of vitamins in food*, 1.ed. Blackie Academic & Professional (London): 1993.
- Bianchini-Pontuschka R, Penteadó MVC. Vitamina B₆. In: Penteadó, M.V.C. *Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos*. 1 ed. Barueri: Manole, 2003. p.367-96.
- Sant'Ana HMP. Niacina. In: Penteadó, M.V.C. *Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos*. 1 ed. Barueri: Manole, 2003. p.331-59.
- Presoto A, Rios M, Almeida-Muradian LB. Simultaneous High Performance Liquid Chromatographic Analysis of Vitamins B1, B2 and B6 in Royal Jelly. *J Braz Chem Soc*. 2004; 15:136.
- Moreschi ECP. *Desenvolvimento e validação de métodos cromatográficos e avaliação da estabilidade de vitaminas hidrossolúveis em alimentos* [Tese de Doutorado], Universidade de São Paulo, Brasil, 2006. 214 pp.
- Lahély S, Bergaentzlé M, Hasselmann C. Fluorimetric determination of niacin in foods by high-performance liquid chromatography with post-column derivatization. *Food Chemistry*. 1999; 65:129.
- Brasil. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária [ANVISA]. Resolução RDC no. 269 de 22 de setembro de 2005. Aprova regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF*.

Estudo das condições de extração de compostos fenólicos de cebola (*Allium cepa* L.)

Study on the extracting conditions of phenolic compounds from onion (*Allium cepa* L.)

RIALA6/1208

Michele Moraes de SOUZA*, Vânia Machado REcart, Meritane da ROCHA, Eliane Pereira CIPOLATTI, Eliana BADIALE-FURLONG

*Endereço para correspondência: Escola de Química e Alimentos, Laboratório de Análise e Bioquímica de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rua: Engenheiro Alfredo Huch, 475, caixa postal 474, CEP 96201900, Rio Grande, RS, Brasil; e-mail: michele.moraesdesouza@gmail.com

Laboratório de Análise e Bioquímica de Alimentos, Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil

Recebido: 24.09.2008 – Aceito para publicação: 02.07.2009

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estabelecer as melhores condições para efetuar extração de compostos fenólicos totais de diferentes classes comerciais de cebola (*Allium cepa* L.). Por meio de Planejamento Experimental Fatorial foram determinadas as variáveis que influenciam significativamente nas etapas de extração. As variáveis estudadas foram: natureza do solvente, procedimento de agitação, tempo de extração e tempo de agitação com e sem interrupções. A melhor combinação resultou em um modelo preditivo, empregando-se metanol como solvente, agitação de 120 minutos a 200 rpm. O maior conteúdo fenólico em diferentes classes de cebola foi 2275 µg/g, 88% de recuperação e o limite de quantificação foi de 31 µg fenóis/g.

Palavras-chave. cebola, compostos fenólicos, planejamento experimental.

ABSTRACT

The present study was carried out to establish the best conditions for performing the total phenolic compounds extraction from diverse kinds of commercialized onion (*Allium cepa* L.). By means of the factorial experimental design the variables that significantly influence the extraction stages were determined. The following variables were analyzed: type of solvent, shaking process, time of extraction, and time with and without shaking interruptions. The best combining proceeding resulted in a predictive model, by using methanol as solvent, shaking for 120 minutes, and at 200 rpm. The highest phenolic content in different kinds of onion was 2275 µg/g, the recovery was 88%, and the quantification limit of 31 µg/g.

Key words. onion, phenolic compounds, experimental design.

INTRODUÇÃO

Os compostos fenólicos, nas formas de ácidos fenólicos, derivados de ácido hidroxicinâmico e flavonoides, vêm se destacando entre os que podem prevenir danos à saúde, mesmo estando presentes em quantidades traços nos alimentos^{1,2}. As substâncias fenólicas podem aparecer livres ou na forma de glicosídeos, e a posição do açúcar na estrutura fenólica influi na solubilidade e em outras propriedades físico-químicas. Estas diferenças podem ser usadas para separá-los, quantificá-los e desenvolver estudos sobre suas atividades fisiológicas^{1,3,4}.

A determinação de compostos fenólicos totais em tecidos vegetais é a etapa inicial de qualquer investigação de funcionalidade, avaliação biológica e estímulo ao consumo, visando a prevenção de doenças crônico-degenerativas⁵. Para extração de compostos fenólicos em diversas estruturas vegetais vêm sendo mencionados sistemas aquosos, aceto etílicos e alcóolicos, sob diferentes condições de interações com as matrizes^{6,7,8}. A quantificação dos compostos fenólicos totais em diferentes extratos é feita empregando o reagente de Folin-Ciocalteu, uma mistura de ácidos fosfotúngstico e molibidico, nos quais o molibdênio e o tungstênio no estado de oxidação 6⁺, e em presença de redutores, no caso fenóis, passam ao estado de oxidação variando entre 5 e 6 (forma azul) permitindo a quantificação de substâncias redutoras⁸.

Apesar da abundante literatura sobre conteúdo fenólico em alimentos^{9,10,11,12} poucos são os trabalhos que descrevem adaptações do procedimento para extração em matrizes específicas e/ou condições críticas de preparo de amostra para a quantificação. Cabe ressaltar que o processo de extração para distintas matrizes e analitos é fundamental para a estimativa mais exata de compostos fenólicos para diferentes fins.

A otimização de metodologia de extração de um analito em especial é fundamental, visto que pequenos detalhes podem resultar em efeitos que comprometem a confiabilidade dos resultados. Para atingir esta meta com o mínimo de experimentos, planejamentos fatoriais completos são promissores e permitem otimizar metodologias considerando variáveis críticas para alguns tipos de amostras avaliando seus efeitos e possíveis interações de fatores nas respostas desejadas que vêm sendo largamente utilizados também para otimização de metodologia analítica^{13,14,15}.

A cultura popular atribui efeitos benéficos a alguns alimentos ou bebidas que tem norteado estudos

sistematizados da funcionalidade, o que, além de conferir caráter científico ao conhecimento, propicia a seguridade na alegação de funcionalidade. Entre estes está a cebola (*Allium cepa L.*), empregada pelo seu papel de conferir características organolépticas a alimentos, além do seu poder preventivo e curativo de diversas doenças crônico-degenerativas^{2,4}. Apesar do conhecimento milenar dos benefícios deste vegetal e dos diversos estudos sobre seus efeitos bioativos, algumas regiões produtoras tem dificuldade em comercializar suas safras em condições satisfatórias para consumo “in natura” ou em formulações industriais, resultando em descarte de material e desestímulo aos produtores¹⁶.

Esta situação é bem evidente na região sul do Rio Grande do Sul, onde pode ser observada a inconsistência entre a importância socioeconômica do vegetal e o pouco estímulo a sua produção sustentável. Na Universidade Federal do Rio Grande, alguns grupos de pesquisa vêm enfatizando as cebolas da região visando contribuir com o melhor aproveitamento deste recurso agropecuário local. Conhecer o potencial funcional é um aspecto importante para preservação e o uso adequado da cebola. Neste trabalho o objetivo foi empregar a técnica de planejamento experimental para otimização da extração para posterior quantificação de compostos fenólicos totais em cebolas produzidas na região sul do RS, e desta forma subsidiar estudos de características físico-químicas e funcionais deste vegetal, bem como estabelecimento de processos tecnológicos para sua valoração.

Para tal foram avaliadas diferentes variáveis na etapa de extração e seus reflexos na performance analítica e aplicabilidade às diferentes classes comerciais de cebola.

MATERIAL E MÉTODOS

■ Procedimentos experimentais gerais

Todos os solventes e reagentes utilizados durante os testes foram analiticamente puros. O reagente Folin-Ciocalteu foi adquirido da Polipur (Pró-análise Química e Diagnóstico Ltda) e a quercetina da Sigma Chemical Company (EUA). As medidas de absorção foram realizadas em espectrofotômetro modelo VARIAN CARY/100 UV-VISIBLE.

■ Amostras

As cebolas foram coletadas e classificadas pelos técnicos da EMATER no município de São José do Norte, no Rio Grande do Sul, em março de 2007. A classificação observou

o Regulamento Técnico de Qualidade da Cebola (1995) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que tem por critério o diâmetro do bulbo das cebolas.

■ Planejamento para estudo das condições de extração de compostos fenólicos (CF)

A partir de condições estudadas ^{7,9,17,18,19,20,21}, foram avaliados os efeitos das variáveis: solvente (metanol e acetato de etila), intervalo de extração (120, 150 e 180 minutos), rotação (100, 150 e 200rpm) e extração com e sem interrupções na etapa de agitação (0, 15 e 30 minutos), através de planejamento fatorial 2⁴, ou seja, quatro fatores testados em dois níveis de variação, com ponto central em tréplica para cada solvente testado, tendo-se como resposta o conteúdo de fenóis totais. Na matriz de planejamento experimental, os valores das variáveis são representados na forma codificada, sendo os fatores e os respectivos níveis apresentados na Tabela 1. A matriz do planejamento experimental foi montada conforme a Tabela 2.

Identificado o solvente que possibilitou a extração dos maiores teores de compostos fenólicos (conforme os resultados estatísticos apresentados na Tabela 3), foram estudados os efeitos do tempo de extração, rotação e tempo com e sem interrupções de agitação, utilizando planejamento fatorial completo 2³, com três variáveis em dois níveis (-1 e +1) e 3 pontos centrais (0) resultando em 11 experimentos, mostrados na Tabela 4.

Para análise estatística dos dados foi utilizado o programa Statistica 6.0, considerando o conteúdo de fenóis totais (µg de fenóis/g de cebola) como resposta das variáveis em estudo, utilizando um intervalo de confiança de 95%.

■ Determinação de compostos fenólicos nos extratos submetidos a diferentes condições

As cebolas foram secas em estufa com circulação de ar da marca QUIMIS a 60°C, até atingirem valores de umidade de 13%. Foram pesadas 10 gramas de cebola seca e adicionados 50 mL de solvente e agitados em temperatura ambiente em mesa agitadora orbital TE - 141 da marca TECNAL. Os extratos foram filtrados e clarificados com 10 mL de hidróxido de bário 0,1M e 10 mL de sulfato de zinco 5%, as soluções foram filtradas e transferidas quantitativamente para um balão volumétrico de 100mL, sendo o volume final completado com o solvente utilizado na extração.

A determinação quantitativa dos compostos fenólicos nos extratos da cebola foi realizada por espectrofotometria de UV/VIS utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, e o procedimento consistiu em tomar alíquotas de 500µL de cada extrato, agitar com 500µL de água destilada e 4,5mL de Na₂CO₃ 4% por 1 min, e colocar em banho-maria a 40°C por 15 min. As misturas foram agitadas por 30 segundos em banho ultra-som com 500µL do reagente de Folin-Ciocalteu diluído 1:2 com água destilada. Após 10 min, foi medida a absorbância das soluções em comprimento de onda de 660nm. O teor de fenóis totais foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva analítica construída com uma solução padrão de quercetina contendo 100 µg/mL a partir da qual foram preparadas diluições variando entre 2 e 16 µg/mL. Os resultados dos conteúdos fenólicos das amostras foram expressos como µg de CF totais/ g de cebola.

Como indicadores de performance do método foram determinados o limite de quantificação e a recuperação de quercetina nas condições otimizadas de

Tabela 1. Variáveis e níveis utilizados no planejamento experimental completo (24).

Fatores	-1	Níveis Ponto central	+1
Solvente	Met/acet etila	Met/acet etila	Met/acet etila
Intervalo de extração (minutos)	120	150	180
Rotação (rpm)	100	150	200
Interrupções na etapa de agitação (minutos)	0	15	30

extração. A recuperação foi testada em amostras de cebola seca previamente adicionadas de soluções metanólicas de quercetina em níveis 1,0; 1,2 e 1,5 mg/ g de cebola.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras de cebola foram secas para concentrar os sólidos e facilitar o processo de extração mantendo a proporção de massa seca/solvente, e a secagem à temperatura de 60°C em camada fina que minimizou o escurecimento dos tecidos por escurecimento enzimático ou caramelização²¹.

Os trabalhos que determinam fenóis em raízes, tubérculos, cereais, porções distintas de plantas medicinais e frutos, mencionam conteúdos fenólicos totais que variam entre 40 µg CF/ g de amostra no arroz a 5500 µg CF/ g de amostra nas cascas de limão, porém para

cebolas estes valores não estão disponíveis. As referências são unânimes em informar que o principal componente fenólico das diferentes espécies de cebola é a quercetina que foi adotada como padrão para os compostos fenólicos totais em cebola^{6,7,8,9}.

As variáveis testadas foram aquelas que são as mais citadas nos relatos da literatura, para determinação dos teores de fenóis totais ou para posterior separação das diferentes famílias deles em matrizes vegetais. Na primeira etapa do estudo, o efeito das variáveis solvente de extração, tempo, rotação e tempo com e sem interrupções de agitação tem seus resultados apresentados na Tabela 2, na qual os conteúdos de compostos fenólicos totais estão expressos em µg CF/ g de cebola.

A análise estatística mostrou que o tipo de solvente utilizado na extração dos fenóis influenciou significativamente nos níveis determinados ($p = 0,015$),

Tabela 2. Conteúdo de compostos fenólicos no planejamento fatorial 24 e 6 pontos centrais.

Ensaio	Solvente	Intervalo descanso (min)	Rotação (rpm)	Tempo (min)	Fenóis (µg CF/g cebola)
1	Metanol	0(-1)	100(-1)	120(-1)	1556,6
2	Metanol	30(+1)	100(-1)	120(-1)	1767,6
3	Metanol	0(-1)	200(+1)	120(-1)	2363,6
4	Metanol	30(+1)	200(+1)	120(-1)	2372,4
5	Metanol	0(-1)	100(-1)	180(+1)	2263,2
6	Metanol	30(+1)	100(-1)	180(+1)	2131,4
7	Metanol	0(-1)	200(+1)	180(+1)	2119,6
8	Metanol	30(+1)	200(+1)	180(+1)	2238,5
9	Acet etl	0(-1)	100(-1)	120(-1)	97,1
10	Acet etl	30(+1)	100(-1)	120(-1)	63,1
11	Acet etl	0(-1)	200(+1)	120(-1)	95,1
12	Acet etl	30(+1)	200(+1)	120(-1)	85,3
13	Acet etl	0(-1)	100(-1)	180(+1)	88,9
14	Acet etl	30(+1)	100(-1)	180(+1)	82,4
15	Acet etl	0(-1)	200(+1)	180(+1)	45,9
16	Acet etl	30(+1)	200(+1)	180(+1)	49,3
17	Metanol	15(0)	150(0)	150(0)	2160,9
18	Metanol	15(0)	150(0)	150(0)	2101,5
19	Metanol	15(0)	150(0)	150(0)	2134,3
20	Acet etl	15(0)	150(0)	150(0)	81,6
21	Acet etl	15(0)	150(0)	150(0)	80,4
22	Acet etl	15(0)	150(0)	150(0)	81,8

CF= compostos fenólicos

conforme mostra a Tabela 3. O solvente que propiciou a extração de maiores teores de fenóis foi o metanol, o que é promissor considerando-se que os flavonóides podem estar neste conjunto em função da sua solubilidade. Nos extratos obtidos com acetato de etila, os valores detectados estavam próximos do limite de linearidade, o que sugeria a ocorrência de baixas concentrações de fenóis polimerizados e a necessidade de evaporar o solvente antes da quantificação dos fenóis para cumprimento da performance analítica.

As variáveis tempo de extração, rotação e tempo com e sem interrupções de agitação, foram estudadas no planejamento completo 2^3 com três pontos centrais para obtenção do ponto ótimo de extração dos compostos fenólicos. Os resultados estão na Tabela 4. O comportamento verificado permitiu construir modelo preditivo dentro da faixa ótima para extração dos fenóis em função destas variáveis.

A Tabela 5 apresenta os resultados da análise estatística dos efeitos estudados no planejamento 2^3 , que

Tabela 3. Efeitos e coeficientes para os diferentes solventes estudados.

	Efeito	Desvio padrão	Significância (p)
Média/interação	1093,66	239,5349	0,006025
(1)Solvente (L)	-2025,73	561,7592	0,015445
(2)Intervalo (L)	20,00	561,7592	0,972977
(3)Rotação (L)	164,93	561,7592	0,780870
(4)Tempo(L)	77,30	561,7592	0,895923
1L com 2L	-31,73	561,7592	0,957151
1L com 3L	-178,90	561,7592	0,763006
1Lcom 4L	-95,82	561,7592	0,871242
2L com 3L	10,32	561,7592	0,986047
2L com 4L	-24,00	561,7592	0,967576
3L com 4L	-193,07	561,7592	0,745055

p = nível de significância

Tabela 4. Conteúdo de compostos fenólicos para o planejamento fatorial 2^3 e 3 pontos centrais.

Ensaio	Intervalo descanso (min)	Rotação (rpm)	Tempo (min)	Fenóis (μg CF/g de cebola)
1	0(-1)	100(-1)	120(-1)	1556,6
2	30(+1)	100(-1)	120(-1)	1767,6
3	0(-1)	200(+1)	120(-1)	2363,6
4	30(+1)	200(+1)	120(-1)	2372,4
5	0(-1)	100(-1)	180(+1)	2263,2
6	30(+1)	100(-1)	180(+1)	2131,4
7	0(-1)	200(+1)	180(+1)	2119,6
8	30(+1)	200(+1)	180(+1)	2238,5
9	15(0)	150(0)	150(0)	2160,9
10	15(0)	150(0)	150(0)	2101,5
11	15(0)	150(0)	150(0)	2134,3

CF=compostos fenólicos

confirmaram o efeito das associações de condições de extração demonstrada pelos conteúdos obtidos em fenóis totais nos diferentes experimentos. Outros autores também mencionaram estas variações e atribuíram a formas químicas distintas de fenóis presentes na matriz ^{7,9}.

A Tabela 5 mostra que entre as três variáveis estudadas, rotação, tempo de agitação e a interação da rotação com o tempo de agitação foram estatisticamente significativas no nível de confiança de 95%, para a extração dos compostos fenólicos da cebola. A rotação por minutos (rpm) apresentou efeito positivo ao passar do menor valor para o maior, assim como indicou o aumento na média desta resposta. A variável tempo de agitação teve efeito contrário, ou seja, o menor tempo resultou em maior conteúdo de compostos extraídos. A interação da variável rotação com o tempo de agitação apresentou efeito negativo diminuindo os teores médios extraídos em 362 µg CF /g de cebola. Os efeitos das demais variáveis não foram significativos neste intervalo de confiança.

Tabela 5. Efeitos e coeficientes para as variáveis obtidas pelo tratamento estatístico.

	Efeito	Desvio padrão	Significância (p)
Média/Interação	2109,964	8,97113	0,000018
(1)INTERVALO (L)	51,725	21,03917	0,133181
(2)ROTAÇÃO (L)	343,825	21,03917	0,003724
(3)TEMPO (L)	173,125	21,03917	0,014449
1L com 2L	12,125	21,03917	0,622622
1L com 3L	-58,175	21,03917	0,109689
2L com 3L	-362,075	21,03917	0,003359

p = nível de significância

Os coeficientes de regressão da Tabela 6 mostram um modelo de terceira ordem para as variáveis, o que tornou possível validá-lo em função das variáveis estudadas por meio da análise de variância, que mostrou que estes foram preditivos e significativos para os efeitos combinados do tempo de agitação, rotação e a interação da rotação com o tempo de agitação, nos níveis de compostos fenólicos extraídos.

Os comentários são reforçados pelos resultados do teste F, no qual o F calculado de 31,1 foi 7 vezes maior do que o F tabelado, 4,35 (Tabela 7), permitindo que o modelo

Tabela 6. Coeficiente de regressão para as variáveis significativas para a extração obtida pelo tratamento estatístico.

	Coef. regressão	Desvio padrão	Significância (p)
Média/interação	2109,964	8,97113	0,000018
(2) Rotação (L)	171,913	10,51958	0,003724
(3) Tempo (L)	86,563	10,51958	0,014449
2L com 3L	-181,037	10,51958	0,003359

p = nível de significância

expresso na Equação 1 fosse utilizado para gerar a superfície de resposta para o rendimento de CF (Figura 1).

$$\text{Conteúdo de fenóis (µg CF/g de cebola)} = 2109,9 + 171,9R + 86,6T - 181R \cdot T \quad (1)$$

Sendo: R = rotação (rpm), T = tempo (minutos)

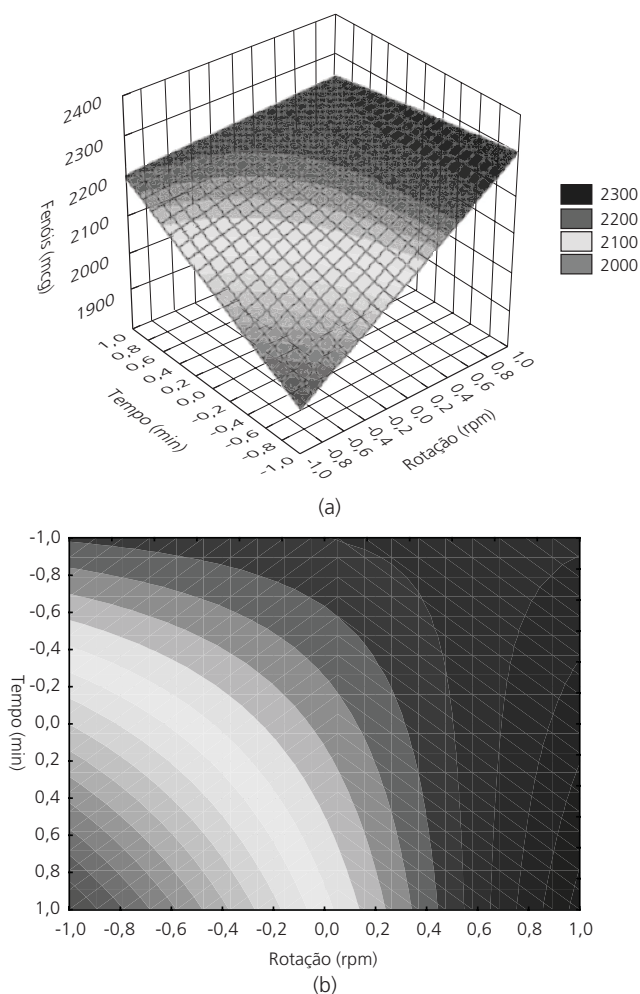


Figura 1. Superfície de resposta (a) e curva de contorno para CF (b). CF = compostos fenólicos

Tabela 7. Dados de ANOVA para planejamento experimental avaliando o efeito da rotação, tempo e interação da rotação com o tempo.

Fonte de variação	Soma quadrática	Grau Liberdade	Média quadrática	Teste F	F _{tab} (95%)	F _{calc} /F _{tab}
Regressão	558572,4	3	186190,8	31,1	4,35	7,15
Resíduo	41869,8	7	5981,4			
Falta de ajuste	40099,2					
Erro puro	1770,6					
Total	600442,2	10				

A Figura 1 mostra que o rendimento da extração foi maior quando foi utilizada a rotação de aproximadamente 200 rpm e tempo de agitação de 120 minutos, sendo extraídos 2372 µg CF/ g de cebola. Este resultado sugere que o aumento no tempo de agitação pode ocasionar uma diminuição nos teores extraídos pela degradação dos compostos fenólicos pelas enzimas óxido-redutases do tecido ou reversão do equilíbrio dos compostos entre as frações sólido-líquido do sistema.

A partir desta combinação das variáveis foi avaliada a cinética do processo, Figura 2, obtida pela diminuição do tempo de extração até que este não fosse mais significativo no nível de confiança de 95%. Foi verificado que a diminuição a partir de 120 minutos não foi significativa no intervalo de confiança estabelecido, comprovando a adequacidade do tempo estabelecido para a extração dos compostos fenólicos.

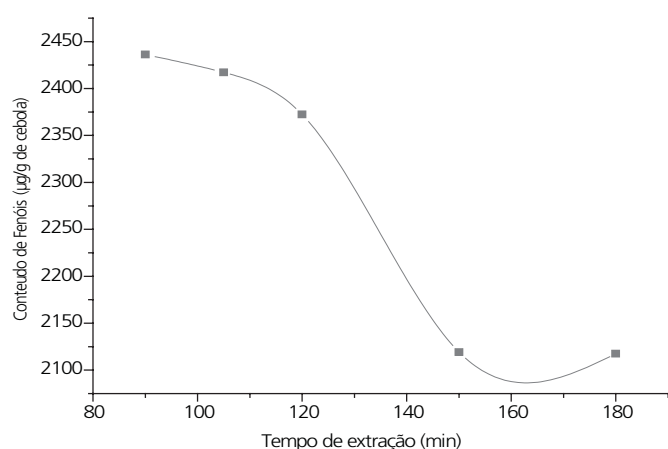


Figura 2. Cinética de rendimento de extração de fenóis por tempo.

■ Indicativos de Mérito do procedimento otimizado

O procedimento de extração otimizado foi executado para determinar o limite de quantificação e recuperação, sendo as determinações realizadas em triplicata.

A Equação da curva de calibração da quercetina para estimativa dos compostos fenólicos nas cebolas foi representada pela equação 2, na qual C representa a concentração de quercetina, A a absorbância a 660nm e o coeficiente de correlação R = 0,999 demonstrando a linearidade da relação nas concentrações da curva analítica.

$$C = 0,0352A \quad (2)$$

O limite de quantificação determinado foi de 31 µg CF e o teor médio de recuperação para o método completo usando a extração otimizada foi de 88%, variando entre 84 e 92 % da menor para a maior concentração testada. As condições de extração resultam em valores que estão fora dos valores dos pontos críticos para a confiabilidade de resultados analíticos e neste caso os teores obtidos para limites de quantificação e recuperação sugerem que o método nas condições estabelecidas é adequado para determinar compostos fenólicos em cebolas, expressando os conteúdos em µg CF/ g de cebola.

O procedimento foi testado quanto à sua aplicabilidade para quantificar CF em cebolas classificadas conforme a legislação do MAPA, que distribui em quatro classes os bulbos de tamanhos que variam entre 35 a 90 mm. Cabe salientar que nesta classificação não estão considerados outros aspectos que possam refletir a composição química ou outros aspectos indicativos da qualidade dos tecidos.

Nas cebolas analisadas, o conteúdo de compostos fenólicos variou entre 2244 e 2306 µg CF/ g de cebola. Cabe

Tabela 8. Conteúdo de fenóis totais em cebola nas diferentes classes.

Classes (diâmetro bulbo)	Umidade (%)	Conteúdo (μg CF totais/ g de cebola)
Classe 2 (maior que 35 até 50)	88,5 ^a	2265,9 ^a
Classe 3 (maior que 50 até 70)	88,4 ^a	2244,3 ^a
Classe 4 (maior que 70 até 90)	88,3 ^a	2306,4 ^c
Classe 5 (maior que 90)	88,6 ^a	2282,9 ^a

Letras iguais indicam que não há diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)
CF = compostos fenólicos

salientar que entre as diferentes classes o teor de umidade não variou significativamente ao nível de significância de 95%, ficando entre 88,3 e 88,6%. Considerando os totais obtidos em conteúdo fenólico nas 4 classes, mostrados na Tabela 8, a classe 4 (diâmetro do bulbo maior que 70 e menor que 90 mm) destaca-se significativamente das demais cebolas e de outros tecidos vegetais de amplo consumo como banana (310 μg / g amostra), maçã (1000 μg / g amostra) e batata (990 μg / g amostra) com resultados expressos em equivalente de tirosina, determinados em amostras da região⁹.

CONCLUSÕES

O planejamento experimental realizado em duas etapas se mostrou como uma ferramenta importante para otimizar e construir o modelo preditivo dentro da faixa ótima para a extração de compostos fenólicos a partir da combinação das variáveis, tempo de extração, rotação e extração contínua e não contínua. As condições otimizadas ocorreram quando foi utilizado o tempo de extração de 120 minutos e a rotação de 200 rpm em mesa agitadora orbital. Nas diferentes classes comerciais de cebolas da região sul, a classe mais promissora como fonte de compostos fenólicos para a dieta foi a 4 com um teor médio de 2306 μg CF totais/ g de cebola.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pela bolsa de estudo concedida ao primeiro autor e à EMATER-RS.

REFERÊNCIAS

1. Antolovich M; Prenzler K R; Ryan D. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *Analyst*. 2000; 125: 989-1009.
2. Jorge P A R; Neyra R M O; Almeida E; Bragnolo N. Efeito da berinjela sobre os lipídios plasmáticos, a peroxidação lipídica e a reversão da disfunção endotelial na hipercolesterolemia experimental. *Arq Bras Cardiol.*, 1998; 70(2): 87-91.
3. Badiale-Furlong, E; Colla E; Bortolato D S; Baish A L M; Souza-Soares L A. Avaliação do potencial de compostos fenólicos em tecidos vegetais. *Revista Veter*, 2003; 4(13): 105-14.
4. Chen Z Y; Chan P T; Zhang Z; Chung H Y. Antioxidative activity of green tea catechin extract compared with that of Rosemeay extract. *Journal Analytical Official Chemistry Society*. 1998; 75(9): 327-33.
5. Torres A M; Mau Lastovicka T; Rezaalyan R. Total phenolics and highperformance liquid chromatography of phenolic acids of avocado. *J Agric Food Chem*. 1987; 35: 921-5.
6. Imeh U; Khokbar S. Distribution of conjugated and free phenols in fruits: Antioxidant activity and cultivar variations. *J Agric Food Chem*. 2002; 50(22): 6301-6.
7. Lima V L A G; Melo E A; Maciel M A S; Silva B S G; Lima D E S; Fenólicos totais e atividade antioxidante do extrato aquoso de broto de feijão-mungo (*Vignaradiatal*L.). *Revista de Nutrição*. 2004; 17(1): 53-7.
8. Sousa C M; Rocha M H; Vieira-Jr G M; Ayres M C; Costa C L S; Araújo D S; Cavalcante L C D; Barros E D; Araújo P B; Brandão M S; Chaves M S. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais, *Química Nova*. 2007; 30(2): 351- 5.
9. Oliveira M S; Badiale-Furlong E. Screening of antifungal and antimycotoxigenic activity of plant phenolic extracts. *World Mycotoxin J*. 2008; 1(2): 1-10.
10. Hsieh C L; Yen G C; Chen H Y; Antioxidant activities of phenolic acids on ultraviolet radiation-induced erythrocyte and low density lipoprotein oxidation. *J Agric Food Chem*. 2005; 53(15): 6151-5.
11. Shahidi F; Alasalvar C; Liyana-Pathirana M. Antioxidant Phytochemicals in Hazelnut Kernel (*Corylus avellana* L.) and Hazelnut Byproducts. *J Agric Food Chem*. 2007; 55(4): 1212-20.
12. Broinizi P R B; Andrade-Wartha E R S; Silva A M O; Novoa A J V; Torres R P; Azeredo H M C; Alves R E; Mancini-Filho J. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente

- presentes em pseudo-fruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). *Ciênc Tecnol de Aliment*. 2007; 27(4): 902-8.
13. Garda-Buffon J; Badiale-Furlong E. Otimização de metodologia para derivação de desoxinivalenol através de planejamento experimental. *Química Nova*. 2008; 31(2), 270-4.
 14. Morais M M; Pinto L A A; Ortiz S C A; Crexi V T; Silva R L A; Silva J D. Estudo do processo de refino do óleo de pescado. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 2001; 60(1): 23-33.
 15. Massaro A F; Pinto L A A. Enriquecimento protéico de farelo de arroz desengordurado o com sangue bovino, utilizando a técnica de leite de jorro. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2002; 61(2): 77-84.
 16. Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural – EMATER-RS – Classificação Comercial da Cebola. [acesso em 06 dez 2007]. Disponível em: <http://www.emater.tche.br>.
 17. Baptista M J; Gloria B A; Pascholati S F; Krugner T L. Produção de compostos fenólicos durante a infecção ectomicorrízica por dois isolados de *Pisolithus tinctorius* em *Eucalyptus urophylla* in vitro. *Rev Bras Bot*. 1999; 22(2): 309-15.
 18. Andrade C A; Costal C K; Boral K; Miguell M D; Kerber V A. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae. *Rev Bras Farmacologia*. 2007; 17(2): 231-5.
 19. Prenzler M S; Antolovich M; Robards K. Phenolics content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chemistry*. 2001; 73: 73-84.
 20. Velioglu Y S; Mazza G; Gao L; Oomah B D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1998; 19(46): 4113-7.z
 21. Pinho B H; Machado M I; Badiale-Furlong E. Propriedades Fisico-químicas das massas de pizza semi-prontas e sua relação com o desenvolvimento de bolores e leveduras. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2001; 60(1): 35-41.

Análise da estabilidade e da composição em ácidos graxos em manteiga de garrafa produzida artesanalmente

Stability and fatty acids composition evaluation in bottled butter craftsmanly produced

RIALA6/1209

Bruna Aparecida Souza MACHADO*, Janice Izabel DRUZIAN

*Endereço para correspondência: Faculdade de Farmácia, Departamento de Análises Bromatológicas, Universidade Federal da Bahia (UFBA). Rua Barão de Geremoabo, s/n – Ondina CEP: 40170-115, Salvador, BA, Brasil. e-mail: brunamachado@ufba.br

Faculdade de Farmácia, Departamento de Bromatologia, Universidade Federal da Bahia., BA, Brasil

Recebido: 13.04.2009 – Aceito para publicação: 12.08.2009.

RESUMO

A manteiga de garrafa é constituída de gordura anidra e, portanto, muito susceptível à oxidação lipídica, cujo processo de fabricação é artesanal e sem adequado controle das etapas de processamento. O objetivo desse estudo foi de determinar a composição de ácidos graxos, principalmente quanto às gorduras saturadas e dos isômeros *trans*, em amostras de manteiga de garrafa de produção artesanal e comercializadas em diferentes regiões da Bahia, Brasil. Foi também avaliada a estabilidade dessas amostras no período de sete meses, estocadas em geladeira a 5°C, determinando-se o índice de peróxido e acidez. Os teores de saturados nas amostras analisadas variaram de 67,13 a 69,22% e os de insaturados de 23,73 a 24,28%. Os teores de ácidos graxos 18:1 *trans* variaram de 3,69 a 3,94%. Todas as amostras de manteiga avaliadas apresentaram elevados índices de peróxido no tempo inicial (2,01-2,31 mEq/Kg) com pouca alteração após sete meses de estocagem (2,10-2,42 mEq/Kg). O mesmo comportamento foi observado para os teores de acidez, passando de 0,53-0,62% de ácido oléico para 0,54-0,61% após sete meses de estocagem. Apesar de a produção ser artesanal, os resultados demonstram estreita similaridade quanto às características de identidade entre as manteigas de garrafa comercializadas em diferentes microrregiões da Bahia.

Palavras-chave. manteiga de garrafa, lipídios, estabilidade, ácidos graxos, isômeros *trans*.

ABSTRACT

The bottled butter consisted of anhydrous fat, consequently it is highly susceptible to lipid oxidation, and also it is craftsmanly prepared without adequate processing control. In this context, the purpose of the present study was to evaluate the composition of fatty acids, predominantly on saturated fat and *trans* fatty acids, in 10 bottled butter produced and marketed in different regions of Bahia, Brazil. Also, the stability of bottled butter for period of seven months in samples stored at 5°C was assessed by determining the peroxide index and acidity. The saturated fatty acids contents in analyzed samples ranged from 67.13 to 69.22% and the unsaturated ranged from 23.73 to 24.28%. The 18:1 *trans* fatty acids contents varied from 3.69 to 3.94%. All of analyzed butter samples showed high amount of peroxide at initial time (2.01-2.31 mEq / kg) and a slight change after being stored for seven months (2.10-2.42 mEq / kg). The same pattern was observed in relation to acidity, being at first time 0.53-0.62% of oleic acid and 0.54-0.61% after seven months of storage. Although these bottled butter samples are handmade products, similarities on the identity characteristics were found among bottled butter samples on the market at different microregions of Bahia, Brazil.

Key words. bottle butter, lipids, stability; fatty acids, *trans* fatty acids.

INTRODUÇÃO

A manteiga de garrafa é um tipo de manteiga regional produzida no nordeste do Brasil que, dependendo da região específica de produção, recebe outras denominações tais como manteiga de gado, manteiga da terra ou manteiga de cozinha. É um produto bastante apreciado por boa parte da população, cuja comercialização é feita através de feiras livres, mercados populares, supermercados, restaurantes típicos e pequenos pontos comerciais de comidas regionais¹, possuindo parâmetros de identidade e qualidade estabelecidos pela legislação através do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de manteiga da terra ou manteiga de garrafa².

O consumo de alimentos lipídicos com altos teores de saturados é na atualidade motivo de polêmica no que diz respeito às possíveis implicações na saúde humana, pois diminuem o nível do colesterol-HDL e elevam o do LDL, que são parâmetros bioquímicos considerados na avaliação da aterogenicidade da dieta³. Apesar das etapas do processamento da manteiga de garrafa não serem controlados, sabe-se que temperaturas elevadas por tempos variados são utilizadas, o que pode contribuir para a formação de compostos *trans*, assim como, de compostos da termoxidação; portanto, constata-se a necessidade de estudos voltados para a avaliação destes parâmetros de qualidade.

Os relatos de pesquisas referentes à manteiga de garrafa são escassos, especialmente sobre a composição de ácidos graxos e aos efeitos das condições de armazenamento. A estabilidade química da manteiga de garrafa é afetada pela elevação da temperatura, exposição à luz e à umidade, acarretando prejuízos significativos em sua qualidade nutricional⁴, e apresenta uma curta vida-de-prateleira face a oxidação lipídica que a torna inadequada para consumo após 60 dias a partir da data de fabricação⁵.

Os isômeros geométricos *trans* de ácidos graxos insaturados são formados no processo de fritura, assim como no refino de óleos e no processo de hidrogenação, por mecanismo induzido termicamente^{5,11}. Por outro lado, são constituintes naturais de alimentos de origem animal como derivados de carnes e leites⁶.

Modificações da legislação brasileira a partir de agosto de 2008 obrigaram os fabricantes a incluir nos rótulos maiores informações para os consumidores, como a soma dos teores de *trans* aos dos ácidos graxos saturados, e a quantidade específica de ácidos graxos *trans*⁷.

Com as perspectivas de se obter mais informações quanto à composição de ácidos graxos de manteigas de

garrafa, este estudo teve como objetivo avaliar o perfil dos ácidos graxos e o teor de isômeros geométricos *trans* em amostras oriundas de diferentes municípios da Bahia, bem como avaliar a estabilidade durante o armazenamento a 5°C por um longo período, através da determinação do teor de umidade, índice de peróxido e índice de acidez.

MATERIAL E MÉTODOS

■ Obtenção e armazenamento das amostras

Foram analisadas dez amostras de manteiga, acondicionadas em garrafas de plástico transparente, com capacidade para 1000 mL, coletadas no período de abril a junho de 2007 em dez diferentes municípios do estado da Bahia: Santana (1), Livramento de Nossa Senhora (2), Rio de Contas (3), Medeiros Neto (4), Dom Basílio (5), Itabuna (6), Vitória da Conquista (7), Feira de Santana (8), Alagoinhas (9) e Brumado (10). Todas as amostras foram adquiridas em feiras livres e produzidas artesanalmente. As amostras foram estocadas em geladeira (5°C) por 7 meses.

■ Determinação da umidade

Para a análise de determinação de umidade das dez amostras de manteigas foi utilizada a metodologia de Lanara⁸. Foi identificado o percentual de umidade no tempo zero, após quatro e sete meses de estocagem das amostras.

■ Determinação do índice de peróxido e acidez

A estabilidade da manteiga de garrafa foi avaliada através das determinações do Índice de Peróxido e do Índice de Acidez de acordo com as técnicas descritas nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz⁹. A determinação do índice de acidez foi feita por titulação com solução de KOH 0,01N e o resultado foi expresso em solução normal em %. A determinação do índice de peróxido foi realizada por titulação com solução de Na₂S₂O₃ 0,01N e o resultado foi expresso em miliequivalentes de peróxidos contido em 1000 gramas de gordura. Essas determinações foram realizadas em triplicatas no tempo zero, após quatro meses e setes meses de armazenamento das amostras.

■ Transesterificação dos lipídios totais

Os lipídios totais foram submetidos ao processo de transesterificação para a preparação dos ésteres metílicos de ácidos graxos segundo a metodologia de Joseph e Ackman¹⁰. A fase superior (iso-octano e ésteres metílicos de ácidos graxos) foi transferida para frascos de 5mL de

capacidade, fechados hermeticamente e armazenados a -18°C , para posterior análise cromatográfica.

■ Análise cromatográfica dos ésteres metílicos de ácidos graxos

Os ésteres de ácidos graxos foram analisados em um cromatógrafo gasoso CP 3800 (Varian), utilizando uma coluna capilar CP-WAX 58 (FFAP) CB (25m X 0,25mm X 0,2 μm) equipado com detector de ionização de chama (CG-DIC). Os fluxos dos gases foram de 1,3mL.min⁻¹ para o gás de arraste H₂, 30mL.min⁻¹ para o gás auxiliar (“make-up”) N₂ e 30 e 300mL.min⁻¹ para os gases da chama H₂ e ar sintético, respectivamente. A razão de divisão (“split”) da amostra foi de 1:100. A temperatura da coluna foi programada a 150 $^{\circ}\text{C}$ por 16 minutos, sendo então elevada para 180 $^{\circ}\text{C}$ a uma taxa de 2 $^{\circ}\text{C}$.min⁻¹, permanecendo nesta temperatura por 20 minutos. Em seguida, a temperatura foi elevada para 210 $^{\circ}\text{C}$ a uma taxa de 5 $^{\circ}\text{C}$.min⁻¹, permanecendo nesta temperatura por 20 minutos. As temperaturas do injetor e detector foram de 250 $^{\circ}\text{C}$ e 280 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente. A esterificação das amostras foi realizada em triplicata, com injeções de 1 μL em triplicatas para cada amostra esterificada. A quantificação foi realizada por normalização das áreas dos picos, e a identificação dos picos por comparação dos tempos de retenção das amostras com os de padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos (Sigma189-19 USA).

■ Tratamento estatístico dos dados

As análises da média e desvio padrão foram realizadas pelo Microsoft Excel, versão 5.0 da Microsoft Inc. Para os resultados entre as médias foi fixado o nível de erro em 95% de confiança.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O monitoramento do teor de umidade ao longo da estocagem de manteiga de garrafa oriundas de dez diferentes municípios da Bahia por sete meses a 5 $^{\circ}\text{C}$, mostra pequena alteração no parâmetro. Os valores no tempo zero variaram de 0,20 a 0,25%; após 4 meses de 0,24 a 0,30%; e após 7 meses de armazenamento de 0,27 a 0,33% (Tabela 1). Após os sete meses de estocagem apenas as amostras 1, 2 e 5 com 0,32; 0,33 e 0,32% de umidade, respectivamente, apresentaram valores fora dos parâmetros exigidos pela legislação para manteigas de garrafa, a qual preconiza um valor máximo de 0,30% de umidade. Os valores encontrados são inferiores aos encontrados por Pereira¹¹

et al. para o mesmo tipo de amostra. Resultados semelhantes foram encontrados por Nassu¹² et al. para manteiga de garrafa oriunda do Ceará, (0,10-0,39%), e por Ambrósio¹ et al. para manteigas de Recife (0,2%). Entretanto, todas as amostras analisadas do norte de Minas Gerais¹³, apresentaram teores de umidade fora do padrão estabelecido pela Legislação². Essas diferenças podem ser devido à grande variação nas etapas de fusão e cozimento da manteiga, que podem ocorrer num período que varia de 2 a 6 horas dependendo da prática regional.

Considerando que a oxidação dos lipídios é uma das principais causas de alteração de produtos alimentícios, a qualidade das dez amostras de manteiga de garrafa produzidas artesanalmente em diferentes municípios do Estado da Bahia foi avaliada através da determinação do índice de acidez e do índice de peróxido ao longo do armazenamento a 5 $^{\circ}\text{C}$ por 7 meses (Tabela 1).

Em relação ao índice de peróxido, os resultados foram semelhantes para as dez amostras no final da estocagem (2,18 \pm 0,12 a 2,30 \pm 0,11 mEq/Kg). Os valores no tempo zero variaram de 2,01 a 2,32 mEq/Kg, e após quatro meses estocados a 5 $^{\circ}\text{C}$ passou de 2,07 a 2,36 mEq/Kg, e após sete meses alterou para valores entre 2,10 a 2,42 mEq/Kg. A diferença registrada entre os valores do tempo inicial e final da estocagem indica uma pequena velocidade de propagação da reação de oxidação. Após sete meses de armazenamento das manteigas, todas as amostras apresentaram índices de peróxido inferiores aos relatados por Ambrósio⁵ para duas amostras de manteigas armazenadas a temperatura ambiente, por Vieira¹⁴ para amostras de manteigas industrializadas e por Iskander¹⁵ para o “ghee”, que é um produto similar à manteiga na Índia. Devido à ausência de uma legislação específica que limite a quantidade de índice de peróxido em manteigas de garrafa, neste estudo considerou-se o que é preconizado pela Portaria n $^{\circ}$ 146 do Ministério da Agricultura¹⁶ para manteigas. Considerando esta norma, os valores encontrados para as dez amostras de manteiga de garrafa analisadas encontram-se fora do parâmetro exigido que é de 1,00 mEq/Kg.

Os valores de índice de acidez variaram de 0,53 a 0,62 ácido oléico % no tempo zero, sendo estes semelhantes aos encontrados por Ambrósio¹ para o mesmo tipo de amostra oriunda de Recife (0,39 – 0,62 ácido oléico %). Para manteigas de garrafa oriundas do norte de Minas Gerais¹³ o índice de acidez apresentou acentuada variação, sendo que 50% delas apresentaram valores acima do limite estabelecido pela Legislação². Os

Tabela 1. Teor de Umidade¹ (%), índice de peróxido¹ (mEq/Kg) e índice de acidez¹ (%) de manteigas de garrafa de dez diferentes municípios da Bahia, armazenadas a 5°C por sete meses.

Análise físico-química tempo (meses)	Amostras										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Média
zero	0,22±0,02	0,25±0,01	0,23±0,01	0,21±0,02	0,22±0,01	0,24±0,03	0,20±0,01	0,23±0,02	0,21±0,01	0,22±0,02	0,22±0,01
quatro	0,29±0,01	0,28±0,03	0,30±0,02	0,26±0,03	0,25±0,01	0,28±0,02	0,25±0,01	0,24±0,01	0,24±0,02	0,25±0,01	0,26±0,02
sete	0,32±0,01	0,33±0,02	0,31±0,01	0,29±0,02	0,27±0,01	0,32±0,02	0,27±0,01	0,30±0,02	0,27±0,01	0,29±0,02	0,30±0,02
Média	0,28±0,05	0,29±0,04	0,28±0,04	0,25±0,04	0,25±0,02	0,28±0,04	0,24±0,03	0,26±0,03	0,24±0,03	0,25±0,03	0,26±0,04
zero	2,31±0,07	2,32±0,03	2,01±0,01	2,03±0,03	2,19±0,04	2,05±0,03	2,22±0,01	2,26±0,02	2,30±0,02	2,15±0,04	2,18±0,12
quatro	2,36±0,02	2,36±0,03	2,07±0,02	2,14±0,04	2,23±0,02	2,12±0,02	2,29±0,01	2,31±0,03	2,34±0,03	2,20±0,01	2,24±0,11
sete	2,40±0,04	2,42±0,02	2,10±0,03	2,19±0,01	2,27±0,01	2,21±0,01	2,33±0,02	2,37±0,03	2,41±0,01	2,29±0,02	2,30±0,11
Média	2,36±0,04	2,37±0,05	2,06±0,05	2,12±0,08	2,23±0,04	2,12±0,08	2,28±0,06	2,31±0,05	2,35±0,06	2,21±0,07	2,24±0,06
zero	0,62±0,02	0,53±0,01	0,59±0,01	0,57±0,02	0,60±0,03	0,57±0,03	0,58±0,01	0,54±0,02	0,59±0,02	0,61±0,04	0,58±0,03
quatro	0,61±0,02	0,54±0,02	0,58±0,02	0,58±0,04	0,61±0,02	0,58±0,02	0,59±0,01	0,55±0,03	0,58±0,03	0,60±0,01	0,58±0,02
sete	0,60±0,01	0,54±0,02	0,59±0,03	0,58±0,01	0,61±0,03	0,56±0,01	0,59±0,01	0,54±0,03	0,60±0,01	0,60±0,02	0,58±0,03
Média	0,61±0,01	0,54±0,01	0,59±0,01	0,58±0,01	0,61±0,01	0,57±0,01	0,59±0,01	0,54±0,01	0,59±0,01	0,60±0,01	0,58±0,01

¹Valor ± desvio padrão de triplicatas.

percentuais de índice de acidez obtidos para as amostras da Bahia encontram-se dentro do máximo estabelecido pela legislação² para manteiga de garrafa que é de 2,0%. Após quatro e sete meses de estocagem esses valores variaram de 0,54 a 0,61% (Tabela 1).

Os valores elevados de índice de peróxido e baixos de acidez indicam que as manteigas produzidas nos dez municípios da Bahia ao serem coletadas já apresentam um alto grau oxidativo, entretanto uma baixa hidrólise. Os valores de umidade, índice de peróxido e de acidez das dez amostras de manteiga de garrafa analisadas neste estudo não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre si.

A separação dos metil ésteres de ácidos graxos obtidos por CG-DIC dos padrões e de uma das amostras de manteigas de garrafa estão ilustradas na Figura 1. Na Tabela 2 encontra-se a quantificação dos ácidos graxos por normalização.

Foram identificados 20 ácidos graxos em todas as amostras de manteiga de garrafa, e os predominantes foram 14:0 (mirístico, $12,41 \pm 0,24$), 16:0 (palmítico,

$32,48 \pm 0,25$), 18:0 (esteárico, $12,32 \pm 0,09$) e 18:1 ω -9 *cis* (oléico, $11,30 \pm 0,13$), (Tabela 2). Os percentuais de ácidos graxos das dez amostras de manteiga de garrafa quantificadas neste estudo não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre si.

Os percentuais obtidos para os ácidos graxos majoritários (Tabela 2) são similares aos encontrados por Richard e Gioelle¹⁷ para o mesmo tipo de amostra, que variaram de 9,7 a 12,1% para 14:0, de 22,0 a 26,1% para 16:0, de 9,6 a 11,7% para 18:0 e de 21,9 a 24,2% para 18:1 ω -9 *cis*, porém com menor desvio padrão entre amostras.

As médias encontradas para os somatórios de ácidos graxos saturados e insaturados das amostras do presente estudo foram de 67,71% e 23,90%, respectivamente (Tabela 2). Esses valores são similares aos encontrados por Ambrósio⁵.

O percentual médio de gordura *trans* das dez amostras e a baixa variação entre amostras ($3,76 \pm 0,20$, Tabela 2) apresentam similaridade com os valores relatados por Ambrósio⁵, superiores aos encontrados por Smith¹⁸ (1,8 a 2,0%), e inferiores aos de Lake¹⁹ (5,4 a 7,9%). Vale ressaltar que o teor médio de ácidos graxos *trans* encontrado é bastante similar ao encontrado para manteigas industrializadas⁵, ou seja, o processamento da manteiga de garrafa parece não contribuir para o aumento deste parâmetro. De acordo com Sommerfeld²⁰, é normal que ocorra uma variabilidade de 4 a 11% destes isômeros em manteigas, visto que a constituição da gordura pode ser influenciada por condições locais e sazonais.

Soares e Franco²¹ determinaram os níveis de *trans* em diferentes marcas de margarina e creme vegetal produzidas no Brasil, obtendo valores médios de 20,7% em margarinas cremosas, 32,2% em margarinas duras, 23,1% em cremes vegetais e 39,7% em gordura vegetal hidrogenada. Block e Barrera²² encontraram teores de 16,47 a 62,05% em gorduras hidrogenadas, sendo que a maioria das amostras apresentou valores entre 30 e 40%. Portanto, a ingestão de manteiga pode ser uma alternativa para atender as tendências de minimização de ácidos graxos *trans* em produtos vegetais gordurosos.

Pelas características estruturais, os ácidos graxos na forma *trans* apresentam ponto de fusão mais elevado quando comparado com seu isômero *cis* correspondente, e próximos ao ponto de fusão dos ácidos graxos saturados com mesmo número de átomos de carbono. De acordo com a portaria n° 27, de 13 de janeiro de 1998, da Vigilância Sanitária, do Ministério da Saúde, os ácidos graxos *trans* devem ser incluídos no cálculo dos ácidos

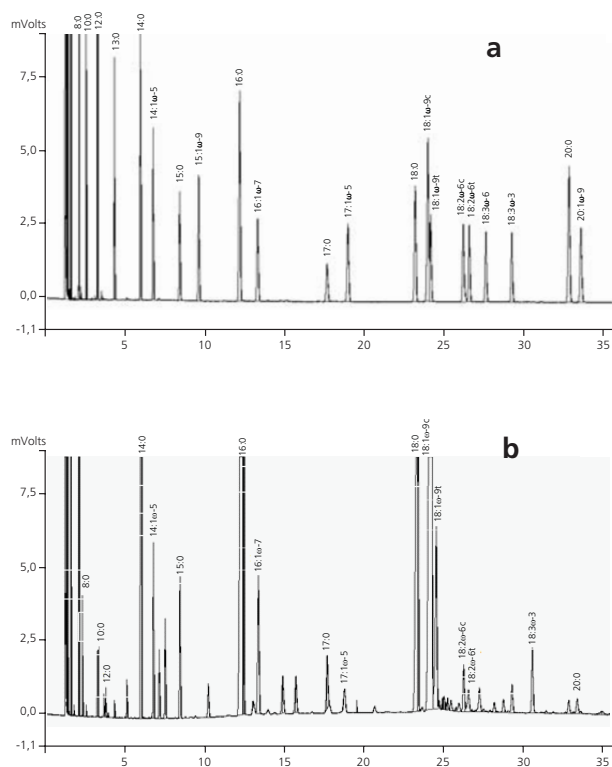


Figura 1. Cromatograma CG-DIC: (a) padrão de ésteres metílicos de ácidos graxos, (b) amostra 4 de manteiga de garrafa.

Tabela 2. Composição de ácidos graxos¹ (em % de área) de manteiga de garrafa oriundas de dez diferentes municípios da Bahia.

Ácidos Graxos	Amostras										Média
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Caprílico (8:0)	1,01±0,23	1,09±0,29	1,04±0,27	1,07±0,34	1,05±0,31	1,08±0,28	1,01±0,41	1,09±0,36	1,06±0,15	1,07±0,25	1,06±0,03
Cáprico (10:0)	2,79±0,78	2,61±0,57	2,46±0,54	2,53±0,78	2,35±0,49	2,82±0,87	2,19±0,55	2,81±0,71	2,24±0,97	2,87±0,71	2,57±0,25
Láurico (12:0)	4,21±0,97	4,29±1,01	4,54±1,06	4,66±0,93	4,34±0,98	4,71±1,07	4,31±0,93	4,90±1,08	4,26±0,87	4,51±0,91	4,47±0,23
Mirístico (14:0)	12,24±1,78	12,69±1,32	12,12±1,14	12,27±1,92	12,35±1,41	12,78±1,22	12,32±1,17	12,77±1,16	12,34±0,94	12,27±1,13	12,41±0,24
Pentadecanóico (15:0)	1,41±0,34	1,49±0,32	1,44±0,28	1,47±0,23	1,42±0,22	1,57±0,34	1,55±0,27	1,40±0,29	1,56±0,38	1,50±0,39	1,48±0,06
Palmitico (16:0)	32,28±2,12	32,19±2,41	32,46±1,98	32,36±1,96	32,79±1,56	32,72±1,78	32,26±1,72	32,91±1,47	32,27±1,72	32,55±1,76	32,48±0,25
Margárico (17:0)	0,81±0,11	0,89±0,09	0,84±0,16	0,87±0,15	0,84±0,12	0,88±0,08	0,81±0,10	0,89±0,16	0,86±0,07	0,87±0,12	0,86±0,03
Esteárico (18:0)	12,33±1,22	12,24±1,32	12,45±1,24	12,32±1,65	12,27±1,14	12,18±1,41	12,42±1,18	12,36±1,75	12,39±1,53	12,21±1,16	12,32±0,09
Eicosanóico (20:0)	0,05±0,01	0,09±0,01	0,05±0,02	0,09±0,03	0,08±0,02	0,04±0,01	0,06±0,03	0,09±0,03	0,07±0,02	0,06±0,01	0,07±0,02
Total AG Saturados	67,13	67,58	67,40	67,64	67,49	68,78	66,93	69,22	67,05	67,91	67,71±0,75
Miristoléico (14:1) ω-5	0,91±0,09	0,99±0,07	1,04±0,11	0,97±0,10	0,94±0,09	0,98±0,12	1,01±0,12	1,09±0,08	1,06±0,12	0,97±0,09	1,00±0,05
Palmitoléico (16:1) ω-7	1,54±0,12	1,51±0,14	1,53±0,15	1,59±0,17	1,49±0,13	1,42±0,11	1,58±0,17	1,50±0,12	1,52±0,11	1,48±0,13	1,52±0,05
Heptadecanóico (17:1) ω-5	0,23±0,01	0,25±0,03	0,29±0,02	0,31±0,01	0,24±0,02	0,30±0,03	0,32±0,02	0,23±0,03	0,31±0,02	0,27±0,01	0,27±0,03
18:1 (6-8t+9t+10t)	3,71±0,70	3,69±0,65	3,24±0,24	3,87±0,53	3,94±0,57	3,78±0,45	3,91±0,58	3,79±0,41	3,76±0,62	3,87±0,29	3,76±0,20
Oléico (18:1) ω-9 cis	11,32±1,24	11,27±1,31	11,63±1,13	11,12±1,23	11,37±1,19	11,21±1,27	11,29±1,43	11,26±1,11	11,24±1,30	11,29±1,10	11,30±0,13
Linoléico (18:2) ω-6 cis	3,11±0,53	3,19±0,57	3,14±0,42	3,16±0,47	3,14±0,59	3,18±0,40	3,20±0,29	3,21±0,37	3,06±0,33	3,09±0,50	3,15±0,05
Linolénico (18:3) ω-3	2,99±0,31	2,87±0,29	2,86±0,23	2,93±0,20	2,88±0,45	2,89±0,40	2,97±0,53	2,91±0,19	2,84±0,25	2,98±0,43	2,91±0,05
Não identificados	9,10	8,65	8,87	8,41	8,51	7,46	8,84	6,79	9,16	8,14	8,39±0,75
Total AG Insaturados	23,81	23,77	23,73	23,95	24,00	23,76	24,28	23,99	23,79	23,95	23,90±0,17
AG Saturados+ AG trans ²	70,84	71,27	70,64	71,51	71,43	72,56	70,84	73,01	70,81	71,78	71,47±0,79

¹Valor ± desvio padrão de triplicata.

²De acordo com a portaria n° 27, de 13 de janeiro de 1998, da Vigilância Sanitária, do Ministério da Saúde, os ácidos graxos *trans* estão sendo computados no cálculo dos ácidos graxos saturados.

graxos saturados²³. Portanto, o somatório médio do percentual de ácidos graxos saturados e ácidos graxos *trans* das dez amostras de manteiga de garrafa foi de 71,47±0,79 (Tabela 2).

Uma diferença marcante na composição de ácidos graxos está relacionada à ausência do ácido butírico (4:0) e ácido capróico (6:0) na manteiga de garrafa quando comparada à manteiga industrial²⁴. Esta diferença era esperada, uma vez que a manteiga de garrafa passa por aquecimento durante o processamento, e os ácidos graxos de menor ponto de ebulição são volatilizados.

Os resultados obtidos no presente estudo também permitem constatar que a manteiga de garrafa tem uma identidade semelhante ao estabelecido pela Portaria nº 146 do Ministério da Agricultura, para o “butteroil”^{2,5}.

Apesar das amostras de manteiga serem fabricadas em diferentes municípios da Bahia, os desvios padrão para todos os ácidos graxos das dez amostras foi baixo, o que indica que o processamento, apesar de artesanal, apresenta uma uniformidade.

CONCLUSÃO

Constata-se que o maior problema das manteigas de garrafas produzidas artesanalmente nos diferentes municípios da Bahia está relacionado ao elevado grau de oxidação que o produto apresenta já no momento de sua aquisição. Apesar do alto grau oxidativo apresentado por todas as amostras oriundas de diferentes municípios da Bahia, constata-se que o armazenamento da manteiga em geladeira a uma temperatura de 5°C por até 7 meses controla o avanço da reação de oxidação. A quantidade de ácidos graxos *trans* e os valores de umidade e acidez encontrados nas dez amostras de manteiga estão dentro dos parâmetros preconizados pela legislação brasileira.

O perfil cromatográfico e os percentuais dos somatórios de ácidos graxos saturados e insaturados foram similares aos característicos da matriz, indicando que as amostras não foram fraudadas com outro tipo de gordura, e que o processamento de manteiga de garrafa não aumenta o teor de ácidos graxos *trans*, porém leva a volatilização do ácido butírico (C4:0) e ácido capróico (C6:0). Apesar do processo de produção ser artesanal, os resultados obtidos demonstram estreita similaridade quanto às características de identidade entre as manteigas de garrafa de diferentes municípios da Bahia.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Programa Permanecer da Universidade Federal da Bahia, a Fundação de Apoio à Pesquisa e à Extensão (Fapex) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (Fapesp) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Ambrósio CLB, Guerra BN, Mancini FJ. Características de identidade, qualidade e estabilidade de manteiga de garrafa. Parte I - Características de qualidade e identidade. *Ciênc Tecnol Aliment* 2001; 21 (3).
2. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de manteiga da terra ou manteiga de garrafa. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF. 26 jul 2001.
3. Valenzuela A, Morgado N. Trans fatty acid isomers in human health and in the food industry. *Santiago* 1999; 32: 273–87.
4. Santos, EP. Estabilidade química da manteiga da terra. [dissertação, mestrado] Bananeiras, Paraíba: Universidade Federal da Paraíba; 1995. 84p.
5. Ambrósio CLB, Guerra NB, Mancini FJ. Características de identidade, qualidade e estabilidade da manteiga de garrafa. Parte II - Estabilidade. *Ciênc Tecnol Aliment* 2003; 23 (3): 351-4.
6. Sebedio JL, Catte M, Boudier MA, Prevost J, Grandgirard A. Formation of fatty acid geometrical isomers and of cyclic fatty acid monomers during the finish frying of frozen prefried potatoes. *Food Res Int.* 1996; 29 (2): 109–16.
7. Food and Drug Administration – FDA. Trans fatty acid in nutrition labeling, nutrient content claims, and health claims [acesso em: 27 mar 2008]. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/label.html>.
8. Brasil. Ministério da Agricultura. Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes, Brasília, DF, LANARA, 1981. 122p.
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.
10. Joseph JD, Ackman RG. Capillary column gas chromatography method for analysis of encapsulated fish oil and fish oil ethyl esters: collaborative study. *J AOAC Int* 1992; 75: 488-506.
11. Pereira DA, Szpiz RR, Jablonka FH. Manteiga de garrafa: análise e composição. Rio de Janeiro: EMBRAPA/CTAA, 1986.
12. Nassu RT, Araújo RS, Borges MF, Lima JR, Macedo BA, Lima MHP, Bastos MSR. Diagnóstico das condições de processamento de produtos regionais derivados do leite no Estado do Ceará. *Embrapa Agroind Tropic* 2001; 28.
13. Clemente MG, Abreu LR. Caracterização química, físico-química e rancidez oxidativa de manteiga de garrafa. *Ciênc Agrotec* 2008; 32, (2): 493-6.
14. Vieira MLM. Oxidação lipídica em manteiga: avaliação de métodos analíticos. [dissertação de mestrado]. Pernambuco: Recife, Universidade Federal de Pernambuco, 1994; 84p.

15. Iskander MH, Bayoumi SE, Shalabi SI. Composition and storage stability of commercial anhydrous milk fat and hydrogenated oils. *J Food Techn.* 1985; 20: 83-8.
16. Brasil. Ministério da Agricultura. Portaria n.146, de 7 de mar. 1996.; Diário Oficial da República Federativa do Brasil; Brasília ,DF, 11 mar 1996.
17. Richards NSPS, Gioielli LA. Desenvolvimento e caracterização de manteigas aromatizadas. [Tese de doutorado]. São Paulo: São Paulo, Universidade de São Paulo, 2001.
18. Smith LM, Dunkley WL, France A, Dairiki T. Measurement of trans and other isomeric unsaturated fatty acids in butter and margarine. *J Amer Chem Soc.* 1978; 55: 257-261.
19. Lake R, Thomson B, Devane G, Scholes P. Trans fatty content of selected New Zealand Foods. *J Food Compos Anal.* 1996; 9, (42): 365- 74.
20. Sommerfeld M. Trans unsaturated fatty acids in natural products and processed foods. *Prog Lipid Res.* 1983; 22: 221-33.
21. Soares LMV, Franco MRB. Níveis de trans-isômeros e composição de ácidos graxos de margarinas nacionais e produtos hidrogenados semelhantes. *Ciênc Tecnol Aliment.* 1990; 10, (1): 57-71.
22. Block, JM, Barrera, D. Produtos hidrogenados no Brasil: isômeros trans, características físico-químicas e composição em ácidos graxos. *Archiv Latinoameric de Nutric.* 1993; 44, (4): 281-5.
23. Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria n.27, 13 janeiro de 1998. Aprova Regulamento Técnico referente à informação nutricional complementar. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 16 de jan 1998.
24. Augusta, IM, Santana, DMN. Avaliação da Qualidade de manteigas tipo Extra comercializadas no estado do Rio de Janeiro. *Ciênc Tecnol Aliment.* 1998; 18, (4): 379-81.

Farinhas mistas de trigo e de soja agregam valor nutricional e sensorial em pães

Wheat-soybeans mix flours improve the bread nutritional and sensorial characteristics

RIALA6/1210

Maria Inês de Souza DANTAS^{1*}, Gláucia Ferreira ANDRADE¹, Newton Deniz PIOVESAN², Hércia Stampini Duarte MARTINO¹

*Endereço para correspondência: Departamento de Nutrição e Saúde, Universidade Federal de Viçosa. Av. P.H. Rolfs S/N, CEP 36570000, Viçosa, MG, Brasil. e-mail: msdantas@ufv.br

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

²BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil

Recebido: 30.03.2009 – Aceito para publicação: 12.08.2009.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar a composição centesimal e as características sensoriais de pães elaborados com concentração proporcional de farinhas de soja integral e de trigo. Foram elaboradas quatro formulações de pães doces, utilizando-se farinhas mistas de trigo (50%) e de soja (50%) de diferentes cultivares, destinados à alimentação humana, sendo um cultivar convencional, dois sem lipoxigenases e o quarto com baixo teor de inibidor de tripsina. Foram avaliados os teores de carboidratos, proteínas, lipídios, calorias, resíduo mineral fixo e umidade. A aceitação sensorial foi testada por 101 consumidores empregando-se a escala hedônica estruturada de nove pontos; os dados foram analisados por meio de técnica de mapa de preferência interno. A incorporação da farinha de soja integral na mesma concentração da farinha de trigo (razão 50:50) nas formulações aumentou o valor nutricional dos pães, especialmente quanto aos teores de proteína e de lipídio, em comparação ao pão convencional. A aceitação das formulações sugere que a utilização da farinha de soja de cultivares sem lipoxigenases minimizou os problemas sensoriais indesejáveis, característicos da soja. O uso de farinhas mistas de soja e trigo na mesma proporção agregou valor nutricional e promoveu boa aceitação sensorial dos produtos, especialmente nos pães elaborados com farinha de soja sem lipoxigenases.

Palavras-chave. pão, soja, aceitação.

ABSTRACT: The present study aimed at assessing the sensorial characteristic and the centesimal composition of breads made up with wheat-soybean mixed flour. Four sweet breads formulation were prepared using wheat-soybean mix flour (50:50 ratio) from different cultivars, which are used for human consumption, being a conventional one, two without lipoxygenases, and the fourth with low contents of trypsin inhibitor. Amounts of proteins, lipids, carbohydrate, moisture, ashes and calories were evaluated. A hundred one consumers evaluated the formulations, and the sensorial characteristic acceptance by consumers was done by means of nine-point structured hedonic scale, and the Internal Preference Mapping technique was used to analyze the data. The use of wheat-soybean mixed flour increased the nutritional value of prepared breads, when compared with those made from the conventional formulation, especially referring to protein and lipid contents. Formulations prepared with soy flours from lipoxygenase-free cultivars significantly reduced the characteristic and distasteful flavor of soybean. The use of wheat-soybean mixed flours in the same proportion improved the nutritional proprieties and the highly accepted sensory characteristic. The sensory acceptance was observed especially in bread prepared with lipoxygenases-free soybean flour.

Key words. breads, soybean, acceptance.

INTRODUÇÃO

Dentre os alimentos cujas alegações de saúde têm sido amplamente divulgadas destaca-se a soja (*Glycine Max. (L) Merril*). Suas características químicas e nutricionais a qualificam como um alimento funcional. Além da qualidade de sua proteína, estudos mostram que a soja pode ser utilizada de forma preventiva e terapêutica no tratamento de doenças cardiovasculares, câncer, osteoporose e sintomas da menopausa^{1,2}. Entretanto, o uso de soja como ingrediente na obtenção de produtos alimentícios tem sido limitado pelo sabor característico, que é atribuído à presença das enzimas lipoxigenases, que oxidam os ácidos graxos poli-insaturados existentes no grão³. A elaboração de produtos de soja utilizando cultivares de sabor melhorado, mais apropriados à alimentação humana, poderá otimizar o seu consumo no Brasil.

Considerando os hábitos alimentares observados entre as diferentes culturas e regiões do Brasil, pode-se afirmar que o pão é apreciado devido à sua aparência, aroma, sabor, preço e disponibilidade⁴. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), na Resolução RDC nº 90, de 18/10/2000, o pão é definido como um produto obtido pela cocção, em condições tecnologicamente adequadas, de uma massa fermentada, ou não, preparada com farinha de trigo e/ou outras farinhas que contenham naturalmente proteínas formadoras de glúten ou adicionadas das mesmas e água, podendo conter outros ingredientes⁵. Os ingredientes básicos para a produção de pães são: farinha de trigo, fermento e água. Além desses, normalmente são adicionados outros ingredientes, para obtenção de características específicas desejadas como sal, açúcares, glúten vital, agentes reforçadores do glúten, enzimas, gorduras, entre outros.

As mudanças no processamento e a crescente exigência do consumidor por alimentos que apresentem, além da alta qualidade sensorial e nutricional, benefícios associados à saúde, fazem surgir a necessidade de novos ingredientes que possam atender a estas exigências do mercado. A fabricação de pães com farinha mista possibilita o enriquecimento nutricional do produto além de suprir a necessidade dos consumidores por produtos diversificados⁶.

O sucesso do alimento no mercado depende do seu desempenho junto ao consumidor. A determinação da aceitação e/ou preferência do produto torna-se indispensável no processo de desenvolvimento de novos produtos, bem como no melhoramento de processos,

na substituição de ingredientes⁷. A técnica mapa de preferência tem sido utilizada para analisar dados gerados a partir de testes com consumidores. Trata-se de um procedimento estatístico multidimensional que considera a individualidade dos consumidores e não somente a média do grupo de consumidores que avaliaram o produto. É uma representação gráfica das diferenças de aceitação entre as amostras que permite a identificação de cada consumidor e suas preferências em relação às amostras avaliadas⁷.

Este trabalho teve como objetivo avaliar as características nutricionais e sensoriais de pães elaborados com concentração proporcional de farinhas de soja integral e de trigo.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados quatro cultivares de soja destinados à alimentação humana. Os cultivares Embrapa 48, BRS-155 e BRS-213 foram fornecidos pela Embrapa Soja de Londrina, PR. A Embrapa 48 é um cultivar convencional, que tem sido preferido pela indústria brasileira de extrato de soja. O cultivar BRS-155 apresenta teor reduzido de inibidor de tripsina e o cultivar BRS-213 não contém lipoxigenase. A variedade UFVTN-105, também isenta de lipoxigenase, foi fornecida pelo Bioagro (Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária) da Universidade Federal de Viçosa.

Os demais ingredientes foram adquiridos no comércio local.

■ Elaboração da farinha de soja

Para a elaboração das farinhas, os grãos de soja foram selecionados e submetidos ao processo de limpeza, por meio de lavagem rápida com água e secos à temperatura ambiente. A seguir foram submetidos à temperatura de 150°C por 30 minutos em estufa com circulação de ar (Marca Marconi), resfriados e armazenados em sacos plásticos, a temperatura ambiente. Posteriormente, os grãos foram triturados em liquidificador doméstico e passados em peneira de 840 µm (20 mesh).

■ Formulação dos pães

Os pães foram elaborados baseados em uma formulação convencional, previamente testada sendo a única variação a utilização de farinhas obtidas a partir de diferentes cultivares de soja em igual proporção à farinha de trigo (Tabela 1).

Tabela 1. Composição das formulações de pão convencional e de pães elaborados com farinhas mistas de trigo e soja

Ingredientes	Quantidades	
	Pão Convencional	Pães de Soja
Farinha de Trigo (g)	500	250
Farinha de Soja (g)	-	250
Fermento biológico (g)	20	20
Água (g)	195	195
Óleo (g)	40	40
Açúcar (g)	85	85
Sal (g)	4	4
Ovos (unid)	1	1

Para a elaboração dos pães, o fermento foi diluído em água e misturado a 200 g de farinha de trigo. A mistura foi colocada em forno pré-aquecido, à temperatura aproximada de 38°C, por 20 minutos, para estimular o processo de fermentação. Em seguida foram adicionados o açúcar, o óleo, os ovos e o sal, homogeneizando a massa em batedeira semi-industrial (marca Hobart), por 5 minutos. Foi acrescentado o restante da farinha de trigo e a farinha de soja, homogeneizando por mais 10 minutos. A massa foi retirada da batedeira e mantida à temperatura ambiente por 60 minutos. Posteriormente, a massa foi dividida em porções de 27 g, boleada e moldada em formato de pão, pincelada com gema de ovo, permanecendo à temperatura ambiente por 60 minutos, para fermentação. Os pães foram assados em forno convencional a 200°C por vinte minutos.

■ Composição centesimal

A determinação dos teores de umidade, proteínas, lipídios, resíduo mineral fixo e carboidratos, das formulações elaboradas, foi realizada segundo os métodos preconizados pela *Association of Official Analytical Chemists*⁸.

O conteúdo calórico foi determinado de acordo com a composição dos produtos em termos de proteínas,

lipídios e carboidratos, utilizando os fatores de conversão 4, 9 e 4 Kcal/g de alimento, respectivamente.

■ Avaliação sensorial

A avaliação da aceitabilidade das quatro formulações de pão de soja foi realizada em supermercado da cidade de Viçosa, MG. As amostras, codificadas com algarismos de três dígitos, foram apresentadas aos consumidores de forma monádica, utilizando o delineamento em blocos inteiramente casualizados. Os consumidores avaliaram a aceitação global das formulações utilizando escala hedônica estruturada de 9 pontos (Figura 1). Os resultados obtidos no teste de aceitação foram avaliados por meio da técnica de Mapa de Preferência Interno. Participaram do estudo 101 consumidores, sendo 73 do sexo feminino e 28 do sexo masculino, na faixa etária de 14 a 71 anos.

Teste de Aceitação em Escala Hedônica
Nº ____ Sexo: () Feminino () Masculino Idade: ____
Código da Amostra :
Por favor, prove a amostra e marque com um (X) sua opinião de acordo com a escala abaixo.
() Gostei extremamente
() Gostei muito
() Gostei moderadamente
() Gostei ligeiramente
() Indiferente
() Desgostei ligeiramente
() Desgostei moderadamente
() Desgostei muito
() Desgostei extremamente
Comentários: _____

Figura 1. Modelo de ficha de resposta para teste de aceitação

As análises estatísticas foram realizadas utilizando os procedimentos do programa estatístico SAS Institute⁹, versão 8.0 licenciado para Universidade Federal de Viçosa.

Para obtenção do Mapa de Preferência Interno ou Análise de Preferência Multidimensional (MDPREF), os dados de aceitação foram organizados numa matriz de amostras (em linhas) e consumidores (em colunas), e esta submetida à Análise de Componentes Principais¹⁰. Os resultados foram expressos em um gráfico de dispersão das amostras em relação aos dois primeiros componentes principais e em outro representando os “loadings” (cargas) da ACP (correlações dos dados de cada consumidor com os dois primeiros componentes principais)¹¹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A adição de 50% de farinha de soja em substituição a farinha de trigo nas formulações dos pães duplicou os teores de proteína e lipídios em comparação ao pão convencional (Tabela 2). O aumento do teor de lipídios dos pães, provavelmente favoreceu o perfil de ácidos graxos essenciais, especialmente o ácido linolênico, por ser a soja uma importante fonte deste ácido graxo poli-insaturado¹². Outros autores também observaram aumento nos teores de proteínas e lipídios em pães, utilizando farinhas mistas, mas com a adição de no máximo 12% de farinha de soja^{13,14}. Neste estudo utilizou-se uma maior concentração de farinha de soja nas formulações com o intuito de agregar maior teor de nutrientes.

As formulações apresentaram redução em torno de 40% no teor de carboidratos, em relação ao pão

convencional. Esse resultado era esperado, pelo fato da soja não ser fonte de amido. Resultados semelhantes foram observados por Wang et al.¹⁵ em estudo comparativo de farinha de soja e trigo.

Com relação ao valor calórico total, os pães de soja apresentaram um aumento em torno de 7% em relação ao pão convencional. Esse pequeno acréscimo calórico ocorreu, provavelmente, pelo aumento do teor de lipídios poli-insaturados das formulações.

As formulações de pães elaboradas com farinhas de soja de diferentes cultivares tornam-se uma alternativa viável para aumentar o consumo de proteínas e lipídios em pães, por ser um alimento altamente consumido pela população brasileira. A combinação da soja com o trigo também favoreceu a complementação dos seus aminoácidos essenciais limitantes, melhorando o perfil aminoacídico e conseqüentemente a qualidade protéica do pão^{16,12}. Tal fato poderá favorecer especialmente indivíduos que não fazem uso de produtos de origem animal.

A avaliação sensorial foi importante para definir os melhores cultivares de soja, uma vez que a composição centesimal foi próxima entre as diferentes formulações testadas. A análise de componentes principais, gerados a partir dos dados obtidos no teste de aceitação das quatro formulações de pães de soja (Figura 2 e 3), explicou 70% da variação total entre as amostras, sendo que o primeiro componente principal (PC) explicou 40% e o segundo 30%.

Tabela 2. Médias das determinações químicas de pães doces, convencional e elaborados com farinhas de trigo e soja (g /100 g).

Formulações	Umidade	Proteína	Lipídio	Carboidratos	Resíduo Mineral Fixo	Calorias
F1*	26,3	19,8	14,5	37,1	2,3	358,1
F2*	25,0	22,8	13,2	36,7	2,2	356,8
F3BRS-213*	25,2	21,7	16,2	34,6	2,3	371,0
F4*	25,2	21,0	16,5	34,9	2,4	372,1
Convencional	22,4	10,8	7,23	57,74	1,98	339,2

*Formulações contendo farinha de soja integral, na concentração de 50%. F1- UFVTN-105; F2 - EMBRAPA 48; F3 - BRS-213; F4 - BRS-155.

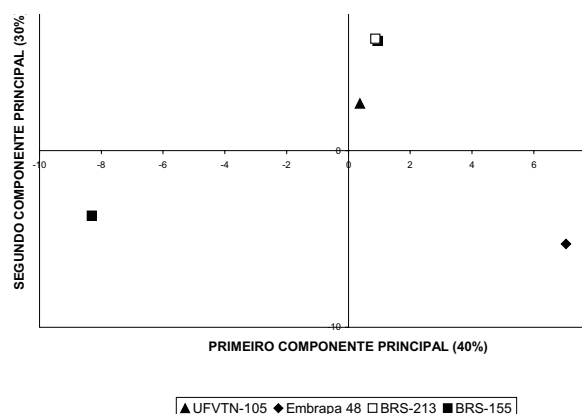


Figura 2. Dispersão das amostras de pães de soja em relação à aceitação pelos consumidores. Viçosa, UFV, 2001.

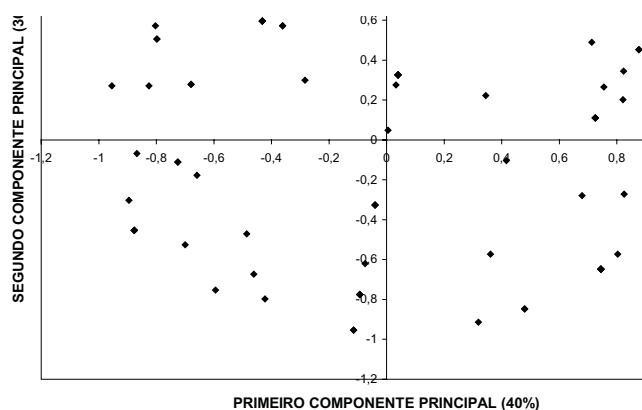


Figura 3. "Loadings" (Cargas) – Correlações entre os dados de aceitação de cada consumidor e os dois primeiros componentes principais. Viçosa, UFV, 2001.

Na Figura 2, cada ponto representa as correlações entre os dados de aceitação de um consumidor e os dois primeiros componentes principais. Os consumidores estão localizados próximo à região das amostras mais aceitas por eles. Os consumidores mais próximos do centro do gráfico não estão correlacionados com nenhum dos dois componentes principais e contribuem pouco para a discriminação das amostras, ou seja, são consumidores que consideram as amostras como semelhantes, com relação à aceitação. Por outro lado, consumidores correlacionados com pelo menos um dos componentes, consideram diferenças na aceitação das amostras.

A separação espacial das formulações sugere a existência de três grupos de acordo com a aceitação

das mesmas, sendo um grupo formado pelas amostras UFVTN-105 e BRS – 213, e os outros dois pelas amostras Embrapa 48 e BRS - 155 (Figura 2). As formulações elaboradas com farinha de soja obtidas a partir de cultivares com ausência de lipoxigenases (UFVTN-105 e BRS – 213) foram as mais aceitas, enquanto que a formulação elaborada com o cultivar de soja convencional (Embrapa 48) apresentou-se como a menos aceita pelos consumidores.

CONCLUSÃO

A incorporação da farinha de soja integral na mesma concentração da farinha de trigo nas formulações aumentou o valor nutricional dos pães, especialmente quanto aos teores de proteína e de lipídio. A aceitação das formulações sugere que a utilização das farinhas de soja de cultivares sem lipoxigenases conferiu melhor sabor aos pães, por não apresentarem o sabor característico da soja. Este estudo comprovou que a utilização de farinhas mistas na mesma proporção de soja e trigo agrega valores nutricionais e sensoriais em produtos à base de soja, sendo uma alternativa viável para outros produtos de panificação.

A soja é uma leguminosa com propriedades importantes quanto ao teor de nutrientes e compostos bioativos. Assim, torna-se importante o desenvolvimento de novas pesquisas para avaliar o perfil lipídico, aminoacídico e do teor de compostos bioativos, como as isoflavonas, nas formulações elaboradas com farinhas de soja de cultivares sem lipoxigenases.

REFERÊNCIA

1. Hasler CM. Functional Foods: Their Role in Disease Prevention and Health Promotion. *Food Technol.* 1998; 52 (11): 63-70.
2. Penha LAO, Fonseca, ICB, Mandarino JM, Benassi VT. A soja como alimento: valor nutricional, benefícios para a saúde e cultivo orgânico. *B.CEPPA.* 2007; 25 (1): 91-102.
3. Carrão-Panizzi MC. Melhoramento genético da soja para a obtenção de cultivares mais adequados ao consumo humano. *Rev Bras Nutr Clin.* 2000;1:330 – 40.
4. Battochio Jr, Cardoso JMP, Kikuchi M., Macchione M, Modolo JS, Paixão AL, et al. Perfil sensorial de pão de forma integral. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 2006; 26 (2): 428-33.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária [ANVISA]. Resolução nº 90, de 18 de outubro de 2000 da. Dispõe sobre o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de pão. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/90_00.htm>.
6. Borges JTS, Pirozi RM, Della Lucia SM, Pereira PC, Moraes ARE, Castro VC. Utilização de farinha mista de aveia e trigo na elaboração de bolos. *B.CEPPA.* 2006; 24 (1):145-62.

7. Reis RC, Regazzi AJ, Carneiro JCS, Minim VPR. Mapa de preferência. In. MINIM VPR, editor. *Análise sensorial: Estudo com consumidores 1ª ed.* Viçosa:Ed UFV, 2006.p. 13-50.
8. Association of Official Analytical Chemists - AOAC. *Official methods of analysis of AOAC International.* 1997.16 ed., v. 2, Maryland.
9. SAS - Statistical Analysis System. Versión 8.0. Cary, North Carolina: The SAS Institute, 1999.
10. Carneiro JCS. *Processamento Industrial de Feijão, Avaliação Sensorial Descritiva e Mapa de Preferência (dissertação de mestrado).* Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 2001. 90 pp.
11. Dantas MIS, Minim VPR, Carneiro JCS, Barbosa RL. Mapa de preferência de couve minimamente processada. *Hortic bras.* 2004; 22 (1):101-03.
12. Amaral VMG. *A importância da soja como alimento funcional para qualidade de vida e saúde. (dissertação de mestrado).* Campinas, UNICAMP, 2006. 71pp.
13. El-Dash A, Mazzari MR, Germani R. *Tecnologia de farinhas mistas: uso de farinha mista de trigo e mandioca na produção de pães.* 1994, Brasília, DF:EMBRAPA SPI, v.1, 88p.
14. Dhingra S, Jood S. Organoleptic and nutritional evaluation of wheat breads supplemented with soybean and barley flour. *Food Chem.* 2001; 77:479-88.
15. Wang SH, Oliveira MF, Costa PS, Ascheri JL, Rosa AG. Farinhas de trigo e soja pré-cozidas por extrusão para massas de pizza, *Pesq agropec bras.* 2005; 40 (4): 389-95.
16. Pereira CAS, Oliveira FB. *Soja, alimento e saúde: valor nutricional e preparo.* Viçosa, MG: UFV: 2004.

Efeito *in vitro* de concentrações de metabisulfito de sódio, benzoato de sódio e sorbato de potássio sobre fungos termorresistentes

In vitro effect of concentrations of sodium metabisulphite, sodium benzoate and potassium sorbate on heat-resistant fungi

RIALA6/1211

Ana Maria Queijeiro LÓPEZ*, Sheyla Ferreira LIMA-COELHO, Luis Fernando Romanholo FERREIRA

*Endereço para correspondência: Universidade Federal de Alagoas – UFAL, Campus A.C. Simões s/n. Tabuleiro dos Martins, Maceió, AL, Brasil, CEP: 57072-970. e-mail: amql@qui.ufal.br.

¹Laboratório de Bioquímica do Parasitismo e Microbiologia Ambiental, Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL, Brasil.

Recebido: 29.01.2009 – Aceito para publicação: 11.08.2009

RESUMO

Os fungos termorresistentes dos gêneros *Byssochlamys*, *Neosartorya* e *Talaromyces* representam grave problema para a indústria processadora de alimentos, especialmente de frutas e hortaliças, em virtude da ocorrência de ascósporos extremamente resistentes e/ou de micotoxinas termoestáveis. Com o propósito de fornecer subsídios quanto ao uso de quantidades mais racionais de conservantes pela indústria de alimentos e, portanto, tornar seu consumo menos danoso à população, o presente estudo determinou *in vitro* a concentração mínima de metabisulfito de sódio, benzoato de sódio e sorbato de potássio necessária e suficiente para inibir o crescimento micelial e a germinação de ascósporos de *B. fulva*, *N. fischeri* e *T. flavus* em meio de cultivo acidificado (pH 3,5). Foi demonstrado que metabisulfito de sódio em baixas concentrações é tão eficiente na inibição dos fungos mencionados quanto aos demais conservantes em altas concentrações. Por comparação com os procedimentos utilizados pelas indústrias de alimentos, é possível inferir que estas podem reformular o uso de conservantes, considerando-se o tipo de matéria-prima, a temperatura de processamento, a combinação e concentração efetivamente necessária de aditivos, bem como os efeitos tóxicos desses compostos para a saúde humana.

Palavras-chave. *Byssochlamys*, *Neosartorya*, *Talaromyces*, metabisulfito de sódio, benzoato de sódio, sorbato de potássio, fungos termorresistentes.

ABSTRACT

Heat-resistant fungi of *Byssochlamys*, *Neosartorya* and *Talaromyces* genera represent a serious issue to the food processing industry, especially of fruits and vegetables, due to the occurrence of extremely resistant ascospores and/or heat-stable mycotoxins. In order to provide subsidies to the food industry in using the most rational amounts of preservatives, and to assure the safe consumption of them by the population, this *in vitro* investigation was conducted to determine the minimum concentrations of sodium metabisulphite, sodium benzoate and potassium sorbate needed to inhibit the mycelial growth of *B. fulva*, *N. fischeri* and *T. flavus*, in acidified (pH 3,5) medium. This study showed that sodium metabisulphite in low concentrations was as much effective in inhibiting the above mentioned fungi as other preservatives in high concentrations. Comparing with the procedures used by the industries, it may be presumed that food manufacturers could reformulate the use of preservatives, taking into account the type of raw material, the processing temperature, the use of combining additives and in the minimum concentrations actually effective, being aware of the toxic effects of these preservatives to the human health.

Key words. preservatives, *Byssochlamys*, *Neosartorya*, *Talaromyces*, sodium benzoate, potassium sorbate, sodium metabisulphite, heat-resistant fungi.

INTRODUÇÃO

A maioria das deteriorações fúngicas em alimentos, especialmente de frutos/ pseudo-frutos colhidos diretamente do solo ou próximos dele, e seus derivados processados (sucos, polpas, concentrados e frutos enlatados)¹⁻¹³, deve-se a poucas espécies que produzem esclerócios ou ascósporos resistentes à pasteurização, como aquelas pertencentes aos gêneros *Byssochlamys*, *Neosartorya* e *Talaromyces*¹. Além da alta resistência térmica, tais fungos também sintetizam metabólitos secundários tóxicos de baixo peso molecular e termoestáveis, que se acumulam na matéria-prima beneficiada. Isso resulta em impacto econômico negativo em todos os níveis de produção, comercialização e consumo¹⁴⁻¹⁷.

Para tentar reduzir os riscos desses fatos, além do tratamento térmico, as indústrias lançam mão do uso dos aditivos químicos, ainda que essa prática não agrade os consumidores por conduzir danos à saúde humana, especialmente em concentrações excessivas. Os mais utilizados são os sulfitos, benzoatos e sorbatos¹⁸⁻²¹, e sua eficácia depende da sua concentração, temperatura de processamento e armazenamento, do tipo e quantidade de micro-organismo a ser combatido e da natureza do alimento^{1,18,22}.

A ação conservadora do ácido benzoico (C₆H₅COOH) e do benzoato de sódio (BS), deve-se à ingestão de moléculas não-dissociadas que afetam todos os processos em que a glicina esteja envolvida. Em combinação com o ácido ascórbico, BS pode formar benzeno, um carcinógeno, e individualmente causa danos ao ácido desoxirribonucleico mitocondrial (DNAMt)²³, o que conduz à apoptose celular (comum nas doenças neurodegenerativas). Exposição dérmica, ingestão ou inalação do ácido benzoico ou BS têm causado urticária, asma, rinites ou choques anafiláticos^{24,25}. Em 2007, a agência britânica de padronização dos alimentos comprovou que hiperatividade e declínio da inteligência (QI rebaixado em 5,5 pontos) em crianças britânicas devia-se ao alto consumo da combinação BS-corantes artificiais²⁶, especialmente em refrigerantes, proibindo seu uso.

Por sua vez, o dióxido de enxofre nas formas líquida, gasosa e anidrida (SO₂, SO₃, HSO₃ e S₂O₅) e seus derivados (sais de sódio, potássio ou cálcio) – antibacterianos, fungistáticos, antioxidantes e quelantes, liberam sulfitos que reagem com ligações dissulfeto e tiosulfonatos. Assim, inativam enzimas, o grupo heme de várias delas e suas coenzimas, e convertem citosina em uracila,

5-metilcitosina em timina, além de decompor tiamina. A atividade de suas formas combinadas depende de sua estabilidade frente a processos digestivos^{24,25}. Nos alimentos e limites legalmente definidos^{19,20,25,26} não afetam a maioria das pessoas, porém, asmáticos²⁷⁻³² e pacientes em nutrição parenteral³³ podem ser afetados, com reações ocorrendo de 10 a 20 min após sua ingestão (broncoconstrição, broncoespasmo, anafilaxia, hipotensão, náuseas, urticária, angioedema, rubor, diarreia e parestesias). Por isso, a *Food and Drug Administration* (FDA) e a Agência de Vigilância Sanitária (Anvisa) proibiram seu uso para manutenção de cor e consistência de frutas, vegetais crus e alimentos ricos em vitamina B1, visto que podem fornecer um falso aspecto de frescor³⁴. No Reino Unido e Canadá, são permitidos respectivamente em carnes embutidas (até o limite de 450 mg.Kg⁻¹) e aves domésticas²⁹.

Já os sorbatos, devido à sua baixa toxicidade, são recomendados e utilizados mundialmente³⁵. Nas vinícolas, são usados como inibidor da fermentação secundária, reduzindo os níveis de sulfitos ao inibirem sulfidrilases, desidrogenases e fumarases²².

Diante do exposto, ensaios rápidos para determinação da concentração inibitória mínima de conservantes sobre fungos termorresistentes, contribuem para a elaboração de protocolos de sua utilização em alimentos específicos, visando reduzir sua ingestão inadequada. O propósito do presente trabalho foi determinar a concentração mínima de metabisulfito de sódio (MBS), BS e SP capaz de inibir *in vitro* o crescimento micelial e a germinação de esporos de *B. fulva*, *N. fischeri* e *T. flavus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Bioquímica do Parasitismo e Microbiologia Ambiental, Instituto de Química e Biotecnologia da UFAL.

As amostras de *Byssochlamys fulva* (CCT 0056), *Neosartorya fischeri* (CCT 3491) e *Talaromyces flavus* (CCT 4683) foram fornecidas pela Coleção de Culturas Tropicais - Fundação André Tosello, em tubos contendo meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) e as culturas foram repicadas para o mesmo tipo de meio, preparado conforme descrito por Silva et al.³⁶, sendo este acidificado com ácido cítrico (pH 3,5) após sua autoclavagem (120 °C, 1 atm, 20 min), e posterior depósito em placas de Petri esterilizadas. O material foi incubado por 24 h (30 ± 2 °C, escuro).

■ Efeito de conservantes sobre o crescimento micelial

O meio BDA, distribuído em diferentes frascos, foi acrescido de distintas quantias de conservantes, gerando várias concentrações dos mesmos (0, 80, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 550, 600, 700, 800, 900 e 1000 mg.L⁻¹). A seleção de tais concentrações baseou-se em citações da literatura específica, e limites máximos abrangidos pela legislação^{19, 20, 25, 26, 37} visando aplicação em diferentes alimentos processados. Em seguida, os frascos foram autoclavados e os meios acidificados conforme acima descrito, sendo posteriormente vertidos em placas de Petri esterilizadas. Após sua solidificação, depositou-se centralmente sobre eles discos de micélio (~ 5mm θ) de colônias de *B. fulva*, *N. fischeri* e *T. flavus* (10 dias a 28 \pm 2°C, no escuro, em meio BDA acidificado). As culturas foram incubadas a 28 \pm 2°C, no escuro. O crescimento micelial foi mensurado após 2, 7, 15, 22 e 30 dias de incubação, com o auxílio de um paquímetro (mm).

Os experimentos seguiram delineamentos totalmente casualizados, com três réplicas por tratamento (micro-organismo X concentração de conservante), totalizando 144 placas para cada ensaio de cada conservante, sendo estes testes repetidos em três ocasiões. Após análise de variância, as médias foram comparadas entre si conforme teste de Tuckey ao nível de 5%.

■ Efeito de conservantes sobre a germinação de esporos

De tubos contendo um volume total de 30 mL de meio BDA acidificado (pH 3,5) estéril com diferentes concentrações de metabisulfito (MBS = 0, 100, e 200 mg.L⁻¹) e BS (0, 350 e 600 mg.L⁻¹), foram colhidas alíquotas de cerca de 0,5 mL e depositadas homogeneamente sobre a superfície de lâminas de microscopia previamente deslipidizadas, cuidando-se para que o filme não atingisse as extremidades. Para testar a germinação de esporos dos fungos *B. fulva*, *N. fischeri* e *T. flavus* em trélicas de lâminas de cada uma das 3 concentrações de cada conservante, em 5 diferentes intervalos de tempo, utilizaram-se 135 lâminas por aditivo testado, sendo esse ensaio repetido em três ocasiões.

Assim, suspensões de esporos dos fungos testados foram obtidas através da lavagem, sob condições assépticas, de culturas em meio BDA acidificado (30 dias de incubação a 28 \pm 2°C, no

escuro) com uma solução aquosa (Tween 20 0,1%) estéril. Estas foram filtradas em dupla camada de gaze também esterilizada, e as contagens dos esporos foram efetuadas com o auxílio de Câmara de Neubauer, sob microscópio óptico, após colher-se alíquotas (100 μ L) das suspensões e adicionar-se a elas igual volume de solução de lactofenol de algodão azul (20g de ácido fênico, 20 mL de ácido láctico, 20 mL de glicerina, 20 mL de água destilada e 0,1 g de azul-anilina). Por meio desse teste, foram considerados viáveis apenas os esporos que se coram em azul³⁸. Após constatar-se a viabilidade de 98-100%, a concentração da suspensão aquosa de cada fungo foi ajustada para 10⁶ esporos viáveis.mL⁻¹. Esta, então, foi submetida por 5 min a uma temperatura de 80 \pm 2°C (Banho Maria), tratamento este selecionado com base em vários estudos³⁹⁻⁴⁸ sob o rompimento da dormência de ascósporos dessas espécies por choque térmico.

Tais pesquisas concluíram que a taxa de ativação de ascósporos de *B. nivea* e *N. fischeri* a uma determinada temperatura é influenciada pela concentração de sólidos solúveis no meio de aquecimento, sendo menor o intervalo requerido para ativação em substratos com menos sólidos solúveis. Também foi observado que ascósporos gerados em culturas incubadas a temperaturas amenas (25°C) requerem menor tempo de ativação que aqueles gerados em cultivos incubados sob temperaturas mais altas.

Portanto, considerando-se que as suspensões de ascósporos utilizadas no presente estudo foram preparadas com solução aquosa de Tween 20 0,1% (baixa concentração de sólidos solúveis), e a partir de culturas incubadas por 30 dias a cerca de 28 °C, optou-se por padronizar o intervalo de ativação para as três espécies estudadas em 5 min a 80°C.

Alíquotas de 50 μ L das suspensões de ascósporos ajustadas foram depositadas no centro das lâminas previamente preparadas com filmes de conservantes. Essas lâminas foram incubadas (28°C \pm 2°C, escuro) sobre suportes triangulares dentro de placas de Petri (revestidas ao fundo com papel de filtro embebido em água destilada estéril) e, a intervalos de 0, 6, 12, 24 e 48 h após a inoculação, foram coradas com solução de algodão azul-lactofenol. Em seguida, sob microscópio óptico, efetuou-se a contagem de 100 esporos viáveis por lâmina, avaliando-se o percentual de germinação dos mesmos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

■ Efeito de conservantes sobre o crescimento micelial

Nos meios em que as concentrações dos conservantes não foram eficientes, as colônias atingiram o diâmetro total das placas de Petri (90 mm) aos 15 dias de incubação ($28 \pm 2^\circ\text{C}$, no escuro). Por outro lado, a partir de algumas concentrações dos conservantes, o crescimento fúngico foi totalmente paralisado. As Tabelas 1 e 2, portanto, expõem dados do crescimento micelial de *B. fulva*, *T. flavus* e *N. fischeri* apenas diante das concentrações que começaram a inibi-lo e daquelas que primeiro foram totalmente inibitórias. Conforme a análise estatística, observa-se que até o 7º dia de incubação *B. fulva* já teve seu crescimento retardado por concentrações de 150 mg MBS.L⁻¹, 500 mg BS.L⁻¹ e 400 mg SP.L⁻¹. Já o fungo *T. flavus*, sob o efeito de 100 mg MBS.L⁻¹, 250 mg BS.L⁻¹ e 800 mg SP.L⁻¹, cresceu mais lentamente até o 15º dia de incubação. No mesmo intervalo, o desenvolvimento micelial de *N. fischeri* já foi atrasado na presença de 80 mg MBS.L⁻¹, 500 mg BS.L⁻¹ e 700 mg SP.L⁻¹. Contudo, o micélio dos fungos testados só foi totalmente inibido por concentrações maiores de MBS, BS e SP.

Quando comparados a *N. fischeri* (Tabela 2), *B. fulva* e *T. flavus* (Tabela 1) apresentaram maior resistência vegetativa frente ao aditivo MBS, visto que o crescimento micelial do primeiro foi totalmente inibido a 100 mg.L⁻¹, enquanto para atingir-se o mesmo efeito com os demais foi necessário o uso de 200 mg.L⁻¹ de tal conservante. Nielsen⁴⁸, utilizando impedância microbiológica, já demonstrara que três variedades de *N. fischeri* são completamente inibidas por 300 mg.L⁻¹ de dióxido de enxofre em suco de frutas, especialmente quando as temperaturas de incubação e pH são mais baixas (18°C e pH 3,5). *In vitro*, demonstrou-se que o crescimento de *N. fischeri* em meio CYA (Czapeck - autolisado de levedura – Agar, pH 3,5)⁴⁹, é retardado por SP e BS a 75 mg.L⁻¹, mas totalmente inibido por 200 mg.L⁻¹ de SO₂. Estudos de Beuchat⁵⁰ também já haviam demonstrado que 50 mg.mL⁻¹ de SO₂ em meio BDA são suficientes para inibir completamente o desenvolvimento de colônias de *B. nivea*, enquanto esse crescimento e a produção de patulina após 25 dias de incubação em suco de maçã⁵¹, a 21, 30 e 37 °C, foram significativamente retardados/inibidos por 75 mg.L⁻¹ de SO₂, 150 mg.L⁻¹ de SP e 500 mg.L⁻¹ de BS.

Por outro lado, no presente estudo, BS e SP só foram capazes de inibir totalmente o crescimento *in vitro* de *B. fulva* e *N. fischeri* (Tabelas 1 e 2) respectivamente a

600 mg.L⁻¹ e 800 mg.L⁻¹, enquanto o crescimento de *T. flavus* (Tabela 1) foi inibido totalmente nas condições estudadas por 350 mg.L⁻¹ de BS e concentrações de SP superiores a 900 mg.L⁻¹.

Portanto, no caso de MBS, a concentração inibitória à cepa de *N. fischeri* utilizada no presente trabalho parece relativamente menor do que aquela mencionada por alguns autores. Por outro lado, as concentrações de BS e SP necessárias à inibição dos três fungos aqui estudados foram superiores às citadas em várias pesquisas. Isso reforça a teoria de que a interação do substrato (meio) com outras variáveis, como temperatura de ativação e incubação, variedade e espécie de fungo termorresistente, e concentração do aditivo, devem ser consideradas para o controle da deterioração de alimentos em maior grau.

■ Efeito de conservantes sobre a germinação de esporos

Exceto pela presença dos conservantes, o fato dos testes terem sido conduzidos sobre filme de meio de cultura com atividade de água mínima necessária⁴³ (e em câmara úmida), a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ (ao abrigo da luz) por 30 dias, por si só garantiria a capacidade máxima de germinação dos ascósporos estudados após o choque térmico (80°C a 5min).

Ainda que a maior concentração de MBS (200 mg.L⁻¹) testada não tenha reduzido a germinação dos três fungos na mesma proporção que o BS a 600 mg.L⁻¹ (Tabela 3), esta foi bastante eficiente, declinando tal parâmetro em cerca de 81,8-94,2 % quando medido 48 h após a inoculação das suspensões de esporos de culturas com 30 dias de idade sobre os filmes de meio nas lâminas.

As concentrações de MBS e de BS capazes de inibir acentuadamente a germinação dos ascósporos de *B. fulva*, *N. fischeri* e *T. flavus* foram as mesmas que bloquearam totalmente seu crescimento micelial *in vitro* (Tabelas 1 e 2), indicando que provavelmente os poucos tubos germinativos formados tiveram seu vigor suficientemente interrompido para não permitir o desenvolvimento de colônias.

Segundo Beuchat⁵⁰, 300 mg.L⁻¹ de SO₂ e 400 mg.L⁻¹ de SP, inibiram totalmente a germinação de ascósporos de *B. nivea* em suco de uva armazenado por 60 dias. Tal autor também demonstrou que a concentração de 100 mg.L⁻¹ de SP, durante a ativação térmica nesse suco, apresentou inclusive um efeito estimulador da quebra de dormência

Tabela 1. Crescimento médio de *Byssoschlamys fulva* e *Talaromyces flavus* em meio BDA (pH 3,5) contendo diferentes concentrações de metabisulfito de sódio (MBS= 100, 150 e 200 mg.L-1), benzoato de sódio (BS= 250, 300, 350, 500, 550 e 600 mg.L-1) e sorbato de potássio (SP= 400, 700, 800, 900 e 1000 mg.L-1), durante 30 dias de incubação (28 ± 2°C, escuro). Inoculo inicial = disco de micélio de cultura com $\theta \sim 5$ mm.

Diâmetro das Colônias de <i>Byssoschlamys fulva</i> (mm) sobre diferentes Concentrações de Conservantes ± Desvio Padrão												
Dias	Controle (0 mg.L-1)	MBS 100 mg.L-1	MBS 150 mg.L-1	MBS 200 mg.L-1	MBS 250 mg.L-1	MBS 300 mg.L-1	MBS 350 mg.L-1	MBS 500 mg.L-1	MBS 550 mg.L-1	BS 600 mg.L-1	BS 700 mg.L-1	SP 800 mg.L-1
0	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0a	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0a	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0 a
2	10,8 ± 1,0 a	6,0 ± 0 c	5,0 ± 0 c	5,0 ± 0 c	12,5 ± 0,6 a	6,0 ± 0c	5,0 ± 0 c	10,7 ± 1,1 a	8,0 ± 1,0 b	5,0 ± 0 c	5,0 ± 0 c	5,0 ± 0 c
7	71,2 ± 3,1 a	59,9 ± 8,6 b	11,6 ± 2,2 f	5,0 ± 0 g	50,8 ± 2,5 c	15,3 ± 0,5 f	5,0 ± 0 g	39,3 ± 1,2 d	24,3 ± 2,9 e	5,0 ± 0 g	5,0 ± 0 g	5,0 ± 0 g
15	90,0 ± 0 a	90,0 ± 0 a	90,0 ± 0 a	90,0 ± 0 d	90,0 ± 0 a	24,5 ± 3,0 c	5,0 ± 0 d	90,0 ± 0 a	50,5 ± 6,7 b	5,0 ± 0 d	5,0 ± 0 d	5,0 ± 0 d
22	90,0 ± 0 a	90,0 ± 0 a	90,0 ± 0 a	90,0 ± 0 c	90,0 ± 0 a	31,3 ± 1,5 b	5,0 ± 0 c	90,0 ± 0 a	90,0 ± 0 a	5,0 ± 0 c	90,0 ± 0 a	5,0 ± 0 c
30	90,0 ± 0 a	90,0 ± 0 a	90,0 ± 0 a	90,0 ± 0 c	90,0 ± 0 a	39,1 ± 5,8 b	5,0 ± 0 c	90,0 ± 0 a	90,0 ± 0 a	5,0 ± 0 c	90,0 ± 0 a	5,0 ± 0 c

Diâmetro das Colônias de <i>Talaromyces flavus</i> (mm) sobre diferentes Concentrações de Conservantes ± Desvio Padrão												
Dias	Controle (0 mg.L-1)	MBS 100 mg.L-1	MBS 150 mg.L-1	MBS 200 mg.L-1	MBS 250 mg.L-1	MBS 300 mg.L-1	MBS 350 mg.L-1	MBS 500 mg.L-1	MBS 550 mg.L-1	BS 600 mg.L-1	BS 700 mg.L-1	SP 800 mg.L-1
0	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0 a
2	12,5 ± 0,3 a	9,0 ± 3,2 a	5,0 ± 0 c	5,0 ± 0 c	5,0 ± 0 c	5,0 ± 0 c	5,0 ± 0 c	9,7 ± 0,9 ab	5,0 ± 0 c	5,0 ± 0 c	5,0 ± 0 c	5,0 ± 0 c
7	52,8 ± 9,1 a	34,3 ± 18,7 b	12,8 ± 0,6 c	5,0 ± 0 e	15,3 ± 0,5 d	6,0 ± 0 e	5,0 ± 0 e	30,8 ± 2,6 b	6,0 ± 0 e	5,0 ± 0 e	5,0 ± 0 e	5,0 ± 0 e
15	80,5 ± 3,3 a	60,6 ± 8,1 b	33,0 ± 1,7 d	5,0 ± 0 f	32,5 ± 3,3 d	12,8 ± 0,6 e	5,0 ± 0 f	43,9 ± 1,8 c	31,3 ± 1,5 d	5,0 ± 0 f	5,0 ± 0 f	5,0 ± 0 f
22	90,0 ± 0 a	90,0 ± 0 a	47,8 ± 4,1 c	5,0 ± 0 f	58,0 ± 10,0 bc	15,3 ± 1,1 e	5,0 ± 0 f	66,8 ± 4,7 b	31,5 ± 0,7 d	5,0 ± 0 f	5,0 ± 0 f	5,0 ± 0 f
30	90,0 ± 0 a	90,0 ± 0 a	63,9 ± 11,6 b	5,0 ± 0 e	90,0 ± 0 a	18,0 ± 2,0 d	5,0 ± 0 e	90,0 ± 0 a	49,0 ± 2,3 c	5,0 ± 0 e	5,0 ± 0 e	5,0 ± 0 e

Obs: Médias seguidas pela mesma letra em linhas iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de Tuckey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 2. Crescimento médio de *Neosartorya fischeri* em meio BDA (pH 3,5) contendo diferentes concentrações de metabisulfito de sódio (MBS= 80 e 100 mg.L⁻¹), benzoato de sódio (BS= 500, 550 e 600 mg.L⁻¹) e sorbato de potássio (SP= 700 e 800 mg.L⁻¹), durante 30 dias de incubação (28 ± 2°C, escuro). Inóculo inicial = disco de micélio de cultura com 0~ 5mm.

Diâmetro das Colônias de <i>Neosartorya fischeri</i> (mm) sobre diferentes Concentrações de Conservantes ± Desvio Padrão							
Dias	Controle (0 mg.L ⁻¹)	MBS 80 mg.L ⁻¹	MBS 100 mg.L ⁻¹	BS 500 mg.L ⁻¹	BS 550 mg.L ⁻¹	BS 600 mg.L ⁻¹	SP 700 mg.L ⁻¹ SP 800 mg.L ⁻¹
0	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0 a	5,0 ± 0 a
2	13,8 ± 0,4 a	6,0 ± 0 b	5,0 ± 0 b	6,5 ± 0,3 b	5,0 ± 0 b	5,0 ± 0 b	7,2 ± 0,2 b 5,0 ± 0 b
7	67,2 ± 4,6 a	50,8 ± 2,5 b	5,0 ± 0 d	12,8 ± 0,6 c	6,0 ± 0 d	5,0 ± 0 d	13,5 ± 0,7 c 5,0 ± 0 d
15	78,0 ± 5,8 a	63,9 ± 11,6 b	5,0 ± 0 e	33,0 ± 1,7 c	12,5 ± 1,0 d	5,0 ± 0 e	36,2 ± 2,9 c 5,0 ± 0 d
22	90,0 ± 0 a	90,0 ± 0 a	5,0 ± 0 d	65,2 ± 6,6 b	24,3 ± 2,9 c	5,0 ± 0 d	90,0 ± 0 a 5,0 ± 0 d
30	90,0 ± 0 a	90,0 ± 0 a	5,0 ± 0 d	77,5 ± 6,3 b	31,3 ± 1,5 c	5,0 ± 0 d	90,0 ± 0 a 5,0 ± 0 d

Obs: Médias seguidas pela mesma letra em linhas iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de Tuckey ao nível de 5% de probabilidade.

de ascósporos de *B. nivea*, e BS, mesmo em concentração tão alta quanto 1000 mg.mL⁻¹, não foi capaz de impedir a germinação dos mesmos. Outro estudo de Beuchat⁵² demonstrou o efeito de BS e SP (500 e 1000 mg.L⁻¹) na inativação de conídios de *A. flavus* e ascósporos de *B. nivea*, gerados a partir de culturas respectivamente com 20 dias (a 25°C e 80% de umidade relativa) e 35 dias (30°C e 60% de umidade relativa), sendo quantificado o número de colônias oriundas dos mesmos em meio contendo diferentes concentrações de sacarose (0-60%) e conservantes, e submetidas respectivamente a 52 e 80°C por até 80 min (antes da solidificação). Constatou-se que o aumento da sacarose, com redução da atividade de água, aumentou a tolerância ao calor, embora a presença de SP e BS, especialmente a 1000 mg.L⁻¹, tenha reduzido acentuadamente o tempo requerido para inativar a população em 90%. Não houve diferença estatística para o efeito dos dois conservantes sob iguais concentrações, mas na ausência de tratamento térmico, nem mesmo a maior concentração dos mesmos reduziu a formação de colônias por *A. flavus*, sugerindo o efeito sinérgico entre tratamento térmico e aditivos químicos.

Rajashekhara et al.⁵³, por outro lado, descreveram o uso de 1000 mg.L⁻¹ de BS e SP ou uma combinação de ambos (500 mg.L⁻¹ cada um) para reduzir o tempo necessário da inativação térmica de ascósporos de *N. fischeri* em sucos de manga e uva, visto que sem o uso dos mesmos o tratamento (85°C por 120 min) é longo o suficiente para alterar as características organolépticas e composição das polpas. Em suco de manga, a taxa de morte térmica foi respectivamente reduzida para 44, 35 e 29 min sob tais tratamentos, enquanto para suco de uva esse parâmetro diminuiu respectivamente para 32, 13 e 14 min, isto é, o efeito combinado dos dois conservantes (500 mg.L⁻¹ de cada) foi considerado relevante para o processamento industrial desses sucos.

Portanto, ainda que concentrações de MBS e BS (200 e 600 mg.L⁻¹ respectivamente) menores do que aquelas citadas na literatura como inibidoras da germinação de *N. fischeri* e de outros fungos tenham sido detectadas, mais uma vez fica clara a relevância de se considerar a complexidade das propriedades físico-químicas dos alimentos a serem tratados com aquelas dos aditivos químicos e tratamentos a serem efetuados, de forma a racionalizar-se seu uso para cada caso.

Tabela 3. Percentual de germinação de esporos (média) de *Byssochlamys fulva*, *Neosartorya fischeri* e *Talaromyces flavus* em filme de BDA (pH 3,5) contendo diferentes concentrações de metabisulfito de sódio (MBS= 0, 100 e 200 mg.L⁻¹) e benzoato de sódio (BS= 0, 350 e 600 mg.L⁻¹), a partir de culturas com 30 dias de incubação (28 ± 2°C, escuro) e 48 h sob as mesmas condições.

Conservantes (mg.L ⁻¹)	% Germinação (Média) de Esporos			
	6 h	12 h	24 h	48 h
<i>Byssochlamys fulva</i>				
CONTROLE (0)	24,33 a	25,33 a	81,00 a	96,00 a
BS (350)	4,33 c	8,00 c	17,33 b	59,00 b
BS (600)	0,67 c	1,67 d	2,00 d	2,67 d
MBS (100)	13,67 b	15,00 b	77,67 a	85,33 a
MBS (200)	3,33 c	6,00 c	10,67 c	17,33 c
<i>Neosartorya fischeri</i>				
CONTROLE (0)	28,67 a	36,33 a	86,33 a	91,67 a
BS (350)	3,67 b	8,33 b	29,67 b	67,33 b
BS (600)	0,00 b	0,33 c	2,00 c	1,67 e
MBS (100)	2,00 b	4,33 c	8,67 c	27,33 c
MBS (200)	0,67 b	2,67 c	5,67 c	7,33 d
<i>Talaromyces flavus</i>				
CONTROLE (0)	34,33 a	45,33 a	88,33 a	98,00 a
BS (350)	1,33 c	2,33 c	2,67 c	5,33 b
BS (600)	0,00 c	0,00 c	0,33 c	0,67 b
MBS (100)	9,33 b	28,00 b	64,67 b	87,67 a
MBS (200)	0,33 c	1,67 c	3,33 c	5,67 b

Obs: Médias seguidas pela mesma letra em colunas iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de Tuckey ao nível de 5% de probabilidade.

CONCLUSÃO

Com relação aos fungos termorresistentes, conservantes e condições de incubação estudados neste trabalho, o metabisulfito de sódio apresentou a melhor eficácia em termos de concentração quanto ao binômio inibição de crescimento micelial (100%) até 30 dias de incubação (28 ± 2°C, escuro) e germinação de esporos (81,8-94,2 %) após 48 h de inoculação.

Foi efetivo (200 mg.L⁻¹) em teores três vezes menores do que aqueles de benzoato de sódio (600 mg.L⁻¹) capazes de atingir percentuais de inibição

de germinação com relação ao controle de cerca de 97,21-99,32%. Além disso, o benzoato de sódio é mais tóxico à saúde humana do que o metabisulfito. Analisando-se as concentrações desses conservantes utilizadas pelas indústrias de alimentos, e citadas na literatura específica, observa-se que ocorre um efeito sinérgico destas com as propriedades físico-químicas do alimento contaminado, com o tratamento térmico aplicado e com o propágulo presente, de forma que se testes, como os que foram o alvo deste trabalho, forem empregados para cada tipo de substrato, as mesmas podem ser reduzidas.

REFERÊNCIAS

1. Leitão MFF. Microbiologia das frutas tropicais e seus produtos. In: Instituto de Tecnologia de Alimentos (Campinas, SP) Ed. Frutas tropicais: aspectos tecnológicos. Campinas: ITAL; 1978. p. 83-144.
2. Schmidt FL. Deterioração de sucos de frutas em embalagens assépticas. Um “novo” microrganismo desponta: *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Bol Inf Fruthotec*. 1995; 2(4): 2.
3. Cunha VAB. Estudo experimental e modelagem do crescimento de fungos filamentosos termorresistentes em sucos tropicais [dissertação de mestrado]. Florianópolis, SC: Universidade Federal de Santa Catarina, 2003. 98 p..
4. Aragão GMF. Identificação e determinação da resistência térmica de fungos filamentosos termorresistentes isolados da polpa de morango [dissertação de mestrado]. Campinas, SC: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1989. 139p..
5. King JDA, Halbrook WU. Ascospore heat resistance and control measures for *Talaromyces flavus* isolated from fruit juice concentrate. *J Food Sci*. 1987; 52:1252-4.
6. Scott VN, Bernard DT. Heat resistance of *Talaromyces flavus* and *Neosartorya fischeri* isolates from commercial fruit juices. *J Food Protect*. 1987; 50(1):18-20.
7. Spotti E, Casolari A. Indagine sul contenuto di catalasi di muffe gasogene e altri microrganismi. *Ind Conserve*. 1987; 62: 22-4.
8. Dragoni I, Comi G. Presenza di muffe e lieviti in succhi di frutta prodotti industrialmente. *Ind Bevande*. 1985; 14:599-06.
9. Baglioni F, Gumerato HF, Massaguer PR. Occurrence of heat resistant molds in tomato pulp packed aseptically. *Ciênc Tec Alim* 1999; 19(2): 258-63.
10. Hoffmann MVGS. Estudo de resistência térmica de *Byssoschlamys nivea* e *Talaromyces flavus* em suco de maçã [dissertação de mestrado]. Florianópolis, SC: Universidade Federal de Santa Catarina, 2004. 102 p.
11. Olliver M, Smith G. *Byssoschlamys* sp nov. *J Bot Br Foreign*. 1933; 71: 169-97.
12. Olliver M, Rendle TA new problem in fruit preservation: studies on *B. fulva* and its effect on the tissues of processed fruit. *J Soc Chem Ind*. 1934; 53: 166T.
13. Eiroa MNU, Amstalden VC. Ocorrência de espécies de *Byssoschlamys* em hortas, pomares e vinhedos da região de Campinas. *Colet ITAL*. 1985; 15:61-0.
14. Ellis WO, Smith JP, Simpson BK, Oldham JH. Aflatoxins in food: occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of control. *Crit Rev in Food Sci & Nutr*. 1991; 30(4): 403-39.
15. Frank HK. Diffusion of aflatoxin in foodstuffs. *J Food Sci*. 1968; 33: 89-00.
16. Pinto AFMA. Doenças de origem microbiana transmitidas por alimentos. [acesso em 18 de novembro de 2004.] Disponível em: http://www.ipv.pt/millennium/ect4_1.htm.
17. Kubena LE, Harvey RB, Phillips TD, Corrier DE, Huff WE. Diminution of aflatoxicosis in growing chickens by the dietary addition of a hydrated sodium calcium aluminosilicate. *Poultry Sci*. 1990; 69: 727-35.
18. Araújo JMA. Química de alimentos: teoria e prática. 19. ed. Viçosa: Imprensa Universitária, 1995.
19. Brasil Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária [ANVISA]. Resolução RDC nº 3, de 15 de janeiro de 2007. Aprova os Regulamentos Técnicos sobre “Atribuição de Aditivos e seus Limites Máximos para a Categoria 3 de Alimentos: Gelados comestíveis”, sobre “Atribuição de Aditivos e seus Limites Máximos para a Categoria 13 de Alimentos: Molhos e Condimentos”, e sobre “Atribuição de Aditivos e seus Limites Máximos para a Categoria de Alimentos 16.2: Bebidas Não Alcoólicas, Subcategoria 16.2.2: Bebidas Não Alcoólicas Gaseificadas e Não Gaseificadas”, que consta como Anexo. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 17 jan. 2007.
20. Brasil. Ministério da Saúde da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) Resolução RDC nº 217, de 29 de julho de 2005. Aprova a Extensão de Uso do Aditivo Dióxido de Enxofre e seus Sais de Cálcio, Sódio e Potássio na Função Conservador em Polpas e Purês de Vegetais de acordo com o Anexo. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 1º ago. 2005.
21. Srour R. Benzoic acid and derivatives. In: Srour R, ed. *Aromatic intermediates and derivatives*. Paris; 1998. p. A.IV.1–A.IV.17.
22. Jay JM. *Microbiologia de Alimentos*. 6ª Ed. São Paulo: Editora Artmed; 2005.
23. Piper PW. Yeast superoxide dismutase mutants reveal a pro-oxidant action of weak organic acid food preservatives. *Free Radic Biol Med* 1999; 27(11-12):1219-27.
24. Nascimento RF, Prata LF, Aquino FWB, Amorim AGN. Determinação de aditivos, aldeídos furânicos, açúcares e cafeína em bebidas por cromatografia líquida de alta eficiência: validação de metodologias. *Ciênc Tec Alim*. 2004; 24(1): 32-8.
25. World Health Organization – WHO. Benzoic acid and sodium benzoate. *Conc Int Chem Assess Geneva*. 2000.(Doc 26).
26. Food Standards Agency (FSA). Agency revises advice on certain artificial colours. FSA 11 Sept 2007. [acesso em 24 de Janeiro de 2009]. Disponível em: <http://www.food.gov.uk/news/newsarchive/2007/sep/foodcolours>.
27. Taylor SL, Bush RK. Sulfitos as food ingredients. *Food Tech*. 1986; 40 (6): 47-2.
28. Taylor SL, Bush RK. Sulfitos as food ingredients. *Food Tech*. 1987; 39 (11): 532-6.
29. Teles Fº PA. Asma Brônquica – tipos: asma por sulfitos. [acesso em 24 de janeiro de 2009]. Disponível em: http://www.asma-bronquica.com.br/medical/tipos_de_asma_asma_sulfitos.html.
30. Taylor SL. Why sulfite alternatives? *Food Technol*. 1993; 47 (10): 14.
31. National Institute of Health (NIH). Adverse Reactions to Foods. American Academy of Allergy and Immunology Committee on Adverse Reactions to Foods and National Institute of Allergy and Infectious Diseases. U.S. Department of Health and Human Services- Public Health Service. Washington, DC, USA: U.S. Government Printing Office, 1984. Publication n. 84-2442.
32. Peroni DG, Boner AL. Sulfite sensitivity. *Clin Exp Allergy*. 1995; 25 (8): 680-1
33. Perrin-Ansart MC. Sur les sulfites employés comme conservateurs. *Cah Nutr Diet*. 1989; 24 (4): 291-7.
34. Papazian R. Sulfitos, safe for most, dangerous for some. *FDA Consumer Magaz*. 1996; 30(10): 35.
35. Tfouni SAV, Toledo MCF. Determination of benzoic and sorbic acids in Brazilian food. *Food Control*. 2002; 13:117–23.
36. Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA. Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos 2ª ed. São Paulo: Varela; 2001.

37. Leitão MFF. Conservadores de alimentos e fatores que afetam sua eficiência no controle de microrganismos. *Colet ITAL*. 1990; 20 (9):116-27.
38. Sano A, Kurita N, Coelho KIR, Takeo K, Nishimura K, Miyaji M. A comparative study of four different staining methods for estimation of live yeast form cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathologia*. 1993;124 (3):157-61.
39. Eicher R, Ludwig H. Influence of activation and germination on high pressure inactivation of ascospores of the mould *Eurotium repens*. *Comp Bioch Physiol*. 2002; 131: 595-04.
40. Splittstoesser DF, Nielsen PV, Churey JJ. Detection of viable ascospores of *Neosartorya*. *J Food Prot*. 1993; 56: 599-03.
41. Splittstoesser DF, Splittstoesser CM. Ascospores of *Byssochlamys* compared with those of heat resistant *Aspergillus*. *J Food Sci*. 1977; 42(3): 685-8.
42. Salomão BCM. Isolamento, identificação e estudo da resistência térmica de fungos filamentosos termorresistentes em produtos de frutas. [dissertação de mestrado]. Florianópolis, SC: Universidade Federal de Santa Catarina, 2002. 54pp.
43. Slongo AP. Estudo da influência de diferentes fatores na termorresistência do fungo *Neosartorya fischeri* em sucos tropicais. [dissertação de mestrado]. Florianópolis, SC: Universidade Federal de Santa Catarina, 2004. 141pp.
44. Slongo AP, Aragão GMF. Factors affecting the thermal activation of *Neosartorya fischeri* in pineapple and papaya nectars. *Braz J Microbiol*. 2006; 37 (3): 312-6.
45. Marcolino VA. Quantificação de leveduras, bolores comuns e termorresistentes em linha de processamento asséptico de bebida de uva [dissertação de mestrado]. Campinas, SC: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2003. 70p.
46. Baglioni F. Estudo da ocorrência de fungos filamentosos termorresistentes em polpa de tomate envasada assepticamente. [dissertação de mestrado]. Campinas, SC: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1998. 65p.
47. Delgado DA. Ação esporicida do peróxido de hidrogênio sobre bolores isolados de laminado para embalagens assépticas. [tese de doutorado]. Campinas, SC: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2001. 75p.
48. Nielsen PV. Preservative and temperature effect on growth of three varieties of the heat-resistant mold, *Neosartorya fischeri*, as measured by an impedimetric method. *J Food Sci*. online 2006; 56 (6): 1735-40.
49. Nielsen PV, Beuchat LR, Frisvad JC. Growth and fumitremorgin production by *Neosartorya fischeri* as affected by food preservatives and organic acids. *J Appl Bacteriol*. 1989; 66(3): 197-07.
50. Beuchat LR. Effectiveness of various food preservatives in controlling the outgrowth of *Byssochlamys nivea* ascospores. *Mycopathologia*. 1976; 59(3):175-8.
51. Roland JO, Beuchat LR. Biomass and patulin production by *Byssochlamys nivea* in apple juice as affected by sorbate, benzoate, SO₂ and temperature. *J Food Sci*. 1984; 49(2): 402-6.
52. Beuchat LR. Combined effects of solutes and food preservatives on rates of inactivation of and colony formation by heated spores and vegetative cells of molds. *Appl Environ Microbiol*. 1981; 41 (2): 472.
53. Rajashekhara E, Suresh ER, Ethira J. Modulation of thermal resistance of ascospores of *Neosartorya fischeri* by acidulants and preservatives in mango and grape juice. *Food Microb*. 2000; 17:269-75.

Qualidade microbiológica de polpas de frutas congeladas

Microbiological quality of frozen fruit pulps

RIALA6/1212

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

* Endereço para correspondência: Rua Oswaldo Cochrane, 240, apto. 12, Bairro Embaré, Santos, SP, CEP 11040-110, esebastiany@yahoo.com.br

¹Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, RR, Brasil,

²Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Agrárias, Areia, PB, Brasil,

Recebido: 07.05.2009 – Aceito para publicação: 11.08.2009

RESUMO

A produção de polpas de frutas é uma alternativa econômica em Roraima, onde há ampla aceitação do produto e o mercado é também abastecido com polpas de frutas de outras regiões. Os produtores locais empregam processos artesanais e não adotam sistemas adequados de controle de qualidade. Com o objetivo de avaliar a qualidade microbiológica de polpas de frutas congeladas comercializadas em Boa Vista, RR, foram coletadas 100 amostras de polpas de frutas de cinco marcas comerciais e de quatro sabores, sendo uma marca de produto pasteurizado proveniente de outro estado. As demais marcas do produto eram *in natura* e provenientes de produtores locais. Foi observado crescimento significativo de bolores e leveduras e de bactérias heterotróficas nas amostras analisadas; porém, não foi detectada a presença de *Salmonella sp.*, tampouco desenvolvimento significativo de coliformes. Das amostras avaliadas, 78% estavam em desacordo com os padrões para bolores e leveduras; as polpas *in natura* (fabricantes locais) apresentaram maior índice de inadequação do que as pasteurizadas. O elevado percentual de amostras insatisfatórias indica a necessidade urgente de adequação do processo produtivo, seguindo-se as exigências da legislação específica.

Palavras-chave. polpa de fruta, padrões microbiológicos, saúde pública, Roraima.

ABSTRACT

The production of fruit pulps is an economical alternative in the State of Roraima, Brazil where these products meet with general acceptance. The market is also supplied with pulps coming from other places. The local producers prepare them craftsmanly without any adequate processing quality control. Aiming at evaluating the microbiological quality of frozen fruit pulps marketed in Boa Vista, RR, 100 samples were collected, from five commercial brands, and of four fruit flavours. The sample from a brand was a pasteurized product and derived from another State, and the four other were *in natura* fruit pulps samples which were locally produced. It was observed a significant growing of moulds, yeasts and heterotrophic bacteria on the analyzed samples, but it wasn't detected the presence of *Salmonella sp.* and neither coliforms significant development. Of 100 analyzed samples, 78% were not in compliance with the established microbiological standards for mould and yeast. *In natura* pulps (locally produced) showed higher index of inadequate results than pasteurized pulps. The high percentual of unsatisfactory samples indicate that it is necessary to adequate the productive procedures in accordance to the legal requirements.

Key words. fruit pulp, microbiological standards, public health, Roraima.

INTRODUÇÃO

A comercialização de produtos derivados de frutas tem crescido em todo o mundo¹, sendo que a demanda apresenta tendência de crescimento devido às suas características organolépticas e vantagens à saúde. A alta perecibilidade dos frutos é responsável por perdas significativas, o que tem impulsionado o desenvolvimento de processos tecnológicos, destacando-se a produção de polpas de frutas congeladas².

A produção de polpas de frutas regionais vem se fortalecendo como uma alternativa de renda no estado de Roraima. Entretanto, a maioria dos fabricantes locais utiliza processos artesanais, sem a observância das técnicas recomendadas de processamento, não empregando a pasteurização devido aos custos e à falta de suporte técnico, o que compromete a qualidade do produto. O quantitativo total de produção e/ou comercialização de polpas de frutas no estado é desconhecido; contudo, o mercado consumidor tem se ampliado, inclusive com a comercialização de polpas de frutas produzidas em outros estados.

É de fundamental importância avaliar a qualidade das polpas de frutas comercializadas no estado, com a finalidade de verificar a sua adequação à legislação; comparar o produto local, não submetido à pasteurização, com o produto proveniente de outros estados (pasteurizado) e, com isso, fornecer subsídios para uma política agroeconômica e de saúde pública que contemplem esta importante atividade produtiva local.

Devido à sua composição, as polpas de frutas constituem-se em bons substratos para o desenvolvimento de micro-organismos, os quais, além de deteriorar o produto, podem acarretar danos à saúde do consumidor. Para garantir a oferta de um produto isento de contaminações, é necessário que se realize um rigoroso controle do processo produtivo e do produto. A conservação das polpas de frutas e a manutenção da qualidade microbiológica exigida pela legislação têm sido atendidas principalmente pelo emprego da pasteurização e do congelamento^{3,4}.

Com base na composição nutricional das frutas, poder-se-ia presumir que estas são capazes de sustentar o desenvolvimento de bactérias, bolores e leveduras; contudo, o seu pH é mais baixo do que o intervalo que favorece o crescimento bacteriano. Por outro lado, a ampla faixa de pH de crescimento de bolores e leveduras propicia que estes atuem como agentes de alteração das frutas. A presença de fungos e leveduras é preocupante

principalmente devido a sua capacidade de produzir micotoxinas, algumas mutagênicas e carcinogênicas^{5,6}.

Ainda que os produtos de frutas sejam mais suscetíveis à contaminação por bolores e leveduras, surtos de doenças entéricas causados por bactérias, parasitas e vírus têm sido documentados⁷. As frutas apresentam risco de contaminação por *Salmonella*, muitas vezes como resultado de contaminação cruzada^{8,9,10}. A presença de *E. coli* O157:H7 e *Salmonella* ácido-tolerante já foi observada em diversos subprodutos, sugerindo que estes podem ser a causa de surtos envolvendo produtos ácidos, o que coloca em dúvida a segurança em se consumir sucos de frutas não pasteurizados^{5,11}.

A Portaria nº 451/97 – Ministério da Saúde, de 19 de setembro de 1997¹² incluía a contagem de bolores e leveduras como parâmetro de qualidade sanitária de refrescos de frutas. Esta foi revogada pela Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001 – Anvisa¹³, a qual exclui este parâmetro. Contudo, a literatura reporta resultados de numerosos estudos^{14,15,16} que apresentam elevadas contagens de bolores e leveduras, demonstrando ser discutível a não adoção deste critério na avaliação da qualidade de sucos, refrescos, néctares e polpas de frutas nesta Resolução. A legislação vigente no âmbito do Ministério da Agricultura (Instrução Normativa nº1, de 07 de janeiro de 2000), por sua vez, fixa limites para bolores e leveduras em polpa de frutas¹⁷.

MATERIAL E MÉTODOS

■ Seleção das marcas e sabores avaliados

Foram selecionadas cinco marcas comerciais de polpas de frutas congeladas, comercializadas em feiras livres e supermercados. Visando a resguardar a identidade das empresas avaliadas, as marcas das polpas de frutas foram identificadas pelas letras A, B, C, D e E:

- marca A: polpas de frutas pasteurizadas fabricadas por empresa de outro estado, com registro no Ministério da Agricultura e comercializadas em supermercados;
- marcas B e C: polpas de frutas não submetidas a tratamento térmico, fabricadas por empresa local, com registro no Ministério da Agricultura e comercializadas em supermercados;
- marcas D e E: polpas de frutas não submetidas a tratamento térmico, fabricadas por empresa local, sem registro em órgão competente e comercializadas em feiras livres.

De cada marca selecionada, foram escolhidos quatro sabores: acerola, cupuaçu, goiaba e maracujá.

■ Obtenção das amostras de polpas de frutas

As amostras de polpas de frutas foram adquiridas nos pontos de comercialização descritos, na própria embalagem em que são comercializadas e congeladas. Foram obtidas cinco repetições de cada marca e de cada sabor, do mesmo lote, perfazendo um total de 100 amostras (4 sabores x 5 marcas x 5 repetições). O número de repetições foi estipulado de acordo com o plano de amostragem (amostra representativa) definido na legislação¹³. As marcas D e E não identificavam o lote na embalagem do produto; neste caso, as amostras foram tomadas ao acaso e analisadas como sendo do mesmo lote.

As amostras foram transportadas em caixa térmica com gelo para o Setor de Microbiologia/Divisão de Bromatologia e Química do Laboratório Central de Saúde Pública de Roraima (Lacen/RR) e mantidas congeladas em *freezer* horizontal, a cerca de -18°C, até a análise.

■ Preparo das amostras de polpas de frutas

O descongelamento das amostras foi realizado na embalagem original, em geladeira (2-5°C) por 18 horas. A seguir, as amostras foram homogeneizadas por agitação⁶.

■ Análises microbiológicas

A metodologia analítica empregada foi a descrita em Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos¹⁸ e em Bacteriological Analytical Manual⁶. Todos os meios de cultura utilizados eram desidratados e das marcas comerciais Difco ou Merck.

Antes da abertura da embalagem, esta foi desinfetada passando-se algodão embebido em álcool 70%. A embalagem foi aberta com auxílio de tesoura, previamente desinfetada com álcool 70% e realizados os seguintes ensaios: determinação do NMP (Número Mais Provável) de coliformes totais e NMP de coliformes termotolerantes; determinação de *Salmonella sp.*/25g; contagem de bolores e leveduras e contagem de bactérias heterotróficas.

Os resultados foram avaliados quanto à adequação à legislação: Resolução RDC n. 12, de 02 de janeiro de 2001 – Anvisa¹³ e Instrução Normativa n. 1, de 07 de janeiro de 2000 – Ministério da Agricultura e do Abastecimento¹⁷.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

■ Determinação do NMP de coliformes totais e NMP de coliformes termotolerantes

A Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001 – Anvisa¹³ estabelece como tolerância para coliformes termotolerantes em polpas de frutas congeladas, submetidas ou não a tratamento térmico, o valor de 10²/g. O parâmetro coliformes totais não é exigido, porém este ensaio foi realizado por ser indicativo da qualidade higiênico-sanitária. Nenhuma das amostras de polpas de frutas analisadas excedeu ao máximo permitido, sendo que o NMP/g variou de <3 a 4 para coliformes totais; para coliformes termotolerantes, foi <3 para 100% das amostras. Portanto, todos os lotes analisados estavam de acordo com a Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001 – Anvisa¹³ em relação a este parâmetro.

O fato de não ter sido observado crescimento significativo de bactérias do grupo coliformes nas amostras avaliadas pode ser atribuído à acidez das polpas de frutas. Estes resultados são similares aos obtidos em estudos efetuados na região de São José do Rio Preto (SP)^{16,19,20}, em Boa Vista (RR)²¹ e em Palmas (TO)²². Entretanto, outros pesquisadores observaram o desenvolvimento destes micro-organismos em pesquisas realizadas com polpas de frutas em diferentes estados do país^{14,15,23,24,25,26,27,28}.

■ Determinação de *Salmonella sp*

De acordo com a Instrução Normativa n.º 1, de 07 de janeiro de 2000 – Ministério da Agricultura e do Abastecimento¹⁷ e Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001 – Anvisa¹³, o padrão estabelecido para este micro-organismo é ausência em 25 gramas, uma vez que a *Salmonella sp.* é uma bactéria patogênica. Em nenhuma das amostras foi detectada a presença deste micro-organismo; portanto, para este parâmetro, os lotes analisados estavam de acordo com os padrões legais.

O resultado do presente estudo é condizente com os obtidos em diversas pesquisas, nas quais 100% das amostras apresentaram ausência de *Salmonella sp.*^{14,15,16,20,23,24,27}. Hoffmann et al.¹⁹, em pesquisa realizada em São José do Rio Preto (SP), detectaram *Salmonella sp* em 10% das amostras analisadas.

■ Contagem de bolores e leveduras

Uma vez que a Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001 – Anvisa¹³ não estabelece padrões para bolores e

leveduras em polpas de frutas, os resultados das análises para este grupo de micro-organismos foram analisados frente à legislação vigente no âmbito do Ministério da Agricultura (Instrução Normativa nº 1, de 7 de janeiro de 2000)¹⁷. Esta fixa limites máximos diferenciados para polpa *in natura* ($5,0 \times 10^3$ /g) e para polpa que sofreu tratamento térmico ou conservada quimicamente ($2,0 \times 10^3$ /g).

Os valores obtidos na contagem de bolores e leveduras variaram de $<1,0 \times 10^2$ UFC (Unidade Formadora de Colônia)/g, verificado em polpa de cupuaçu da marca A, até $6,9 \times 10^5$ UFC /g, valor detectado para polpa de acerola da marca B, com uma média de $5,0 \times 10^4$ UFC/g (Tabela 1).

Para todos os sabores, a marca A apresentou a menor taxa de amostras cujas contagens foram superiores ao padrão máximo; sendo que, para a polpa de cupuaçu, nenhuma amostra desta marca excedeu o limite. Para a polpa de goiaba, o percentual de amostras da marca A acima do limite foi igual ao percentual de amostras da

marca C. Todas as marcas, exceto a marca A, apresentaram 100% de amostras acima do limite para, pelo menos, dois sabores (Tabela 1).

Conforme demonstrado na Tabela 2, 78% das amostras apresentaram contagens acima do limite. A marca A (polpa tratada termicamente) foi a que apresentou o menor percentual (6%) de amostras que excederam o limite; enquanto que a marca C (polpa *in natura* e com registro no órgão competente) apresentou o mesmo percentual de contaminação (19%) que a marca D, que não possui registro. Por sua vez, todas as amostras (20%) de polpas da marca E apresentaram contagens de bolores e leveduras acima do limite máximo.

As elevadas contagens de fungos obtidas neste estudo são condizentes com os resultados de trabalho com polpas comercializadas na Paraíba e em Pernambuco, onde 16,9% das amostras estavam acima do limite¹⁴; também estão de acordo com estudo efetuado nos estados do Ceará, Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte, onde

Tabela 1. Contagens mínimas, máximas e médias de bolores e leveduras e percentual de contaminação de amostras de polpas de frutas comercializadas em Boa Vista/ RR.

Sabor	Marca	Bolores e leveduras (UFC/g)			Amostras contaminadas (%) [*]
		Mínimo	Máximo	Média	
Acerola	A	$2,0 \times 10^2$	$3,6 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$	20
	B	$5,7 \times 10^3$	$6,9 \times 10^5$	$1,4 \times 10^5$	100
	C	$7,6 \times 10^4$	$4,7 \times 10^5$	$2,1 \times 10^5$	100
	D	$4,0 \times 10^3$	$1,9 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$	80
	E	$3,1 \times 10^4$	$5,9 \times 10^4$	$4,6 \times 10^4$	100
Cupuaçu	A	$<1,0 \times 10^2$	$5,0 \times 10^2$	$1,8 \times 10^2$	0
	B	$1,1 \times 10^3$	$5,8 \times 10^3$	$4,2 \times 10^3$	20
	C	$1,1 \times 10^4$	$3,7 \times 10^5$	$2,2 \times 10^5$	100
	D	$2,4 \times 10^4$	$4,5 \times 10^4$	$3,3 \times 10^4$	100
	E	$6,1 \times 10^3$	$8,7 \times 10^3$	$7,6 \times 10^3$	100
Goiaba	A	$2,0 \times 10^3$	$8,8 \times 10^3$	$5,1 \times 10^3$	80
	B	$8,8 \times 10^3$	$7,3 \times 10^4$	$3,0 \times 10^4$	100
	C	$3,2 \times 10^3$	$2,7 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$	80
	D	$1,5 \times 10^4$	$1,3 \times 10^5$	$4,8 \times 10^4$	100
	E	$2,6 \times 10^4$	$5,2 \times 10^4$	$3,7 \times 10^4$	100
Maracujá	A	$2,0 \times 10^2$	$3,8 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$	20
	B	$1,9 \times 10^3$	$5,2 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$	60
	C	$9,0 \times 10^4$	$2,6 \times 10^5$	$1,4 \times 10^5$	100
	D	$1,5 \times 10^4$	$2,3 \times 10^4$	$1,9 \times 10^4$	100
	E	$1,3 \times 10^4$	$3,1 \times 10^4$	$2,2 \times 10^4$	100

* n=20

24% das amostras ultrapassaram os limites, sendo que as contagens variaram de <10 UFC/g a $1,2 \times 10^5$ UFC/g²⁴. Em Palmas (TO), 29,6% das amostras de polpas analisadas ultrapassaram o limite legal permitido²²; enquanto que em pesquisa realizada no Ceará foram encontradas contagens de bolores e leveduras ainda mais elevadas que as observadas neste estudo: <10 UFC/g a 5×10^{10} UFC/g²⁶. Ressalta-se que o percentual de amostras contaminadas por bolores e leveduras constatado na presente pesquisa (78%) é superior aos percentuais relatados pelos autores acima. Hoffmann et al.¹⁹ e Fázio et al.²⁰ analisaram polpas comercializadas em São José do Rio Preto (SP) e obtiveram contagens de bolores e leveduras inferiores às observadas nesta pesquisa.

Tabela 2. Percentual de amostras de polpas de frutas comercializadas em Boa Vista/RR contaminadas por bolores e leveduras, de acordo com a marca, em relação ao número total de amostras e ao número de amostras por marca.

Marca	Percentual de contaminação por bolores e leveduras	
	n=100*	n=20**
A	6	30
B	14	70
C	19	95
D	19	95
E	20	100
TOTAL	78	---

* n° total de amostras

** n° de amostras por marca

Quanto ao sabor, observou-se que a polpa de goiaba apresentou o maior percentual de contaminação, enquanto que a de cupuaçu foi a menos contaminada (Tabela 3).

O percentual de amostras de polpa de acerola contaminadas (80%) no presente trabalho (tabela 3) é superior ao constatado em estudo que abrangia os estados do Nordeste, no qual 18,4% das amostras de polpa de acerola apresentaram-se fora dos padrões, bem como 24,4% das amostras de polpa de cajá e 55% das amostras de polpa de caju²³. Em estudo realizado em São Luís (MA)¹⁵ com polpas de abacaxi e acerola, 100% das amostras de

Tabela 3. Percentual de amostras de polpas de frutas comercializadas em Boa Vista/RR contaminadas por bolores e leveduras, de acordo com o sabor.

Sabor	Contaminação (%)*
Acerola	80
Cupuaçu	64
Goiaba	92
Maracujá	76

* n=25 (por sabor)

polpa de abacaxi e 20% das amostras de polpa de acerola apresentaram contagens de bolores e leveduras acima do limite estabelecido pela legislação, percentual inferior ao encontrado na presente pesquisa. Para este sabor, no presente estudo, as contagens de bolores e leveduras variaram de $2,0 \times 10^2$ (marca A) a $6,9 \times 10^5$ UFC/g (marca B), conforme apresentado na Tabela 1.

Segundo resultados relativos a avaliação de polpas de frutas produzidas na Bahia, 60% das amostras de polpa de goiaba e 70% das amostras de polpa de maracujá apresentavam contagens acima do limite²⁵. No presente trabalho, 92% das amostras de polpa de goiaba, com contagens que variaram de $2,0 \times 10^3$ (marca A) a $1,3 \times 10^5$ UFC/g (marca D) e 76% das de polpa de maracujá, cujas contagens oscilaram de $2,0 \times 10^2$ (marca A) a $2,6 \times 10^5$ UFC/g (marca C), apresentaram contagens acima do máximo permitido, sendo as contagens e os percentuais de contaminação (tabelas 1 e 2) mais elevados do que os descritos naquele estudo.

Costa et al.²⁹, em trabalho sobre conservação de polpa de cupuaçu, obtiveram contagem dentro do limite. No presente estudo, o percentual de amostras de polpa de cupuaçu com contagens acima do permitido foi de 64% (Tabela 3).

As elevadas contagens de bolores e leveduras observadas no presente estudo podem ser devido à qualidade inadequada da matéria-prima, à falhas na higienização e/ou processamento ou à manutenção do produto a temperatura inadequada. A fim de garantir a fabricação de um produto isento de contaminações, devem ser empregados um controle sanitário de pessoal e de equipamentos mais efetivo, seleção criteriosa da matéria-prima, além de rigoroso controle do processo produtivo e do produto final.

■ Contagem de bactérias heterotróficas

Do total de 40 amostras submetidas à contagem de bactérias heterotróficas, os resultados variaram de $1,0 \times 10^2$ UFC/g até $4,0 \times 10^5$ UFC/g, com uma média de $2,0 \times 10^4$ UFC/g. As mais baixas contagens foram verificadas nas polpas de acerola da marca A e de cupuaçu da marca B, ao passo que a mais alta contagem foi observada na polpa de cupuaçu da marca C. Quanto à polpa tratada termicamente (marca A), esta apresentou contagens baixas, variando de $1,0 \times 10^2$ UFC/g a $6,0 \times 10^3$ UFC/g (Tabela 4).

Em pesquisa realizada por Feitosa et al.¹⁴, a contagem de bactérias heterotróficas variou de <10 UFC/g a $1,0 \times 10^5$ UFC/g, atendendo ao limite legal vigente na época. Estes resultados são bastante próximos aos obtidos no presente estudo.

A legislação que estabelece o padrão de potabilidade para água de consumo humano limita como máximo para bactérias heterotróficas o valor de $5,0 \times 10^2$ UFC/ml³⁰; portanto, as contagens obtidas no presente estudo podem

ser consideradas elevadas. Estes resultados podem estar relacionados ao crescimento quase insignificante de coliformes, uma vez que as bactérias heterotróficas, por serem incapazes de sintetizar seu próprio alimento, necessitam de uma fonte de carbono orgânica, além de desenvolverem-se numa velocidade superior aos coliformes, podendo inibir o crescimento destes devido à competição alimentar³¹.

Dentre os grupos de micro-organismos avaliados, foi observado crescimento significativo somente de bolores e leveduras. Assim, 78% das amostras analisadas estavam em desacordo com a legislação e, portanto, inadequadas ao consumo humano. Entre as amostras contaminadas, 72% correspondiam a polpas *in natura* e 6% às polpas tratadas termicamente.

O percentual de amostras inadequadas verificado no presente estudo é mais elevado do que em outras pesquisas, principalmente para as polpas *in natura*, ou seja, que são produzidas por empresas locais, o que indica

Tabela 4. Contagens mínimas, máximas e médias de bactérias heterotróficas em amostras de polpas de frutas comercializadas em Boa Vista/ RR.

Sabor	Marca	Bactérias heterotróficas (UFC/g)		
		Mínimo	Máximo	Média
Acerola	A	$1,0 \times 10^2$	$3,0 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$
	B	$7,0 \times 10^2$	$2,8 \times 10^3$	$1,8 \times 10^3$
	C	$2,8 \times 10^3$	$3,3 \times 10^3$	$3,1 \times 10^3$
	D	$5,0 \times 10^2$	$6,7 \times 10^2$	$5,9 \times 10^2$
	E	$1,2 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3$	$1,4 \times 10^3$
Cupuaçu	A	$1,3 \times 10^2$	$6,7 \times 10^2$	$4,0 \times 10^2$
	B	$1,0 \times 10^2$	$7,3 \times 10^2$	$4,2 \times 10^2$
	C	$1,2 \times 10^4$	$4,0 \times 10^5$	$2,1 \times 10^5$
	D	$1,8 \times 10^3$	$5,1 \times 10^3$	$3,5 \times 10^3$
	E	$2,7 \times 10^2$	$2,5 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$
Goiaba	A	$1,8 \times 10^3$	$2,2 \times 10^3$	$2,0 \times 10^3$
	B	$1,3 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$	$1,7 \times 10^2$
	C	$1,4 \times 10^3$	$9,3 \times 10^3$	$5,4 \times 10^3$
	D	$6,3 \times 10^2$	$3,1 \times 10^3$	$1,9 \times 10^3$
	E	$3,2 \times 10^3$	$5,4 \times 10^4$	$2,9 \times 10^4$
Maracujá	A	$3,3 \times 10^3$	$6,0 \times 10^3$	$4,7 \times 10^3$
	B	$5,7 \times 10^3$	$9,9 \times 10^3$	$7,8 \times 10^3$
	C	$1,4 \times 10^3$	$2,1 \times 10^3$	$1,8 \times 10^3$
	D	$4,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$	$7,0 \times 10^2$
	E	$3,5 \times 10^3$	$4,3 \times 10^3$	$3,9 \times 10^3$

que o processo produtivo no estado não é satisfatório. Em avaliação realizada com polpas comercializadas em São José do Rio Preto (SP), Hoffmann et al.¹⁹ concluíram que 90% das amostras analisadas estavam de acordo com a legislação estadual; enquanto que, em estudo com polpas dos estados do Ceará, Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte, Feitosa et al.²⁴ concluíram que 76% das amostras estavam de acordo com os padrões. Por sua vez, Lima; Martins; Silva²⁶, em estudo realizado no Ceará, verificaram que 74,5% das polpas avaliadas se enquadravam nos padrões. Bueno et al.¹⁶, ao avaliar polpas de frutas em São José do Rio Preto (SP), constataram que 100% das amostras analisadas se enquadravam nos padrões; ao passo que 85% das amostras analisadas em Teresina (PI) estavam de acordo com a legislação²⁷. Estudos realizados por Maia²¹ em Boa Vista (RR) e Fázio et al.²⁰ em São José do Rio Preto (SP) constataram que 100% das amostras analisadas estavam dentro dos padrões. A diferença entre o percentual de amostras em desacordo com os parâmetros legais observada entre o presente estudo e a pesquisa efetuada por Maia²¹, ambos os trabalhos realizados em Boa Vista (RR), pode ser explicada pelo fato de que aquele autor não realizou a contagem de bolores e leveduras, que foi o grupo de micro-organismos que apresentou a maior taxa de crescimento nas amostras analisadas na presente pesquisa. Em pesquisa realizada em São Luís (MA), no entanto, apenas 57,9% das polpas analisadas estavam próprias para o consumo¹⁵.

CONCLUSÃO

A polpa de goiaba foi a que apresentou o maior percentual de contaminação (92%), enquanto que a polpa de cupuaçu foi a menos contaminada (64%).

Os bolores e leveduras foi o único grupo de micro-organismos que apresentou taxa de crescimento significativa, sendo que 78% das amostras apresentaram contagens acima dos limites estabelecidos pela legislação. Este grupo de micro-organismos constitui-se, portanto, em um importante indicador da qualidade sanitária de polpas de frutas. Assim, recomenda-se que este parâmetro volte a ser incluído no padrão microbiológico desta classe de produtos no âmbito da Anvisa.

Dentre as amostras de polpas de frutas analisadas, 78% estavam em desacordo com os padrões microbiológicos exigidos pela legislação. As amostras de polpas de frutas pasteurizadas, provenientes de fabricante de outro estado (marca A), apresentaram menor percentual de

inadequação quando comparadas às polpas *in natura* (fabricantes locais, correspondentes às marcas B, C, D e E); de onde conclui-se que a pasteurização confere maior segurança ao produto do que o simples congelamento.

Estes resultados demonstram que há necessidade dos fabricantes locais adequarem o processo tecnológico para obtenção de polpas de boa qualidade, a fim de atender às exigências da legislação, agregar valor econômico ao produto e possibilitar a conquista de novos mercados. Por sua vez, as autoridades fiscalizadoras devem tomar providências mais intensivas a fim de corrigir as irregularidades encontradas, devido aos aspectos legais, de direitos do consumidor e de saúde pública envolvidos nesta problemática.

AGRADECIMENTOS

À Capes, ao CNPq, ao Lacen/RR e ao Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais (PRONAT) da UFRR que possibilitaram a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Brunini MA, Durigan JF, Oliveira AL. Avaliação das alterações em polpa de manga 'Tommy-Atkins' congeladas. *Rev Bras Frutic*. 2002; 24 (3): 651-3.
2. Salgado SM, Guerra NB, Melo AB. Polpa de fruta congelada: efeito do processamento sobre o conteúdo de fibra alimentar. *Rev Nutr*. 1999; 12 (3): 303-8.
3. Pedrão MR, Beleia A, Modesta RCD, Prudencio-Ferreira SH. Estabilidade físico-química e sensorial do suco de limão Tahiti natural e adoçado, congelado. *Ciênc Tecnol Aliment*. 1999; 19 (2): 282-6.
4. Rosa SV, Rosa MF, Gomes FS, Cabral LMC. Remoção da microbiota de suco de manga através da microfiltração e ultrafiltração. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 20. Salvador: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1999: 357.
5. Jay JM. Microbiologia de Alimentos. 6 ed. Porto Alegre: Artmed; 2005.
6. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual On Line. Disponível em: URL: <http://www.cfsan.fda.gov/ebam/bam>. Acesso em: 1 mar. 2005.
7. Beuchat LR. Vectors and conditions for preharvest contamination of fruits and vegetables with pathogens capable of causing enteric disease. *Br Food J*. 2006; 108: 38-53.
8. Oosterom J. Epidemiological studies and proposed preventive measures in the fight against human salmonellosis. *Int J Food Microbiol*. 1991; 12 (1): 41-51.
9. Almeida CR, Schuch DMT, Gelli DS, Cuéllar JA, Diez AV, Escamilla JA. Contaminación microbiana de los alimentos vendidos em

- la via pública em ciudades de América Latina y características socio-económicas de sus vendedores y consumidores. OPAS/OMS; 1996.
10. Chitarra MIF, Chitarra AB. Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio. 2 ed. rev. e ampl. Lavras: UFLA; 2005.
 11. Linton M, Mc Clements MJ, Patterson MF. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in orange juice using a combination of high pressure and mild heat. *J Food Prot.* 1999; 62 (3): 277-9.
 12. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 451 de 19 de setembro de 1997. Regulamento técnico sobre os princípios gerais para o estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: URL: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis>. Acesso em: 1 mar. 2005.
 13. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução [ANVISA]. Resolução RDC nº 12 de 02 de jan. de 2001.. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: URL: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis>. Acesso em: 1 mar. 2005.
 14. Feitosa T, Bastos MSR, Oliveira MEB, Muniz CR, Bringel HF, Abreu SCA. Qualidade microbiológica de polpas de frutas produzidas e comercializadas nos estados da Paraíba e Pernambuco. *Higiene Alimentar* 1999; 13 (66/67): 111-5.
 15. Nascimento AR, Filho FF, Filho JEM, Cantanhede FB. Perfil microbiológico das polpas de acerola (*Malpighia glabra* L) e abacaxi (*Ananas comosus*), produzidas e comercializadas na Ilha de São Luís, MA. *Higiene Alimentar.* 1999; 13 (62): 44-7.
 16. Bueno SM, Lopes MRV, Graciano RAS, Fernandes ECB, Garcia-Cruz CH. Avaliação da qualidade de polpas de frutas congeladas. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2002; 62 (2):121-6.
 17. Brasil. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 1 de 7 de janeiro de 2000. Regulamento técnico geral para fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpa de fruta. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, p. 54-8, 10 jan. 2000. Seção 1.
 18. Instituto de Tecnologia de Alimentos. Métodos de análise microbiológica de alimentos. Manual técnico nº 14. ITAL: Campinas; 1995.
 19. Hoffmann FL, Garcia-Cruz, CH, Pagnocca FC, Vinturim TM, Mansor AP. Microorganismos contaminantes de polpas de frutas. *Ciênc Tecnol Aliment.* 1997; 17 (1) 32-7.
 20. Fázio MLS, Gonçalves TMV, Repisso CS, Martins M, Hoffman FL. Qualidade microbiológica de polpas congeladas de frutas, comercializadas na região de São José do Rio Preto, SP. *Higiene Alimentar.* 2006; 20 (138): 92-7.
 21. Maia RSM. Avaliação da qualidade microbiológica e condições de processamento de polpas de frutas comercializadas em Boa Vista/RR [Monografia]. Boa Vista: Universidade Federal de Roraima, 2004. 38pp.
 22. Santos CAA, Coelho AFS, Carreiro SC. Avaliação microbiológica de polpas de frutas congeladas. *Ciênc Tecnol Aliment.* 2008; 28 (4) 913-15.
 23. Bastos MSR, Feitosa T, Oliveira MEB. Análise qualitativa e tecnológica da agroindústria de polpa de fruta na região Nordeste. *Rev Bras Frutic.* 1999; 21 (3): 359-64.
 24. Feitosa T, Bastos MSR, Oliveira MEB, Muniz CR, Lemos TO, Oliveira SCA. Avaliação microbiológica e microscópica em polpas de frutas tropicais. *Bol SBCTA.* 1999; 33 (1), 35-7.
 25. Leite CC, Santana LRR, Silva MD, Sant'anna MEB, Assis PN. Avaliação microbiológica de polpas congeladas de frutas produzidas no estado da Bahia. *Higiene Alimentar.* 2000; 14 (78/79): 69-73.
 26. Lima JR, Martins SS, Silva JA. Avaliação de polpas de frutas congeladas comercializadas no estado do Ceará através de indicadores microbiológicos. *Higiene Alimentar.* 2001; 15 (88): 62-6.
 27. Abreu MC, Nunes IFS, Oliveira MMA. Perfil microbiológico de polpas de frutas comercializadas em Teresina, PI. *Higiene Alimentar.* 2003; 17 (112) 78-81.
 28. Bentes LM, Vieira GR, Chagas F, Silva CA. Avaliação de parâmetros físico-químicos e microbiológicos da polpa de tucumã comercializada no centro da cidade de Manaus-Amazonas. In: Encontro Nacional, 16 e Congresso Latino-Americano de Analistas de Alimentos, 2 [CD ROM]. Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Analistas de Alimentos, 2009.
 29. Costa MC, Maia GA, Souza Filho MSM, Figueiredo RW, Nassu RT, Monteiro JCS. Conservação de polpa de cupuaçu [*Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng.) Schum] por métodos combinados. *Rev Bras de Frutic.* 2003; 25 (2) 213-5.
 30. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria n.º 518 de 25 de março de 2004 do Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade e dá outras providências. Disponível em: URL: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis>.
 31. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. *Microbiologia.* 8 ed. Porto Alegre: Artmed; 2005.

Eficiência do Agar R2A na contagem de bactérias heterotróficas em água tratada para diálise

The efficiency of Reasoner'2 Agar for counting heterotrophic bacteria isolated from water for dialysis

RIALA6/1213

Adriana Aparecida Buzzo ALMODOVAR, Tatiana Caldas PEREIRA, Adriana BUGNO*

* Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, Seção de Controle de Esterilidade, Av. Dr. Arnaldo, 355, Cerqueira Cesar, São Paulo, SP, Brasil
CEP 01246-902. e-mail: adrbugno@ial.sp.gov.br

Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, Seção de Controle de Esterilidade

Recebido: 15.06.2009 – Aceito para publicação: 26.08.2009

RESUMO

Com o reconhecimento da má qualidade da água em causar potencial risco aos pacientes em tratamentos dialíticos, foram definidos os parâmetros de avaliação, entre os quais a contagem de bactérias heterotróficas. Considerando que a escolha dos meios de cultura e as condições de incubação utilizadas podem influenciar nos resultados da avaliação microbiológica da água tratada para diálise, este estudo realizou a análise da eficiência do ágar R2A para efetuar a contagem de bactérias heterotróficas. Foram analisadas 193 amostras de água tratada provenientes de clínicas de diálise do município de São Paulo e de Grande São Paulo, em que foram avaliadas diferentes temperaturas de incubação, bem como o desempenho analítico de ágar R2A em comparação ao teste realizado com ágar PCA. Não houve diferença significativa entre as contagens obtidas após a incubação por 96 horas a temperaturas de 23°C e 34°C. Entretanto, contagens significativamente maiores foram observadas em ágar R2A ($p < 0,02$), sendo este, portanto, mais adequado para a avaliação da qualidade de água tratada para diálise. Com a finalidade de minimizar os riscos ao paciente sob tratamento dialítico, recomenda-se o uso do teste em ágar R2A combinado com maior tempo de incubação, em função de sua maior sensibilidade, para a efetuar a contagem de bactérias heterotróficas em água tratada para diálise.

Palavras-chave. água para diálise, bactérias heterotróficas, ágar R2A, ágar PCA.

ABSTRACT

To detect the potential risk which may interfere on the quality of the water used for dialysis procedure, some assessment parameters have been established led to the definition of for its evaluation, such as the counting of heterotrophic bacteria. Considering that the chosen culture media and the incubation conditions may interfere on the results from microbiological analysis on water for dialysis, the present study evaluated the efficiency of R2A culture medium for performing the heterotrophic bacteria counting. A total of 193 samples of water collected from dialysis clinics located in the city of São Paulo and in other cities of the Grande São Paulo region were analyzed, and also the incubation temperature and the efficiency comparison on both R2A and PCA media were evaluated. No difference between bacteria counting on R2A medium after 96h-incubation at 24°C and 34°C was found. The highest bacteria counting was found on R2A medium ($p < 0.02$), which was considered to be mostly suitable for evaluating the water for dialysis. In order to minimize the risks to the patient under dialysis, the water for dialysis should be carried out by bacteria counting technique on R2A agar because of its high sensitivity, and incubating it for longer incubation times.

Key words. water for dialysis, heterotrophic bacteria, Reasoner'2 agar, Plate Count Agar.

INTRODUÇÃO

Hemodiálise consiste de procedimento terapêutico a pacientes portadores de insuficiência renal crônica, com objetivo de remover produtos de degradação metabólica e o excesso de água e sais minerais acumulados no organismo, em consequência de falência renal.

Pacientes portadores de doenças renais sob tratamento regular de hemodiálise são submetidos a três sessões semanais com duração de 3 a 4 horas. São expostos a aproximadamente 120L de água tratada a cada sessão¹⁻⁵, separados do sangue do paciente por membrana semipermeável, que pode permitir acesso direto de contaminantes eventualmente presentes na água^{4,6-9}. O monitoramento e a manutenção dos sistemas de tratamento da água são importantes para garantir a qualidade da água produzida e evitar riscos adicionais aos pacientes¹⁻¹², sendo que o reconhecimento do risco potencial resultou no estabelecimento de critérios e normas referentes aos parâmetros de especificação desta água por parte de vários órgãos e comissões internacionais, como a *European Pharmacopoeia* e a *Association for the Advancement of Medical Instrumentation* (AAMI)^{1,2,5,7,8,11,13,14} e, no Brasil, os critérios estabelecidos na Resolução RDC nº 154/2004¹⁵, os quais estabelecem que a contagem de bactérias heterotróficas deve ser menor que 200 UFC/mL.

Parâmetros microbiológicos de qualidade da água tratada foram definidos com intuito de prevenir a ocorrência de bacteremias e reações pirogênicas, considerando que a formação de biofilmes facilita a persistência microbiana no sistema e aumenta o risco de contaminação^{1-4,6-8,11-13,16}. Embora a membrana intacta do dialisador previna a contaminação do sangue com bactérias presentes no fluido de diálise, infecções podem ocorrer se houverem defeitos na integridade da membrana, se o nível de contaminação microbiana da água for elevado ou se ocorrer contaminação durante o processo de reuso dos dialisadores^{2,4,10,12,13,16}.

Os enfoques clássicos de enumeração de microorganismos em água incluem as técnicas de plaqueamento, filtração por membrana e determinação do número mais provável¹⁷. Como ocorre em qualquer técnica microbiológica, os resultados da enumeração de microorganismos são influenciados pelos meios de cultura empregados em combinação com as condições de incubação^{2,5,13-14,17-19}.

Existem dois tipos básicos de meios de cultura empregados em análises microbiológicas: aqueles que

apresentam alto conteúdo nutricional, como Agar caseína de soja (TSA) e Agar padrão para contagem (PCA), indicados para isolamento e enumeração de bactérias heterotróficas e bactérias isoladas de animais e humanos, e aqueles pouco nutrientes, como Agar Reasoner's 2A (R2A), que se destinam à detecção de bactérias oligotróficas de crescimento lento, além de bactérias heterotróficas com metabolismo adaptado a ambientes aquáticos e que requerem níveis baixos de nutrientes¹⁷⁻¹⁹. Técnicas analíticas que utilizam meios de cultura pouco nutrientes, associadas a períodos de incubação prolongados (5 a 7 dias) em temperaturas mais baixas (20 a 28 °C), demonstram ser mais sensíveis para determinar a contaminação microbiana em águas para consumo humano e em águas tratadas para diálise^{2,11,13-14,17,19-22}, embora meios de cultura mais nutrientes podem, eventualmente, melhorar sua capacidade de recuperação de micro-organismos quando utilizadas condições de incubação por períodos prolongados e temperaturas mais baixas¹⁹. As últimas edições da Farmacopeia Americana¹⁹ e da Farmacopeia Europeia recomendam a utilização de Agar R2A, com incubação a temperaturas entre 20 e 25 °C por 4 a 7 dias ou a temperaturas entre 30 a 35°C por 3 a 4 dias, para a enumeração de bactérias heterotróficas em água tratada.

Considerando a importância e a necessidade de avaliar a qualidade microbiológica da água utilizada em centros de diálise, este estudo teve o objetivo de comparar a eficiência do Agar R2A em relação ao Agar PCA para a enumeração de bactérias heterotróficas em amostras de água tratada provenientes de diversas clínicas de diálise da cidade de São Paulo e em cidades da Grande São Paulo, coletadas no âmbito do Programa Estadual de Monitoramento da Qualidade de Água Tratada para Diálise.

MATERIAL E MÉTODO

■ Desenho experimental

Neste estudo, foi realizada a comparação da enumeração de bactérias heterotróficas obtida em Agar R2A após incubação a temperaturas de 23°C e de 34°C (temperatura de referência), bem como a comparação da enumeração obtida entre os meios de cultura Agar R2A e Agar PCA (meio de cultura de referência).

■ Amostras

Foram avaliadas 193 amostras de água tratada coletadas em clínicas de diálise do município de São Paulo e cidades

da Grande São Paulo, durante o Programa Estadual de Monitoramento da Qualidade da Água Tratada em Serviços de Diálise.

As amostras foram colhidas assepticamente após fluxo de dois a três minutos, conforme as orientações da instituição baseadas nas recomendações da *American Public Health Association* (APHA)²⁰, tendo sido transportadas em caixas isotérmicas ao laboratório, sem ultrapassar seis horas entre a coleta e o início das análises microbiológicas, executadas imediatamente após o recebimento das amostras.

■ Enumeração de bactérias heterotróficas

A técnica de plaqueamento em profundidade (*Pour Plate*) foi executada conforme indicado em compêndios oficiais^{19,20}.

Para avaliar a eficiência do Agar R2A para enumerar bactérias heterotróficas nas amostras, após diferentes temperaturas de incubação, alíquotas de 1,0 mL de amostra foram transferidas, em quadruplicata, ao centro de placas de Petri, estéreis, sendo adicionados 20,0 mL de Agar R2A fundido e resfriado a 45 °C às placas. Todas as placas foram homogeneizadas e, após solidificação do meio de cultura, duas placas foram incubadas a 34 ± 2°C e as outras duas a 23 ± 2°C, em posição invertida, por 96 horas. O mesmo procedimento foi executado com alíquotas de 0,1 mL de amostra.

Adicionalmente, alíquotas de 1,0 mL de amostra foram transferidas, em quadruplicata, ao centro de placas de Petri, estéreis, sendo adicionados 20,0 mL de Agar R2A fundido e resfriado a 45 °C sobre duas placas e 20,0 mL de Agar PCA fundido e resfriado a 45 °C sobre outras duas placas. O mesmo procedimento foi executado com alíquotas de 0,1 mL de amostra. As placas foram homogeneizadas e após solidificação do meio de cultura, foram incubadas em posição invertida a 34 ± 2°C por 96 horas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias das contagens de bactérias heterotróficas/mL obtidas em cada tipo de meio de cultura avaliado e em cada temperatura de incubação foram calculadas para as amostras. Na avaliação estatística não foram consideradas as amostras que não apresentaram contagem bacteriana, que corresponderam a 17,56% das amostras incubadas a 24°C, 17,02% das incubadas a 34°C, 17,10% das amostras analisadas em Agar PCA e 6,22% em Agar R2A. Todos os

demais valores válidos para contagem bacteriana foram convertidos em escala logarítmica para que assumissem distribuição normal e cálculos estatísticos foram executados com o uso do software *SPSS 15.0 for Windows*, com intervalo de confiança de 95%.

Com o objetivo de comparar a eficiência para enumeração de bactérias heterotróficas nas amostras, foi realizado estudo de regressão linear, considerando as temperaturas de incubação utilizadas (Figura 1) e os meios de cultura avaliados (Figura 2).

Micro-organismos que podem se desenvolver em ambientes com condições extremas apresentam melhores resultados de cultivo em laboratório quando são incubados em condições que simulem tais ambientes, sendo que por esta razão, bactérias associadas à água tratada para diálise apresentam melhor desenvolvimento em meios

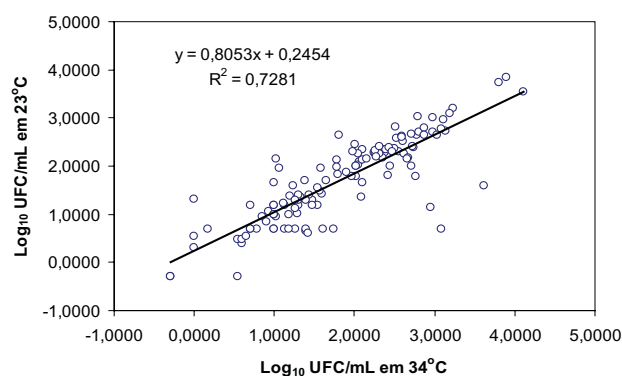


Figura 1. Representação gráfica de correlação entre as contagens de bactérias heterotróficas ($\text{Log}_{10}\text{UFC/mL}$) obtidas para as temperaturas de incubação de 23°C e 34°C.

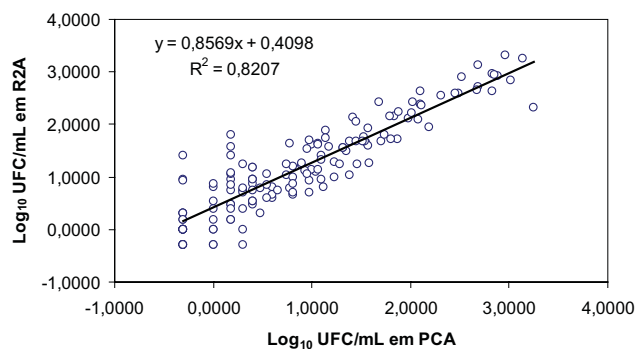


Figura 2. Representação gráfica de correlação entre as contagens de bactérias heterotróficas ($\text{Log}_{10}\text{UFC/mL}$) obtidas para os meios Agar R2A e Agar PCA, após 96 horas de incubação a 34°C.

de cultura pouco nutrientes, como Agar R2A, quando utilizado tempo de incubação superior às 48 horas e temperatura próxima a 25°C^{2, 7, 14, 17-19, 21-22}. Os resultados obtidos neste estudo indicaram alta correlação entre os logarítmicos das contagens obtidas após 96 horas de incubação a diferentes temperaturas ($r = 0,8558$, $p < 0,01$) e não haver diferença estatisticamente significativa entre as médias obtidas (t-Student $< 1,966$, $p = 0,746$), expressas em Log_{10} UFC/mL: 1,4718 ($\pm 1,1790$) para incubação a 23°C e 1,4366 ($\pm 1,0299$) para incubação a 34°C.

Considerando a avaliação da eficiência dos meios de cultura empregados, as médias obtidas na enumeração de bactérias heterotróficas, expressas em Log_{10} UFC/mL, foram 1,0421 ($\pm 0,8894$) em Agar R2A e 0,8349 ($\pm 0,9384$) em Agar PCA, sendo verificada diferença significativa entre as médias (t-Student $< 1,649$; $p = 0,018$), além de alta correlação entre os logarítmicos das contagens nos meios avaliados ($r = 0,9056$, $p < 0,01$). Em 81% das amostras analisadas, verificaram-se contagens de bactérias heterotróficas significativamente maiores em Agar R2A em relação às obtidas em Agar PCA.

Em adição à comparação da eficiência de enumeração, verificou-se o impacto da utilização dos meios de cultura na avaliação da qualidade de 193 amostras analisadas neste estudo, considerando-se o limite máximo preconizado na Resolução RDC 154/2004¹⁵, 200 UFC/mL. Contagens de bactérias heterotróficas superiores a 200 UFC/mL foram obtidas em 7,77% das amostras em Agar PCA e em 10,36% em Agar R2A. Seis amostras analisadas apresentaram contagens inferiores a 200 UFC/mL em Agar PCA mas superiores ao limite máximo quando utilizado o Agar R2A; somente uma amostra apresentou contagem superior ao limite máximo em Agar PCA e inferior a 200 UFC/mL em Agar R2A. Estes dados sugerem que o Agar PCA subestimou a contaminação bacteriana presente nas amostras e poderia erroneamente indicar o atendimento aos parâmetros microbiológicos definidos na legislação.

CONCLUSÃO

Para a avaliação da contaminação bacteriana em água tratada para diálise, meio de cultura pobre em nutrientes, como Agar R2A, ofereceu melhores resultados em relação ao Agar PCA, quando incubado a temperaturas de cerca de 34°C, por 96 horas. Para minimizar o risco ao paciente sob tratamento dialítico, recomendamos o uso do Agar

R2A combinado com períodos de incubação de 96 horas, para enumeração de bactérias heterotróficas em água para diálise, pois esse meio de cultura apresentou-se mais sensível.

REFERÊNCIAS

1. Arvanitidou M, Spaia S, Katsinas C, Pangidis P, Constantinidis T, Katsouyannopoulos V et al. Microbiological quality of water and dialysate in all haemodialysis centres of Greece. *Nephrol Dial Transplant*. 1988; 13: 949-54.
2. Pontoriero G, Pozzoni P, Andrulli S, Locatelli F. The quality of dialysis water. *Nephrol Dial Transplant*. 2003; 18 (suppl 7): vii21-5.
3. Silva AMM, Martins CTB, Ferraboli R, Jorgetti V, Romão-Junior JE. Revisão/Atualização em Diálise: Água para hemodiálise. *J Bras Nefrol*. 1996; 18 (2): 180-8.
4. Varo SD, Martins CHG, Cardoso MJO, Sartori FG, Montanari LB, Pires-Gonçalves RH. Isolamentos e fungos filamentosos em água utilizada em uma unidade de hemodiálise. *Rev Soc Bras Med Tropical*. 2007; 40: 326-31.
5. Vorbeck-Meister I, Sommer R, Vorbeck F, Hörl WH. Quality of water used for haemodialysis: bacteriological and chemical parameters. *Nephrol Dial Transplant*. 1999; 14: 666-75.
6. Brunet P, Berland Y. Water quality and complications of haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant*. 2000; 15: 578-80.
7. Gomila M, Gascó J, Busquets A, Gil J, Bernabeu R, Buades JM, et al. Identification of culturable bacteria present in haemodialysis water and fluid. *FEMS Microbiol Ecology*. 2005; 52: 101-14.
8. Hoenick NA, Levin R. The implications of water quality in hemodialysis. *Semin Dial*. 2003; 16 (6): 492-7.
9. Hoenick NA, Ronco C, Levin R. The importance of water quality and haemodialysis fluid composition. *Blood Purif*. 2006; 24: 11-8.
10. Oie S, Kamiya A, Yoneda I, Uchiyama K, Tsuchida M, Takai K, et al. Microbial contamination of dialysate and its prevention in haemodialysis units. *J Hosp Infect*. 2003; 54: 115-9.
11. Pérez-García R, Rodríguez-Benitez POC. Why and how to monitor bacterial contamination of dialysate? *Nephrol Dial Transplant*. 2000; 15: 760-4.
12. Bugno A, Almodóvar, AAB, Pereira TC, Auricchio MT. Detecção de bactérias Gram-negativas não fermentadoras em água tratada para diálise. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2007; 66 (2): 172-5.
13. Lonnemann G. Assessment of the quality of dialysate. *Nephrol Dial Transplant*. 1998; 13 (suppl 5): 17-20.
14. van der Linde K, Lim BT, Rondeel JMM, Antonissen LPMT, de Jong GMT. Improved bacteriological surveillance of haemodialysis fluids: a comparison between Tryptic soy agar and Reasoner's 2A media. *Nephrol Dial Transplant*. 1999; 14, 2433-7.
15. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº154, de 15 de jun. 2004 (versão republicada em 31 de mai. 2006). Estabelece o Regulamento Técnico para funcionamento dos Serviços de Diálise. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, 31 mai. 2006. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=22875&word>.

16. Archibald LK, Khoi NN, Jarvis WR, Reller LB, Cam PD, Thu TA, et al. Pyrogenic reactions in hemodialysis patients, Hanoi, Vietnam. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2006; 27 (4): 424-6.
17. Reasoner DJ. Heterotrophic plate count methodology in the United States. *Int J Food Microbiol*. 2004; 92: 307-15.
18. Allen MJ, Edberg SC, Reasoner DJ. Heterotrophic plate count bacteria – what is their significance in drinking water? *Int J Food Microbiol*. 2004; 92: 265-74.
19. United States Pharmacopeia (US). The United States Pharmacopeia. 31 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention; 2008.
20. American Public Health Association (US). Standard Methods for the examination of Water and Wasterwater. Baltimore: United Book Press, Inc; 1998.
21. Carter JT, Rice EW, Buchberger SG, Lee Y. Relationships between levels of heterotrophic bacteria and water quality parameters in a drinking water distribution system. *Water Research*. 2000; 34 (5): 1495-502.
22. Uhl W, Schaule G. Establishment of HPC(R2A) for regrowth control in non-chlorinated distribution systems. *Int J Food Microbiol*. 2004; 92: 317-25.

Qualidade da água de bicas localizadas nos municípios de Santos e São Vicente, Estado de São Paulo, Brasil

Quality of water from spouts located in Santos and São Vicente municipalities, São Paulo state, Brazil

RIALA6/1214

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

*Endereço para correspondência: Seção de Bromatologia e Química, Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Regional de Santos

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

Seção de Bromatologia e Química, Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Regional de Santos

Recebido: 06.03.2009 – Aceito para publicação: 03.08.2009

RESUMO

A água oriunda das bicas geralmente não é tratada e requer atenção especial das autoridades sanitárias. Neste estudo foi avaliada a qualidade da água das bicas localizadas nos municípios de Santos e São Vicente, Estado de São Paulo. Em 2008, foram coletadas 31 amostras e foram analisadas quanto à presença de coliformes totais e termotolerantes, além das seguintes características físico-químicas: cloreto, cloro residual livre (nas águas tratadas), cor aparente, dureza, ferro, nitrato, nitrito, odor, pH, sólidos totais dissolvidos, sulfato e turbidez. Durante a coleta das amostras, foi aplicado um questionário ao usuário ou morador das proximidades da bica e esclarecido que não se tratava de fiscalização. Das 31 amostras analisadas, apenas seis foram aprovadas, de acordo com a Portaria 518/2004 do Ministério da Saúde. Foi detectada a presença de coliformes fecais em 13 amostras. O nitrato foi insatisfatório em 14 amostras, o pH em 12 e a cor aparente em uma amostra. Houve resistência de algumas pessoas em responder ao questionário, temerosos pelo fechamento das bicas e alegando que esse tipo de água ser melhor do que a tratada. O monitoramento constante da água de bicas pelas vigilâncias sanitárias municipais será de grande valia, bem como o estabelecimento de campanha entre os usuários para desmistificar essa questão cultural sobre a qualidade de água proveniente de bica.

Palavras-chave. água, bicas, qualidade, saúde pública, Santos, São Vicente.

ABSTRACT

The water coming from spouts is not usually treated, and requires special concern from health authorities. This study evaluated the quality of drinking water collected from spouts located in Santos and São Vicente municipalities, SP, Brazil. In 2008, 31 water samples were collected, and the total and thermotolerant coliforms, chloride, free residual chlorine (in treated water), apparent color, hardness, iron, nitrate, nitrite, odor, pH, total dissolved solids, sulfate and turbidity were assessed. During the sample collection, a water user and/or a person who lives nearby the spout were requested to answer a prepared questionnaire, explaining that it was for scientific research purpose. Of 31 analyzed samples, six only were in compliance with the Decree 518/2004 of the Brazilian Ministry of Health. The presence of fecal coliform in 13 samples was detected. Nitrate was unsatisfactory in 14, pH in 12, and one sample was inadequate on apparent color. Some persons did not agree in answering the questionnaire, as they were afraid of the spout could be closed off, and arguing that the water from spout is better than that treated one. A constant monitoring of water from spout by the Municipal Sanitary Surveillance should be a worthwhile action, and also to establish a campaign among the users to elucidate the misconception on this cultural issue about the quality of spout water.

Key words. water, spout, quality, public health, Santos Municipality, São Vicente Municipality.

INTRODUÇÃO

A água ocupa dois terços da superfície da Terra mas, só de 2,5 a 3,0% é doce e menos de 1,0% está disponível para consumo¹. O Brasil tem em torno de 12% das reservas de água doce disponível no planeta². É indispensável a todos os seres vivos, mas se estiver contaminada pode se tornar um problema de saúde pública, causando diarreias, infecções intestinais e outras doenças, podendo levar a óbito³.

Considerando que a potabilidade da água pode ser afetada pelas condições ambientais e ocupação humana desordenada, é necessário muitas vezes um tratamento³. O convencional inclui as etapas de coagulação, floculação, decantação, filtração, desinfecção e fluoretação, a fim de que a água assim tratada venha a atender às normas de qualidade para consumo humano^{4,5}.

Ressalte-se que em 1992 foi instituído no Estado de São Paulo o Programa de Vigilância da Qualidade da Água para o Consumo Humano – PROÁGUA⁶ pelo qual a Vigilância Sanitária dos municípios faz a coleta de amostras de água tratada ou não durante todo o ano e as encaminha para análise na rede de laboratórios do Instituto Adolfo Lutz (IAL).

A Portaria nº 518, de 25 de março de 2004, do Ministério da Saúde é o instrumento legal em vigor no Brasil para o controle da qualidade tanto da água tratada como das chamadas soluções alternativas de abastecimento de água para consumo humano, entre as quais acham-se as bicas^{7,8}.

Na referida legislação estão estabelecidos mais de 50 padrões de potabilidade para substâncias químicas que representam riscos à saúde humana, como fluoreto, nitrato, nitrito e cloro residual livre, além de 20 padrões de aceitação da água para consumo humano, entre os quais cloreto, cor aparente, dureza, ferro, odor, sólidos totais dissolvidos e turbidez⁷.

No que refere aos padrões microbiológicos de potabilidade, a legislação prevê apenas os parâmetros *Escherichia coli* ou coliformes termotolerantes e coliformes totais⁷.

O grande número de ensaios físico-químicos acima citados dificulta que sejam realizados na sua totalidade pelos laboratórios oficiais e privados para avaliar a qualidade das amostras de água destinadas ao consumo humano devido ao tempo que demandaria a sua execução e à capacidade técnica e de recursos humanos. Deste modo, alguns ensaios são priorizados em função dos programas ou por serem indicativos da qualidade

das águas, como ocorre nos serviços de rotina da Seção de Bromatologia e Química do Laboratório Regional de Santos do IAL. Ainda com respeito às bicas, estas em geral não sofrem tratamento e requerem atenção especial das autoridades sanitárias, visto que representam um risco potencial de contaminação⁵. É o caso da Região Metropolitana da Baixada Santista (RMBS), Estado de São Paulo, composta por nove municípios, com sede em Santos e uma população fixa superior a 1.600.000 habitantes, em 2007, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE⁹. Ressalte-se que aquele número duplica ou até triplica, principalmente na temporada de verão, devido a seu potencial turístico.

Deve ser destacado que o município-sede, com aproximadamente 420.000 moradores, tem cerca de 80 bicas, de acordo com informação da Seção de Vigilância Sanitária da Secretaria Municipal de Saúde (Sevisa), muitas delas localizadas nos morros. Ainda conforme a Sevisa, todas estão com as águas contaminadas, porém não as tem coletado para análise há muitos anos como parte do Programa PROÁGUA, por força de legislação ambiental^{5,10}.

Por sua vez, São Vicente, o segundo município mais populoso daquela região, com mais de 320.000 habitantes, possuía no ano de 2008 só cinco bicas cadastradas oficialmente pela Secretaria de Saúde. Entretanto, uma delas merece destaque por se tratar de um conhecido ponto turístico regional e nacional, devido entre outros fatores à suposta boa qualidade de suas águas, que é a Biquinha Padre Anchieta, localizada na área central. A propósito, a Vigilância Sanitária local tem coletado apenas amostra da mesma, como solução alternativa, inserido no PROÁGUA.

Mesmo demonstrada a importância do exposto, poucos levantamentos têm sido publicados sobre a qualidade das águas de bicas da RMBS e, mesmo assim, restritos ao município de Santos e realizados há muito tempo, como o da Cetesb, em 1978¹⁰.

No tocante ao levantamento feito pela Cetesb, foram coletadas 20 amostras, das quais apenas quatro tiveram resultado analítico satisfatório. Foi recomendada a desativação de sete bicas porque as amostras de suas águas foram reprovadas quanto à potabilidade e apresentarem difícil proteção sanitária¹⁰.

Com base no exposto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a potabilidade de águas de bicas localizadas nos municípios de Santos e São Vicente, Estado de São Paulo, em 2008.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas pela própria equipe, entre os meses de junho e setembro de 2008, 31 amostras de água de bicas, sendo 11 no município de São Vicente e 20 em Santos, conforme a Tabela 1.

O critério para a escolha das bicas foi a de maior demanda de usuários, com base em informações obtidas de levantamento realizado pela Cetesb¹⁰ junto às equipes da Seção de Vigilância Sanitária e à população dos referidos municípios.

Os pontos de coleta cujas amostras receberam os números 12, 13, 16, 21, 22, 24, 27, 28 e 30 fizeram parte do levantamento da Cetesb¹⁰, que envolveu 20 bicas. Não foi possível coletar amostras nas outras onze bicas, porque algumas acabaram sendo desativadas, outras não foram localizadas ou ainda pela proibição dos atuais proprietários das áreas onde elas se localizam.

As bicas correspondentes às amostras números 12, 13, 15, 17, 18, 29 e 31, localizadas em Santos, são consideradas soluções alternativas individuais pois se situam no interior de estabelecimentos comerciais, residências ou seminário, sem livre acesso ao público, enquanto que as demais são coletivas justamente pelo oposto. Por essa razão, o endereço completo das mesmas não consta na Tabela 1.

Por outro lado, as bicas cujas amostras estão identificadas pelos números 2, 3, 6, 7 e 9 eram as únicas cadastradas pela Seção de Vigilância Sanitária de São Vicente no ano de 2008.

Apenas duas bicas tinham suas águas tratadas com cloro ou derivados, de acordo com informação dos responsáveis, ou seja, as de números 6 e 29.

Foram determinados como parâmetros microbiológicos os coliformes totais e *Escherichia coli* pela técnica do substrato definido (Colilert), descrita na metodologia da APHA (2005)¹¹.

Os ensaios físico-químicos realizados em laboratório foram: cloreto, cloro residual livre (só nas águas tratadas), cor aparente, dureza, ferro, nitrato, nitrito, odor, pH, sulfato e turbidez, segundo as técnicas descritas pela Anvisa/MS (2005)¹².

Em campo, foi medido o teor de sólidos totais dissolvidos, com o uso de um condutivímetro portátil, seguindo o procedimento descrito no manual do aparelho.

No momento da coleta, foi aplicado um questionário a usuário presente no local ou morador das proximidades da bica, sem identificação do entrevistado com o esclarecimento de que não se tratava de fiscalização e sim de um monitoramento sanitário (Quadro 1).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total de 31 amostras, apenas 6 (19,4%) foram aprovadas, sendo 3 em Santos (amostras números 14, 15 e 31) e 3 em São Vicente (amostras 3, 8 e 11), tendo como base os padrões estabelecidos pela Portaria 518/2004 do Ministério da Saúde⁷.

Amostra Nº ___/2008

1. Idade: ___ anos.
 2. Sexo: ___ masc. ___ fem.
 3. Procedência: ___ morador do bairro ___ de outro bairro ___ turista
 4. Frequência de consumo: ___ diária ___ semanal ___ mensal ___ raramente
 5. Quantidade consumida ou transportada: _____
 6. Tem conhecimento da qualidade da água? ___ sim ___ não
- Obs.: _____

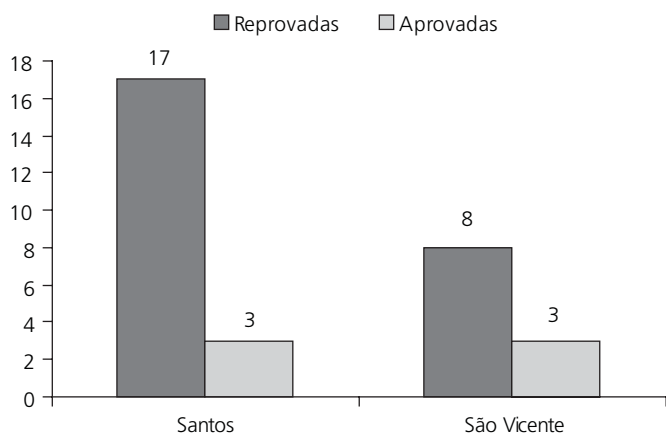
Quadro 1. Questionário aplicado junto aos usuários das águas de bicas.

Tabela 1. Localização das bicas (denominação da via pública e/ou nome popular da bica, bairro, tipo de imóvel, se particular) e data da coleta das amostras de água

Nº da amostra	Município	Localização	Data da coleta
1*	São Vicente	Sítio Itaquitanduva, Bairro Japuí	2/6/2008
2*	São Vicente	Rua Antonio Luiz Barreiros esquina R. Aviador Edu Chaves, Japuí	2/6/2008
3*	São Vicente	Bica N. Sra. de Lourdes, Itararé	2/6/2008
4*	São Vicente	Av. Manoel da Nóbrega, Itararé	2/6/2008
5*	São Vicente	Av. Tupiniquins, próxima à Ponte Pênsil	8/6/2008
6*	São Vicente	Biquinha Padre Anchieta, Centro	8/6/2008
7*	São Vicente	Bica Santa Tereza ou Cruzeiro, Vila Voturuá	19/6/2008
8*	São Vicente	Rua Francisco da Costa Pires, Vila São Jorge	19/6/2008
9*	São Vicente	Rua Antonio Luiz Barreiros, final, Japuí	1/7/2008
10*	São Vicente	Praia do Itaquitanduva, Japuí - Bica nº 1	17/9/2008
11*	São Vicente	Praia do Itaquitanduva, Japuí - Bica nº 2	17/9/2008
12	Santos	Marapé (comércio)	1/7/2008
13	Santos	Marapé (casas populares)	1/7/2008
14*	Santos	Subida do Morro do Marapé	16/7/2008
15	Santos	Marapé (casa)	16/7/2008
16*	Santos	Av. Nilo Peçanha, Marapé	16/7/2008
17	Santos	Marapé (casas populares)	16/7/2008
18	Santos	Valongo (casa e comércio)	24/7/2008
19*	Santos	Rua Nossa Senhora de Lourdes, Morro do Pacheco	30/7/2008
20*	Santos	Bica São Lucas, Morro do Pacheco	31/7/2008
21*	Santos	Bica do Morro Ilhéu Baixo, Bom Retiro	4/8/2008
22*	Santos	Bica Santa Edwiges, Caneleira	7/8/2008
23*	Santos	Rua Itanhaém, Chico de Paula	7/8/2008
24*	Santos	Bica do Sapo ou da Lavadeira, Morro da Nova Cintra	12/8/2008
25*	Santos	Rua 4, Morro do Pacheco	13/8/2008
26*	Santos	Rua Coronel Galhardo, Morro da Nova Cintra	21/8/2008
27*	Santos	Gruta Nossa Sra. de Lourdes, Morro da Nova Cintra	21/8/2008
28*	Santos	R. 1, Caminho Santa Maria, Morro da Nova Cintra	28/8/2008
29	Santos	Rua do Seminário, Morro da Nova Cintra - tanque 3	28/8/2008
30*	Santos	Bica do São Bento, Morro da Nova Cintra	28/8/2008
31	Santos	Rua do Seminário, Morro da Nova Cintra - nascente	10/9/2008

* Bicas de uso público

A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos em todos os parâmetros insatisfatórios e a Figura 1 o total de amostras aprovadas e reprovadas nos dois municípios amostrados.



Pode ser observado que, dos 13 parâmetros avaliados, seis foram reprovados em pelo menos uma das amostras (cloro residual livre, nitrato, pH, cor aparente, coliformes totais e coliformes fecais) e, por exclusão, os outros sete foram aprovados em todas.

Com relação aos ensaios microbiológicos, foi verificada a presença de coliformes fecais em 13 (41,9%) amostras, indicando que a água esteve em contato com dejetos animais, conforme mostra a Tabela 2. Embora as amostras nº 6 (Biquinha Padre Anchieta) e 29 (Rua do Seminário, tanque 3) fossem tratadas com cloro, a segunda apresentou coliformes totais, contrariando a legislação.

A amostra número 31 (Rua do Seminário, nascente) também apresentou coliformes totais e foi coletada no mesmo local da 29, porém como não sofre tratamento com cloro, é considerada satisfatória quanto ao ensaio em questão.

Já a amostra número 23 (bica da Rua Itanhaém) foi insatisfatória quanto à presença de coliformes fecais. Conforme pôde ser constatado pelos autores deste trabalho no momento da coleta da amostra, dois usuários coletavam água daquela bica e a transportavam em diversos galões de 20 litros numa camionete, declarando que a utilização da água ocorreria também na empresa em que trabalham.

Quanto às análises físico-químicas, cabe observar que o teor de cloro residual livre da amostra número 6 foi o mínimo exigido pela citada Portaria⁷ (0,2 mg/L), enquanto que o da amostra 29 correspondeu à metade desse valor, o que certamente facilitou a presença de coliformes totais.

Já o parâmetro nitrato revelou valores acima do limite máximo legal (10 mg/L) em 14 (45,2%) amostras, pressupondo que se encontravam contaminadas por despejos de esgotos, restos de animais ou águas de escoamento agrícola contendo fertilizantes nitrogenados¹³. Dentre elas inclui-se a amostra 6, coletada na Biquinha Padre Anchieta.

O pH revelou-se insatisfatório em 12 (38,7%) amostras, com todos os resultados abaixo do intervalo recomendado pela legislação (6,0 a 9,5), presumindo tendência corrosiva dessas águas^{10,14,15}. Uma delas foi novamente a de número 6, correspondente à Biquinha Padre Anchieta que, como já foi ressaltado, é um conhecido ponto turístico.

A par dos resultados verificados no presente monitoramento, as amostras de água daquela bica vêm apresentando resultados insatisfatórios quanto aos valores de cloro residual livre, nitrato, pH, coliformes totais e fecais dentro do Programa PROÁGUA, de acordo com os registros das análises efetuadas pelo Laboratório Regional de Santos do Instituto Adolfo Lutz nos anos de 2007 e 2008.

De acordo com informação da equipe de Vigilância Sanitária da Secretaria de Saúde de São Vicente, a responsabilidade pelo tratamento da água da mencionada bica é de uma empresa contratada pela Prefeitura Municipal.

Finalmente, a cor aparente foi discordante somente na amostra 10, tendo sido insatisfatória também para coliformes fecais.

A Figura 2 apresenta o número de amostras aprovadas e reprovadas de acordo com os parâmetros analisados.

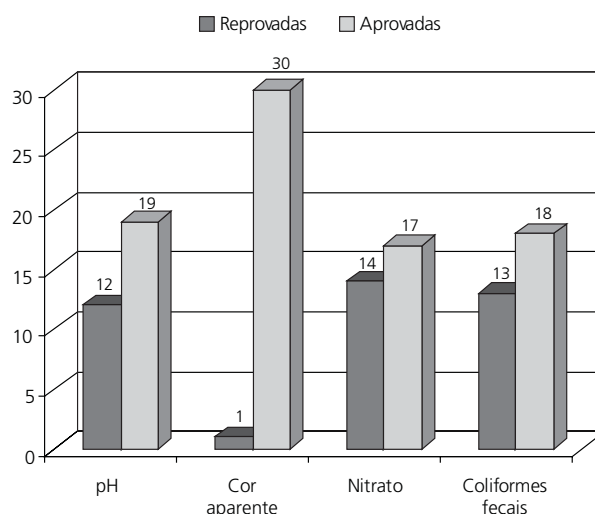


Figura 2. Total de amostras de água de bicas aprovadas e reprovadas de acordo com o parâmetro analisado.

Tabela 2. Análise das amostras de água de bicas dos municípios de Santos e São Vicente: resultados obtidos para os parâmetros insatisfatórios

Amostra nº	Município	CRL (mg/L)	pH	Cor aparente (Uhz)	Nitrato (mg/L)	Coliformes totais (N.M.P./100mL)	<i>Escherichia coli</i> (N.M.P./100mL)
1	São Vicente	N.T*	6,6	3,0	4,8	9,9	2,0
2	São Vicente	N.T*	6,7	4,3	3,0	>200,5	19,2
3	São Vicente	N.T*	6,3	2,2	4,4	7,5	zero
4	São Vicente	N.T*	5,5	1,7	7,0	>200,5	4,0
5	São Vicente	N.T*	6,2	5,5	1,0	>200,5	118,4
6**	São Vicente	0.2	5,6	2,4	17,2	zero	zero
7	São Vicente	N.T*	6,6	1,6	24,6	109,1	zero
8	São Vicente	N.T*	6,9	0,7	4,4	1,0	zero
9	São Vicente	N.T*	6,4	4,4	2,6	>200,5	28,8
10	São Vicente	N.T*	7,5	29	8,8	27,1	45,3
11	São Vicente	N.T*	6,2	3,0	6,6	>200,5	zero
12	Santos	N.T*	6,4	7,2	5,7	>200,5	83,1
13	Santos	N.T*	6,8	5,2	7,5	>200,5	45,3
14	Santos	N.T*	6,2	0,2	7,5	>200,5	zero
15	Santos	N.T*	6,1	0,1	9,2	45,3	zero
16	Santos	N.T*	5,9	8,5	10,6	42,9	zero
17	Santos	N.T*	6,0	2,1	24,6	144,5	113,7
18	Santos	N.T*	6,1	3,9	24,6	>200,5	zero
19	Santos	N.T*	5,9	0,7	26,8	9,9	zero
20	Santos	N.T*	5,8	2,9	33,9	36,4	zero
21	Santos	N.T*	5,5	3,9	9,3	zero	zero
22	Santos	N.T*	5,8	0,9	20,2	11,1	zero
23	Santos	N.T*	7,0	1,3	10,0	>200,5	11,1
24	Santos	N.T*	5,3	1,7	26,4	zero	zero
25	Santos	N.T*	6,2	11,8	36,5	>200,5	>200,5
26	Santos	N.T*	5,3	2,6	34,3	zero	zero
27	Santos	N.T*	5,3	1,8	38,6	zero	>200,5
28	Santos	N.T*	5,4	2,6	21,1	>200,5	>200,5
29**	Santos	0.1	7,0	3,0	5,3	101,3	zero
30	Santos	N.T*	5,0	2,5	47,5	zero	zero
31	Santos	N.T*	6,6	4,9	7,0	20,7	zero

N.T* = não tratada

** Tratada com cloro

N.M.P. = número mais provável

Parte destas bicas já havia apresentado a qualidade da água em discordância com a legislação em análises efetuadas no Laboratório Regional de Santos do Instituto Adolfo Lutz, em 1992 e 1993, e levantamento publicado pela Cetesb em 1978⁴.

No tocante ao levantamento acima citado, apenas a amostra de número 21 (Bica do Morro do Ilhéu Baixo) foi aprovada simultaneamente naquela ocasião e no presente monitoramento.

Cabe destacar que as bicas, cujas amostras correspondem aos números 12, 13 e 27, revelaram -se insatisfatórias em ambos os estudos pelo exame bacteriológico. Foi recomendada pela Cetesb, inclusive, a desativação da número 13, localizada em uma área de casas populares.

Por sua vez, as amostras de número 27 e 30 foram reprovadas nos dois trabalhos pelo teor de nitrato acima do limite máximo legal permitido, exigindo atenção especial.

Com relação ao questionário, houve resistência de alguns entrevistados em respondê-lo e até de permitir a coleta de amostras ou de fotografar as bicas, demonstrando temor de que fosse utilizado para seu fechamento, além de alegar que esse tipo de água é melhor do que a de abastecimento público, configurando uma questão cultural.

Outros usuários colaboraram de pronto por entender que o trabalho reverteria em benefício de sua própria saúde e dos familiares, afirmando não ter conhecimento da qualidade da água das bicas que se servem.

A maioria respondeu que consome diariamente a água das bicas próximas às suas residências, sendo que uma parte declarou que, além de bebê-la no local, coleta de um a 20 litros em garrafas ou galões plásticos e os transporta para consumo familiar.

Finalmente, no tocante a pelo menos duas bicas, correspondentes às amostras números 6 (Biquinha Padre Anchieta) e 23 (Rua Itanhaém, Chico de Paula), alguns usuários coletam e transportam de uma só vez diversos galões de 20 litros, declarando que a utilização da água seria feita nas residências e/ou nas empresas em que trabalham.

No caso da amostra número 12, cuja bica fica no interior de uma floricultura, uma funcionária informou que a água é usada apenas para regar as flores e limpar as instalações.

CONCLUSÃO

O parâmetro nitrato foi o que revelou mais resultados insatisfatórios, seguido pelos coliformes fecais e pH, indicando contaminação por dejetos animais, despejos de esgotos e tendência corrosiva das respectivas amostras.

Considerando principalmente os resultados acima citados, sugere-se um monitoramento constante da qualidade das águas de bicas por parte da Vigilância Sanitária nos municípios ora monitorados.

Tendo em vista a pouca receptividade de alguns usuários das águas de bicas ou moradores das proximidades durante a aplicação do questionário, faz-se necessário um melhor esclarecimento aos mesmos quanto à qualidade dessas águas por parte das autoridades competentes e dos meios de comunicação.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Sr. Carlos Roberto da Silva pela colaboração no preparo e lavagem do material necessário à execução da parte experimental e ao Sr. Marcos Tavares Santos pelo transporte das amostras.

REFERÊNCIAS

1. Branco, A. As torneiras estão secando. *Ecovias Revista*, ano IV, nº 18, p.3-5, 2004.
2. Movimento Nossa São Paulo. Reservas subterrâneas são alternativas para água limpa no Brasil. [<http://www.nossasaopaulo.org.br/portal/node/418>]. 23 de abril de 2009.
3. Organização Pan-Americana de Saúde – OPAS. Água e saúde. Washington, OPAS/OMS, 1999. 20p. (OPAS/HEP/99/40).
4. Batalha BHL, Parlatore AC. Controle da qualidade da água para consumo humano: bases conceituais e operacionais. São Paulo, CETESB, 1993. 198p.
5. Camacho K. Água, fonte de vida e de morte. [acesso em 28 de maio de 2008]. Disponível em: [http://www.multirio.rj.gov.br/sec21/chave_artigo.asp?cod_artigo=313]
6. São Paulo. Secretaria de Estado da Saúde. Resolução SS-45, de 31 de janeiro de 1992. Institui o Programa de Vigilância da Qualidade da Água para o Consumo Humano – PROÁGUA e aprova diretrizes para a sua implantação no âmbito da Secretaria da Saúde. *Diário Oficial*, São Paulo, SP, p. 27,01 de fev 1992, Seção 1.
7. Brasil Ministério da Saúde. Portaria nº 518 de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativas ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade e dão outras providências. *Diário*

- Oficial [da] república federativa do Brasil. Brasília, DF, p. 266-9, 26 de mar. 2004, Seção 1.
8. Razzolini MTP, Gunther WMR. Impactos na saúde das deficiências de acesso a água. *Saúde Soc.*, São Paulo, 17(1):21-32, 2008.
 9. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. [boletim da internet] Tabelas de Resultados: Tabela 1.1.20 – População recenseada e estimada, segundo os municípios – São Paulo 2007 [acesso em 22 de abril de 2009]. Disponível em: [<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/contagem2007/defaulttab.shtm>].
 10. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental – CETESB. Levantamento sanitário das bicas localizadas em Santos. São Paulo, CETESB, 1978. 121 p. (Relatório técnico, SENG/GAS/047/78).
 11. American Public Health Association – APHA. Standard methods for examination of water and wastewater. 21th ed, Baltimore: United Book Press, 2005.
 12. 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.
 13. Soto, FRM. et al. Monitoramento da qualidade da água de poços rasos de escolas públicas da zona rural do município de Ibiúna/SP: parâmetros microbiológicos, físico-químicos e fatores de risco ambiental. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*. 65(2):106-111, 2006.
 14. Química da água subterrânea. [acesso em 5 de setembro de 2008]. Disponível em: [<http://www.meioambiente.pro.br/agua/guia/quimica.htm>].
 15. 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&proj=sabesp&pub=T&db=&doci...>].

Iodoterapia: avaliação crítica de procedimentos de precaução e manuseio dos rejeitos radioativos

Iodotherapy: critical assessment of the precautionary and handling procedures of radioactive wastes

RIALA6/1215

Maria Lúcia RISSATO¹, Maria Lúcia RIBEIRO^{1*}, Neusa Regina Parras Simões de CASTRO¹, Marcus César Avezum Alves de CASTRO¹, Luciana Camargo OLIVEIRA¹

* Endereço para correspondência: Centro Universitário de Araraquara, UNIARA, Araraquara, SP, Brasil
Rua Carlos Gomes, 1338, CEP 14801-340 Araraquara, SP, Brasil. e-mail: mlucia@gmail.com
Centro Universitário de Araraquara, UNIARA, Araraquara, SP, Brasil
Recebido: 03.04.2009 – Aceito para publicação: 12.08.2009

RESUMO

Investigações sobre os procedimentos de precaução e manipulação dos rejeitos radioativos, gerados na iodoterapia, são muito pouco discutidas na literatura. A aplicação destes procedimentos de precaução, atendendo às normas da legislação vigente, depende diretamente do grau de conhecimento da equipe de enfermagem na manipulação do ¹³¹I, radioisótopo empregado na iodoterapia. Este trabalho apresenta uma avaliação crítica dos procedimentos de precaução e manipulação adotados pela equipe de enfermagem na terapêutica da iodoterapia utilizando um instrumento de análise, validado por um pré-teste e aplicado à equipe de enfermagem da unidade de internação da iodoterapia, em três hospitais (A, B - filantrópicos; C - privado), analisando: conhecimento específico da equipe de enfermagem e atendimento às normatizações. A análise comparativa mostrou significativa diferença dos procedimentos realizados na iodoterapia pela equipe de enfermagem nos hospitais estudados. Os procedimentos de precaução e a adequação da infra-estrutura na realização da terapêutica da iodoterapia dependem fundamentalmente da fiscalização dos órgãos competentes, do conhecimento específico e responsabilidade do profissional responsável pelo serviço de Medicina Nuclear, e do incentivo da direção do estabelecimento prestador de saúde.

Palavras-chave. iodoterapia, iodo-radioativo, rejeitos radioativos.

ABSTRACT: Investigations into the precautionary and handling procedures of radioactive wastes generated in iodotherapy have been little discussed in the literature. According to current legislation, the application of these precautionary procedures depends directly on the degree of knowledge of the nursing staff about how to handle ¹³¹I, the radioisotope used in iodotherapy. This paper presents a critical assessment of the precautionary and handling procedures adopted by iodotherapy nursing staff, using an instrument of analysis validated by a pretest and applied to the nursing team of the iodotherapy inpatient units of three hospitals (A, and B – public; C – private), analyzing the specific knowledge of the nursing staff and their observance of standards. A comparative analysis revealed significant differences in the iodotherapy procedures carried out by the nursing teams in the hospitals of this study. The precautionary procedures and the infrastructure's suitability for the application of iodotherapy depend essentially on the control of competent agencies, the specific knowledge and supervision of a healthcare professional responsible for Nuclear Medicine, and support from the top management of the healthcare provider.

Key words. iodotherapy, radioactive iodine, radioactive wastes.

INTRODUÇÃO

Os Resíduos de Serviço de Saúde (RSS), embora constituam cerca de 2% do volume total dos resíduos urbanos gerados, oferecem riscos de exposição, tanto aos trabalhadores da área da saúde quanto aos usuários, particularmente os resíduos infectantes e os rejeitos radioativos.¹

Os rejeitos radioativos, gerados pelos estabelecimentos prestadores de serviços de saúde, representam uma parte significativa de RSS, que não são degradáveis por processos químicos e físicos, resultantes do uso de substâncias radioativas não-seladas para fins terapêuticos, de diagnóstico e de pesquisa. A disposição final destes rejeitos em aterros ou em corpos hídricos oferece risco à saúde e ao meio ambiente.²

Uma terapêutica que gera rejeitos radioativos é a iodoterapia. A iodoterapia, terapêutica com o radioiodo, pode utilizar os isótopos radioativos do Iodo, o ¹²³I (por possuir tempo de meia-vida curto, porém com elevado custo) e o ¹³¹I. Embora utilizada há cerca de 50 anos, é uma terapêutica pouco divulgada, sendo capaz de tratar desde patologias benignas com alterações da função tireoideana como o hipertireoidismo até patologias neoplásicas, como o carcinoma diferenciado da tireóide, tanto em adultos como em crianças.³

Essa terapêutica pode ser realizada tanto em ambulatório, quando o paciente recebe a dose radioativa na unidade de medicina nuclear, sendo orientado para ficar em isolamento no seu domicílio, quanto em unidade de internação hospitalar. O requisito básico que justifica a internação é a aplicação do ¹³¹I com atividade acima de 1,11 Gigabecquerel (Gq) (30 milicurie), conforme norma estabelecida pela Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN-NE-3.05./96).⁴ Esta resolução, publicada no D.O.U. de 19/04/1996, estabelece requisitos de radioproteção e segurança para os serviços de medicina nuclear, tendo aplicabilidade às atividades relativas ao uso de radiofarmacos para fins terapêuticos e diagnósticos *in vivo* no campo da medicina nuclear.

As normas que regem a biossegurança do elemento ¹³¹I devem ser consideradas quanto às precauções e procedimentos utilizados pelos Enfermeiros, Técnicos de Enfermagem e Auxiliar de Enfermagem, integrantes da equipe de enfermagem que atuam diretamente na unidade de internação, durante 24 horas.⁴

A equipe de enfermagem desempenha papel fundamental no tratamento do paciente submetido à iodoterapia, pois é responsável pelo preparo do quarto

que antecede a internação do paciente, pela orientação quanto aos protocolos e precauções durante a internação, pelo gerenciamento dos rejeitos radioativos após a alta, além de amenizar o medo e a ansiedade expressos pelo paciente que irá permanecer internado e isolado de visitas: a humanização da assistência de enfermagem torna-se um fator bastante colaborativo para que o paciente sinta-se bem durante a internação. Embora este paciente esteja relativamente em boas condições de saúde, ele está suprido de sua reposição hormonal, (supressão necessária para a realização da iodoterapia), podendo encontrar-se letárgico, sonolento, deprimido e, portanto, com certa dificuldade de assimilar informações. Por isso, o profissional da enfermagem deve detalhar as orientações e reforçá-las sempre que necessário.³

Investigações sobre os procedimentos de precaução e manipulação dos rejeitos radioativos, gerados na iodoterapia, são muito pouco discutidas na literatura.^{3,5} Estes autores alertam para a importância das ações da equipe de enfermagem, tanto nas precauções e gerenciamento, quanto ao processo de decaimento e destino dos rejeitos radioativos gerados no período de internação.

A aplicação destes procedimentos de precaução, atendendo às normas da legislação vigente, depende diretamente do grau de conhecimento da equipe de enfermagem na manipulação do ¹³¹I, radioisótopo empregado na iodoterapia.

Os trabalhos registrados na literatura vêm discutindo, principalmente, questões referentes à terapêutica da iodoterapia, tais como: eficácia da dose, complicações após utilização de altas doses, exposição radioativa do paciente após a terapia, efetividade da meia-vida do ¹³¹I, exposição de familiares, especialmente crianças e gestantes, quando a terapêutica é realizada com baixas doses e o paciente permanece isolado em sua residência^{6,7,8,9,10,11}. Nos estudos brasileiros, a eficácia do tratamento no câncer diferenciado da tireóide (CDT), também é o foco principal. Nascimento¹² trabalhou a questão da biocinética e a dosimetria citogenética e Antonucci¹³ desenvolveu um protocolo para avaliar eficiência da terapêutica com ¹³¹I.

Outros estudos discutem a geração de rejeitos radioativos nas Universidades; propostas de gerenciamento destes materiais, particularmente o processo de decaimento, e evidenciam que há uma séria preocupação com este tema.¹⁴

Considerando a importância do conhecimento específico da equipe de enfermagem no gerenciamento da iodoterapia em unidades hospitalares, o número restrito

de investigações sobre este tema, o risco carcinogênico direto ou indireto da manipulação de elementos radioativos sobre a saúde e o ambiente, este trabalho tem como objetivo investigar os procedimentos utilizados, na iodoterapia, durante o período de internação e alta hospitalar, em três hospitais, e compará-los com as exigências e recomendações vigentes.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido em hospitais de grande porte do Estado de São Paulo que realizam a iodoterapia. Dos oito hospitais contatados, três (A, B e C) concordaram em participar da pesquisa.

■ **Elaboração e aplicação do instrumento de análise**

Com a finalidade de estruturar a coleta de dados nos hospitais, e avaliar o grau de conhecimento dos profissionais envolvidos na manipulação dos rejeitos do ^{131}I , frente às normas e resoluções vigentes, foi elaborado um questionário para ser aplicado aos integrantes da equipe de enfermagem da unidade de internação da iodoterapia.

Este instrumento de análise, elaborado com base nos procedimentos normativos definidos nas Legislações CNEN-NE-3.01 janeiro/2005¹⁵, CNEN-NE-3.05 março/1996⁴ e CNEN-NE-6.05 outubro/1985¹⁶, Andrade (1997)¹⁷ e em conhecimentos científicos da atividade física do ^{131}I , foi validado com aplicação de um pré-teste, visando avaliar a sua aplicabilidade e permitir ajustes e alterações necessárias.

Os aspectos abordados no instrumento são:

- formação profissional da equipe de enfermagem,
- tempo de serviço,
- compreensão dos conceitos de contaminação e irradiação,
- procedimentos de preparo do quarto de internação antes, durante e após a iodoterapia,
- vias de eliminação dos rejeitos,
- adequações das instalações intra-hospitalares, principalmente quanto cumprimento das medidas relacionadas ao decaimento dos rejeitos radioativos gerados durante o período de internação.

Os questionários foram distribuídos pelo enfermeiro chefe à equipe de enfermagem de cada hospital, compreendendo 11 enfermeiros, 23 técnicos de enfermagem e 18 auxiliares de enfermagem.

Os participantes da pesquisa responderam ao questionário sem informações prévias, para que as respostas retratassem o real conhecimento da equipe de enfermagem.

■ **Tratamento e análise dos dados**

O tratamento dos dados foi realizado por categoria da equipe de enfermagem, por unidade hospitalar, determinando-se o perfil de cada hospital, comparando os procedimentos adotados com as normatizações CNEN-NE, especialmente quanto ao processo para decaimento dos rejeitos radioativos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em uma recente e detalhada revisão bibliográfica, sobre os riscos de resíduos de serviços de saúde, Takayanagui et al¹⁸ (2005), relatam apenas duas investigações sobre rejeitos radioativos, mostrando a necessidade de levantamento de dados científicos sobre este tema. Assim, analisar os procedimentos de precaução e manuseio de rejeitos radioativos adotados pela equipe de saúde de unidades hospitalares que aplicam a iodoterapia é de fundamental importância para a proteção da equipe de saúde e do meio ambiente.

■ **Caracterização dos hospitais**

A área da iodoterapia de cada unidade hospitalar foi caracterizada pelo número de quartos, número de leitos, local para aplicação da dose, itens de adequação às normatizações e destino dos rejeitos radioativos, como mostra o Quadro 1.

O Hospital A, filantrópico, atende parcialmente às exigências legais do CNEN-NE, no preparo do quarto: os materiais de revestimento (plásticos) utilizados não protegem os pontos de risco por não terem espessura segura e não serem adequadamente fixados, não reveste a mesa, poltrona, telefone. É preciso ressaltar, entretanto, que a referida norma não especifica a espessura adequada do plástico a ser empregado, podendo suscitar interpretações controversas. Esta instituição não realiza a etapa do decaimento dos rejeitos radioativos.

O Hospital B, também filantrópico, atende às exigências legais no preparo do quarto, tanto na qualidade dos materiais empregados quanto na técnica de fixação dos mesmos nos pontos de riscos, que determinam a proteção radiológica do ambiente de internação, ressaltando-se o registro do monitoramento da taxa de exposição diária

Quadro 1 . Caracterização dos Hospitais pelo número de quartos, número de leitos, local para aplicação da dose, itens de adequação às normatizações e destino dos rejeitos radioativos.

ÁREA	HOSPITAL - A	HOSPITAL - B	HOSPITAL - C
Capacidade	220 Leitos	200 Leitos	200 Leitos
Local de Manipulação do ¹³¹ I	Unidade Medicina Nuclear Manipulação segue normatizações	Unidade Medicina Nuclear Manipulação segue normatizações	Unidade Medicina Nuclear Manipulação segue normatizações
Classificação do Hospital	Fundação, Filantrópico Oncológico	Fundação, Filantrópico Oncológico	Privado Geral
Área da iodoterapia	Quarto de internação dentro da Unidade de Clínica Médica	Quarto de Internação dentro da Unidade de Clínica Médica	Quarto de Internação dentro da Unidade de Clínica Médica
Nº de Quartos	01	02	01
Nº de Leitos	02/quarto	02/quarto- 04 leitos	01/quarto
Aplicação da dose	Quarto de Internação	Quarto de Internação	Quarto de Internação
Área do quarto de iodoterapia	* Atende os quesitos para internação, de maneira insatisfatória, conforme normatização CNEN-3.05/96	Atende todos os quesitos para internação, conforme normatização CNEN- 3.05/96	Atende todos os quesitos, com padrão de sofisticação para internação, acima das exigências normatizadas pelo CNEN - 3.05/96
Identificação na porta do quarto	Atende a normatização CNEN-3.05/96, parcialmente, possui na identificação da porta do quarto apenas o, Nome e telefone do médico da medicina nuclear, no momento estavam sem o físico no serviço. Não indica, data de internação e medidas de exposição diária	Atende a normatização CNEN-3.05/96 (Nome e telefone do médico e do físico da medicina nuclear, data de internação e medidas de exposição diária)	Atende a normatização CNEN-3.05/96 (Nome e telefone do médico e do físico da medicina nuclear, data de internação e medidas de exposição diária)
Biombo de chumbo	Hospital possui	Hospital possui	Hospital possui
Serviço de Nutrição e Dietética.	Dieta acondicionada em recipientes descartáveis. Os restos alimentares, jogados no contêiner de lixo, com emblema de infectante, retirados após a alta	Dieta acondicionada em recipientes descartáveis. Os restos alimentares, jogados no contêiner de lixo, com emblema de rejeito radioativo, retirados após alta	Dieta acondicionada em recipientes descartáveis, restos alimentares, jogados no contêiner de lixo, com emblema de rejeito Radioativo, retirados diariamente
Roupas de cama e banho	Trocadas após a alta	Trocadas após a alta	Trocadas após a alta
Processo de decaimento	Esta etapa não é realizada	Realiza, e está em fase de construção de nova área física	Realiza com segurança

*A normatização CNEN- 3.05/96 exige: paredes dos quartos baritadas, presença de biombo de chumbo no seu interior; colocação de plásticos nos locais que o paciente poderá tocar (locais de risco); poltronas e mesas revestidas de plástico; banheiro individualizado; aviso com os dizeres "Dar descarga cinco vezes após o uso", acima da válvula de descarga; coleta seletiva dos rejeitos realizada diariamente; identificação do médico e do físico da medicina nuclear na porta do quarto; utilização de EPIS(avental e colar cervical de chumbo, luvas de procedimentos, máscara e óculos), pelos funcionários que entrarem em contato com o ambiente.

fixado no lado externo da porta do quarto. O processo de decaimento após a alta do paciente é realizado em área externa do hospital o que implica em uma etapa adicional de transporte do rejeito radioativo. O Hospital C, privado, também atende às exigências legais, com maior grau de precaução no que se refere ao revestimento das áreas de risco. Quanto aos rejeitos radioativos, realiza coleta diariamente, transportando para a área de decaimento, conforme estabelece a legislação pertinente.

Estes dados sugerem que a situação econômica da unidade hospitalar não é, necessariamente, o fator primordial no gerenciamento dos rejeitos radioativos.

Conhecimento de medicina nuclear pela equipe de enfermagem

Nenhum dos funcionários, da equipe de enfermagem (52 sujeitos) dos três hospitais recebeu noções básicas de medicina nuclear e sua aplicabilidade terapêutica, durante a sua formação profissional, como previsto na Legislação do Ensino Superior 2001, Resolução nº 3 de 07 de novembro de 2001, Diretrizes Curriculares Nacionais dos Cursos de Graduação de Enfermagem, Medicina e Nutrição. Portanto, faz-se necessário que a instituição contratante promova a complementação teórico-prática, sobre conhecimento específico de medicina nuclear aplicada à iodoterapia, aos funcionários de enfermagem que trabalham nesse setor, de modo a garantir a qualidade e segurança das atividades que desenvolvem diariamente.

As respostas referentes ao treinamento dos profissionais no momento da admissão mostraram que apenas o Hospital C realiza treinamentos específicos e periódicos na atividade de iodoterapia.

Davenport¹⁹ mostra que o caráter filantrópico de Hospitais pode determinar as dificuldades na implantação de um serviço de treinamento e educação continuada, porém, a visão administrativa, com enfoque nas atividades desenvolvidas no atendimento hospitalar, deve prover ações seguras, tanto aos seus funcionários como também aos usuários.

O objetivo de ações seguras é minimizar problemas decorrentes de cuidados prestados por profissionais não preparados, por falta de informações técnicas-específicas, refletindo diretamente na credibilidade e nos custos da instituição, como discutido por Campos²⁰. Portanto, o programa de treinamento continuado deve ser implantado nos Hospitais A e B, permitindo segurança aos seus funcionários, usuários e meio ambiente.

Assim, quando a relação entre tempo de serviço e conhecimento específico foi avaliada, 100% dos

funcionários do Hospital C têm conhecimento específico de medicina nuclear, consequência do treinamento continuado. Nos hospitais A e B, a situação é distinta e independe do tempo de serviço, pois cerca de 80 e 50% dos seus funcionários, respectivamente, apresentam conceitos contraditórios quanto aos conhecimentos específicos de medicina nuclear aplicados a iodoterapia.

Estes dados mostraram que o tempo de atividade profissional não é o fator determinante para adquirir conhecimento específico. Assim, a transmissão de conceitos errôneos entre a equipe de enfermagem, durante as atividades diárias, devida à falta de treinamento, pode gerar procedimentos inadequados, como por exemplo, contaminações acidentais. A correção desses problemas, em consequência, pode envolver custos e tempo adicional nas atividades.

A implantação de um programa de educação continuada, nos Hospitais A e B, com embasamento técnico, é considerada uma exigência legal, como prevê a resolução SS nº 625.²¹

Thompson⁵ ressalta a importância do treinamento dos profissionais envolvidos nas atividades de radiação, alertando que instruções que garantam segurança para a equipe de enfermagem que trabalha na terapêutica com ¹³¹I é determinante na contaminação resultante desta terapia. O autor sugere também a elaboração de manuais e vídeos como referências educacionais para que fiquem permanentemente disponíveis no posto de enfermagem na unidade de internação.

Confirmando a importância dessa sugestão, recentemente os hospitais foram contemplados com o programa de Acreditação Hospitalar, a nível I, II e III, que é um sistema de certificação, independente, visando verificar e reconhecer a verdadeira implantação de métodos de gestão focados na melhoria da qualidade da assistência aos pacientes e aos usuários dos serviços de saúde. É um processo voluntário, educativo, sem caráter fiscalizatório, voltado para criar nas organizações a cultura da qualidade do atendimento ao paciente, da gestão atualizada e da busca constante da produtividade²².

■ Conceito de irradiação e contaminação

De modo geral, verificou-se contradição no conceito de irradiação (exposição a qualquer fonte de irradiação), entretanto, exposição e presença indesejada foram respondidas simultaneamente como conceitos corretos. No Hospital A, 60% dos enfermeiros, 84% dos técnicos de enfermagem e 30% dos auxiliares de enfermagem,

definiram corretamente irradiação: exposição a qualquer fonte de radiação. Deve-se ressaltar que 57% dos auxiliares de enfermagem responderam às duas alternativas simultaneamente (exposição e presença indesejada).

Nos Hospitais B e C, 100% das três categorias (enfermeiros, técnicos e auxiliares de enfermagem), demonstraram possuir o conceito correto do termo irradiação.

No Hospital A, quanto ao conceito específico de contaminação (presença indesejada de material radioativo), 60% dos enfermeiros, 53% dos técnicos de enfermagem e 45% dos auxiliares de enfermagem, demonstraram conhecer o conceito correto, concordando que contaminação corresponda à presença de material radioativo, mas repete-se a confusão de conceitos, uma vez que 40% dos técnicos e 48% dos auxiliares responderam as duas alternativas ao mesmo tempo e, 7% dos técnicos e 7% dos auxiliares demonstraram desconhecer o conceito de contaminação.

No Hospital B, 100% dos enfermeiros e 75% dos técnicos demonstraram conhecer o conceito correto de contaminação. No Hospital C, 100% da equipe da enfermagem demonstraram conhecer o conceito correto de contaminação, consequência do programa de treinamento continuado.

A presença de um profissional superior de radioproteção, como previsto em legislação, no serviço de medicina nuclear nas unidades hospitalares, foi importante para o conhecimento correto dos conceitos. No Hospital A, além de não possuírem treinamento específico, no momento da pesquisa constatou-se a falta do profissional superior de radioproteção no serviço. No Hospital B, o bom índice de conhecimento está relacionado à presença de um físico que orienta oralmente a equipe de

enfermagem. Assim sendo a necessidade de implantação de um programa de treinamento continuado é mais uma vez confirmada, como prevê a resolução SS nº 625²¹.

■ Proteção contra a irradiação

No aspecto proteção contra a irradiação emitida pelo paciente durante o período de internação, foram abordados: elementos e EPIs, que realmente dão proteção contra a irradiação (Grupo 1); aparelho utilizado para quantificar a radiação recebida pelo profissional na sua jornada de trabalho (Grupo 2); EPIs que não protegem contra a radiação (Grupo 3), conforme o Quadro 2.

Contradição de conceitos entre proteção e monitoramento foi observada no Hospital A. Nos Hospitais B e C, todos os funcionários da enfermagem, concordam que os elementos do Grupo 1 dão proteção contra a irradiação; o elemento do Grupo 2 apenas mede as radiações recebidas e, os itens do Grupo 3 não fornecem proteção, como descrito nas normatizações de precauções nacionais e ressaltadas por Thompson⁵ com base na legislação internacional²³.

Os dados referentes à proteção contra a contaminação mostraram que nos Hospitais B e C, todos os funcionários da enfermagem, possuem conhecimento deste conceito, enquanto, no Hospital A apenas os enfermeiros responsáveis tem esclarecimento deste conceito, indicando a falta de transmissão de informações corretas para sua equipe.

■ Vias de eliminação do ¹³¹I pelo paciente

As vias de eliminação (urina, saliva, suor e fezes) dos rejeitos radioativos do I¹³¹ gerados pelo paciente,^{5,24} durante o período de internação, são conhecidas pelas equipes de enfermagem dos três hospitais.

Quadro 2. Conhecimento sobre itens de proteção contra a contaminação.

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Blindagem nas paredes do quarto Menor tempo presente no quarto com o paciente Biombo Blindado Avental de chumbo Colar cervical de chumbo Óculos de proteção individual	Utilização de Dosímetro	Avental de tecido Luvas de procedimentos Propés Forrações

O destino dos rejeitos radioativos gerados pelas fezes e urina é a rede de esgoto, e este lançamento só pode ocorrer se o município possuir estação de tratamento de esgoto (CNEN-NE-3.05), como é o caso dos municípios onde estão localizados os hospitais estudados. Embora a maior eliminação seja pela urina (aproximadamente 80%), suor e saliva geram rejeitos suficientes para contaminar o ambiente onde o paciente permanece durante a terapêutica.

■ Preparo do quarto utilizado para a internação

Em relação ao preparo do ambiente em que ficará o paciente durante o período de internação, foram investigados os seguintes itens: biombo blindado; sinalização do ambiente com o símbolo do resíduo radioativo, proteção no interruptor de luz, nas maçanetas, nas campainhas, na torneira, na saboneteira, no botão de descarga, no porta papel, na tampa do vaso sanitário, que estão previstos nas normatizações CNEN-NE. Os Hospitais B e C cumprem as normas previstas para a proteção do local de internação do paciente, enquanto o hospital A atende apenas parcialmente. É importante ressaltar que a legislação não aclara em definitivo o assunto referente à utilização e fixação adequada dos materiais de proteção, permitindo diferentes interpretações pelo administrador da área da medicina nuclear da unidade hospitalar: não está especificada a espessura, a margem de segurança na fixação dos plásticos nos pontos de riscos. No entanto, deve ficar claro que o plástico deve proteger os locais com uma margem de segurança que não permita a exposição dos mesmos, sendo fixado com fita adesiva, impedindo o seu deslocamento espontâneo, minimizando assim a contaminação individual e do ambiente.⁵

■ Orientação dos pacientes antes e durante o período de internação

Os resultados mostrados na Tabela 1 indicam o percentual de orientação fornecida ao paciente antes e durante o período de internação. No Hospital A, a equipe de enfermagem não orienta adequadamente o paciente, podendo ter consequências prejudiciais tanto para o paciente quanto para o ambiente. A orientação parcial realizada pelo Hospital B mostra discordância no entendimento dos procedimentos da terapêutica. No Hospital C, o programa de treinamento e de educação continuada permite que os funcionários da equipe de enfermagem realizem corretamente as orientações da iodoterapia.

■ Conhecimento da existência das normatizações CNEN-NE

Toda a equipe de enfermagem do hospital C conhece as normatizações previstas na CNEN-NE. No entanto, isso não ocorre nos hospitais A e B, podendo-se inferir que o programa de treinamento continuado presente no hospital C é o fator preponderante para constante atualização e conhecimento dos funcionários envolvidos na terapêutica.

■ Síntese dos principais resultados

Este estudo analisou criticamente o cenário da iodoterapia em três hospitais do Estado de São Paulo, focando: conhecimento específico da equipe de enfermagem e o atendimento às normatizações. O Quadro 4 representa um resumo geral dos principais resultados obtidos.

A análise comparativa mostrou significativa diferença dos procedimentos realizados na iodoterapia pela equipe de enfermagem nos Hospitais A e B (filantrópicos), e C (privado). O Hospital C atende com rigor as

Tabela 4. Síntese dos principais resultados obtidos nos Hospitais estudados.

Hospital	Atendimento às normatizações	Conhecimento específico de radioatividade pela equipe de enfermagem	Programa de treinamento
Hospital A (filantrópico)	Não	Não possui	Não
Hospital B (filantrópico)	Sim	Parcial	Não
Hospital C (privado)	Sim, com padrão de sofisticação	Possui	Possui

normatizações podendo-se inferir que tal sistemática é consequência não apenas das condições econômicas, mas também da filosofia de atender com qualidade; o Hospital B que é filantrópico também atende as normatizações com materiais seguros, particularmente na proteção dos pontos de risco, entretanto o Hospital A, na mesma condição de filantrópico, não atende satisfatoriamente as normatizações, demonstrando a necessidade de rever os procedimentos adotados durante a iodoterapia e a adequação com as normatizações.

CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho sugerem que os procedimentos de precaução e a adequação da infraestrutura na realização da terapêutica da iodoterapia dependem fundamentalmente da fiscalização dos órgãos competentes, do conhecimento específico e responsabilidade do profissional responsável pelo serviço de Medicina Nuclear, e do Incentivo da direção do estabelecimento prestador de saúde.

Tabela 1. Percentual de orientação fornecida ao paciente antes e durante o período de internação, pelas diferentes categorias da equipe de enfermagem.

	Enfermeiros			T. de Enfermagem			Auxiliares de Enfermagem		
	Hosp. A	Hosp. B	Hosp. C	Hosp. A	Hosp. B	Hosp. C	Hosp. A	Hosp. B*	Hosp. C
Ingerir de 04 a 05 litros de líquido/dia.	100	100	100	38,4	100	100	42,8	-	100
Permanecer atrás do biombo na presença de funcionários ou visitas.	100	100	100	38,4	100	100	50	-	100
Tocar somente onde houver proteção.	20	80	100	23	80	100	21,4	-	100
Jogar o papel higiênico no vaso sanitário.	23	5	100	15	62	100	21,4	-	100
Jogar papel higiênico no cesto do banheiro.	77	25	-	85	8	-	78,6	-	-
Utilizar o descarte de lixo devidamente identificado.	100	100	100	15,3	100	100	28,5	-	100
Não sair do quarto durante a internação.	100	100	100	100	-	100	100	-	100
Não urinar no box.	80	100	100	30	100	100	25	-	100

* Hospital B não possui Auxiliar de Enfermagem na iodoterapia.

REFERÊNCIAS

1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Manual de gerenciamento de resíduos de serviços de saúde / Ministério da Saúde – Brasília: Ministério da Saúde, 2006.
2. Almeida CEB. Apostila educativa Radiações Ionizantes e a vida. Disponível em: <http://www.cnem.gov.br>. (acessado em 21.ago.2008).
3. Mateus L. A importância da Enfermagem no Tratamento com Iodo Radioativo. *Rev. Nursing*. 2000; 25: 6-8.
4. Conselho nacional de energia nuclear. Norma de Requisitos de Radioproteção e Segurança para Serviços de Medicina Nuclear – NE-3.05. CNEN. 1996.
5. Thompson MA. Radiation Safety Precautions in the Management of the Hospitalized ^{131}I Therapy Patient, *J Nucl Med Technol*. 2001; 29: 61-6.
6. Maxon HR. Efeitos da radioiodoterapia nas gerações futuras de mulheres com carcinoma diferenciado de tireóide. *Rev. Bras. Radioiodoterapia*. 2004; 37: 51-5.
7. Mohammadi H. Radiation Exposure Rate From ^{131}I -Treated Hyperthyroid Patients – A Dynamic Study, With Data for Up To 42 D Post Therapy. *Health Phys*. 2005; 88: 100-11.
8. North DL. Effective Hal-life of ^{131}I in Thyroid Cancer Patients Providence. *Health Phys*. 2001; 81: 60-5.
9. Rutar FJ. Outpatient Treatment with ^{131}I -Anti-B1 Antibody: Radiation Exposure to Family Members Omaha. *J Med Nucl*. 2001; 42: 907-15.
10. Cosendey CH., Souza SR. *Enfermagem Médico-Cirúrgica*. Rio de Janeiro: Reichmann&Affonso; 2004.
11. Vidal L. Determinant factors of thyroid function out come in patients with graves'disease after radiodine therapy. [acesso em 13 de abril de 2006]. Disponível em: <http://www.geocities.com/trabalhosmrdocina/hipotireoidismo.ppt>.
12. Nascimento ACH. Análise biocinética do Iodo-131 e dosimetria citogenética após administração de radionuclídeo para o tratamento do câncer de tireóide [dissertação de mestrado]. Rio de Janeiro: Instituto de Biociências Nucleares, Universidade do Estado do Rio de Janeiro; 1996. 117 pp.
13. Antonucci JB. Terapêutica do Câncer diferenciado da tireóide com ^{131}I Análise de Resultados. [dissertação de mestrado]. Rio de Janeiro: Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro; 1992.
14. Machado AMR. Plano de radioproteção, Implantação de um sistema de Radioproteção e de Gerenciamento de Resíduos Radioativos. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos; 2005.
15. Conselho Nacional de Energia Nuclear – CONEN. Norma de Diretrizes Básicas de Proteção Radiológica – NE- 3.01, CNEN, 01/2005.
16. Conselho Nacional de Energia Nuclear – CONEN. Norma de Gerência de Rejeitos Radioativos em Instalações radioativas- NE-6.05, CNEN, 10/1985.
17. Andrade JBL. Análise do fluxo e das características físicas, químicas e microbiológicas dos resíduos de serviços de saúde: proposta de metodologia para o gerenciamento em unidades hospitalares. 1997, 208p. [Tese de doutorado] Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 1997. 208 p.
18. Takayanagui AMM, Lopes TM, Segura-Muñoz S. El conocimiento sobre el grado de riesgo de residuos de servicios de salud obtenido a partir de una revisión sistemática de literatura. In: Congreso y Exposición Mundial - ISWA 2005-, 2005, Bueno Aires. Congreso y Exposición Mundial “ ISWA 2005” : Hacia un sistema integral de gestión de residuos sólidos urbanos., 2005. p. 48-8.
19. Davenport TO. O capital humano: o que é e por que as pessoas investem nele. São Paulo: Editora Nobel; 2001.
20. Campos VF. Gerenciamento da rotina do trabalho do dia-a-dia. Belo Horizonte: Editora de Desenvolvimento Gerencial; 1998.
21. São Paulo. Secretaria de Estado da Saúde. Resolução SS-625, de 14-12-94. Aprova norma técnica que dispõe sobre o Uso, Posse e Armazenamento de Fontes de Radiação Ionizante. no âmbito do Estado de São Paulo. [acesso em 17 de abril de 2007]. Disponível em: <http://fosjs.unesp.br/radiologia/legislaçaoiaox/resoluçao/%20SS-625-1-1994>.
22. ONA - Manual Brasileiro de Acreditação Hospitalar. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Avaliação de Políticas de Saúde. 104p, 2006.
23. Internacional Commission on Radiological Protection – ICRP. Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. Report 60, ICRP Publications. Elmsford, NY , Pergamon Press, 1990.
24. Willegaignon J. ^{131}I effective Half-Life(T_{eff}) for Patients with Thyroid Cancer. *Health Phys*. 2006; 91: 20-4.

O desinfetante hipoclorito de sódio como barreira sanitária: condições de atividade frente a *Staphylococcus aureus* isolados em alimentos envolvidos em surtos de toxinfecções alimentares

The disinfectant sodium hypochlorite as a sanitary barrier: activity conditions against *Staphylococcus aureus* isolated from foods implicated in foodborne disease outbreaks

RIALA6/1216

Jane Mari Corrêa BOTH¹, Solange Mendes LONGARAY¹, César Augusto Marchionatti AVANCINI^{2*}

*Endereço para correspondência: Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Av. Bento Gonçalves, 9.090. Bairro Agronomia. CEP 91540-000. Porto Alegre, RS, Brasil.

e-mail: cesar.avancini@ufrgs.br

¹Seção de Microbiologia de Alimentos, Instituto de Pesquisas Biológicas - Laboratório Central de Saúde Pública, Secretaria da Saúde do Estado do Rio Grande do Sul (IPB-LACEN/SES/RS), Porto Alegre, RS, Brasil.

²Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil

Recebido: 28.05.2009 – Aceito para publicação: 25.08.2009

RESUMO

Para monitorar a eficácia do desinfetante hipoclorito de sódio como barreira sanitária, foi avaliada a atividade frente a 32 isolados de *Staphylococcus aureus* obtidos, no IPB-LACEN/RS, em alimentos envolvidos em surtos de toxinfecções alimentares. Foi usado o teste de suspensão com o seguinte delineamento: solução com 200 ppm de cloro livre na ausência e presença de matéria orgânica (1% de leite integral); solução com 100 ppm de cloro livre; quatro tempos de contato (5, 10, 15 e 30 min). Como resultados: com 200 ppm, na ausência de matéria orgânica, todos os isolados foram inativados; com 200 ppm e matéria orgânica, 27 isolados permaneceram viáveis mesmo após 30 min de contato; a solução com 100 ppm necessitou de 30 min para que 24 isolados se apresentassem inativos. Concluiu-se que, para o uso deste desinfetante na proteção da saúde de comensais frente ao gênero bacteriano confrontado, o recomendado é uma solução com pelo menos 200 ppm de cloro livre, tempo de contato não inferior a 30 min e resíduos orgânicos nas superfícies com níveis inferiores a 1%.

Palavras-chave. hipoclorito de sódio, desinfecção, doenças transmitidas por alimentos, *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

To monitor the efficiency of sodium hypochlorite as a sanitary barrier, was evaluated the activity against 32 strains of *Staphylococcus aureus* gathered from IPB-LACEN/RS from food implicated in foodborne disease outbreaks. Suspension tests were carried out: a 200 ppm free chlorine solution in the absence and presence of organic matter (1% whole milk); 100 ppm free chlorine solution; and four contact times (5, 10, 15 and 30 min). The results: at 200 ppm, in absence of organic matter, all strains were inactivated. At 200 ppm, with organic matter, 27 strains had remained viable even after a contact of 30 minutes. At 100 ppm it was necessary a 30 min contact to 24 strains if presented inactive. In conclusion, to use this disinfectant in protection from health of dinner companion, against bacterial genus confronted, must have at least 200 ppm of free chlorine, contact time not lower than 30 min and levels of organic residues no higher than 1%.

Key words. sodium hypochlorite, disinfection, foodborne disease outbreaks, *Staphylococcus aureus*

INTRODUÇÃO

No Brasil, de 1999 até 2008, 6.062 surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) foram registrados pela Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), com acometimento de 117.330 pessoas e com 64 óbitos neste período¹. No Rio Grande do Sul, estudo epidemiológico indica que os micro-organismos isolados com maior frequência como causadores das DTA são *Salmonella* spp e *Staphylococcus aureus*, sendo este responsabilizado por 11% do total de surtos².

O *Staphylococcus aureus* é o mais patogênico dos estafilococos, produz toxinas que contribuem para a patogenicidade da bactéria, entre elas uma enterotoxina que causa vômitos e náusea quando ingerida. Se os *Staphylococcus* são deixados incubar no alimento (abuso de temperatura), reproduzem-se e liberam enterotoxina estafilocócica no alimento. Os sintomas aparecem rapidamente, em geral após 4 a 6 horas e caracterizam-se por vômitos intensos, diarreia, dor abdominal e, às vezes, seguida de colapso³.

Entre as causas mais frequentes apontadas como favorecedoras da contaminação dos alimentos estão a falta de qualificação dos manipuladores no que diz respeito às boas práticas de processamento, as precárias condições de manuseio e conservação bem como a deficiente higienização do ambiente onde esses alimentos são preparados. Quanto ao procedimento de higienização, ele está dividido em etapas⁴: a limpeza (remoção de resíduos) e a desinfecção (ação sobre os micro-organismos deteriorantes ou patogênicos).

O cloro, sob a forma de hipoclorito de sódio, tem sido o composto químico mais utilizado para garantir a qualidade microbiológica da água e dos alimentos. Comparativamente com outros desinfetantes, ele é de baixo custo e de fácil acesso, estando amplamente disponível no comércio⁵. No entanto, a experiência com resistência a antibióticos e biocidas indica que não há agente químico antimicrobiano que não possa, eventualmente, selecionar ou induzir resistência nos micro-organismos. Especificamente frente ao cloro, existem evidências de que vários micro-organismos apresentam diferentes graus de resistência a esse antimicrobiano⁶. Já foi alertado, também, que a eficácia da atividade antimicrobiana dos desinfetantes sofre variações, dependendo de fatores ambientais ou de manuseio^{7,8}.

Visando subsidiar as ações da Vigilância Sanitária na prevenção e no controle de doenças transmitidas por

alimentos, aplicando os desinfetantes como barreira sanitária nos locais de distribuição e de consumo de gêneros alimentícios, propôs-se verificar as condições de eficácia do antimicrobiano de ambiente hipoclorito de sódio frente a amostras de *Staphylococcus aureus*, isoladas em alimentos envolvidos em surtos de toxinfecções.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram usados 32 isolados de *Staphylococcus aureus* obtidos de alimentos envolvidos em surtos de DTA no Rio Grande do Sul, Brasil, no período de 2002 a 2006. O isolamento foi feito no Laboratório Central de Saúde Pública do Instituto de Pesquisas Biológicas (IPB-LACEN/RS), onde permaneceram armazenadas mantidas congeladas (-20 °C) em caldo de infusão cérebro e coração (BHI-DIFCO®) e glicerol (na concentração de duas partes de amostra e uma parte de glicerol). Verificada a pureza das linhagens cultivadas em Baird Parker, foram identificadas em provas positiva de coagulase em tubo, catalase, termonuclease, teste de hemólise e fermentação da maltose e do manitol, foram novamente semeadas em Ágar Baird-Parker (DIFCO®) e incubadas por 24/48 horas a 35°C. De cada amostra, uma colônia foi retirada e colocada em 3 mL de caldo BHI (DIFCO®), incubada por 24 horas a 35 °C, tornando-se a “cultura-teste” (10⁹ UFC/mL).

Para todas as provas de identificação bioquímicas realizadas, foi utilizado como controle positivo *Staphylococcus aureus* ATCC 25.933.

No experimento, utilizou-se a concentração de 200 ppm e 100 ppm de hipoclorito de sódio^{8,9} obtido de água sanitária com teor de cloro ativo de 2,38 % e pH 10,09 no produto a 1%, conforme laudo químico. A diluição foi feita em água destilada estéril, tendo o potenciômetro (Nova Técnica®, modelo NIpHM) indicado o pH de 9,47. Para simular ambiente com deficiência na limpeza, foi usado como matéria orgânica o leite integral, esterilizado em autoclave e adicionado ao teste na água de diluição do hipoclorito a 200 ppm na quantidade de 1 %.

A avaliação de eficácia antibacteriana foi pelo método de diluição, com teste de suspensão¹⁰. Tubos de ensaio contendo 10 mL do desinfetante na concentração 200 ppm sem e com matéria orgânica, e também, com 100 ppm receberam 0,1 mL da “cultura-teste” (isolados bacterianos). Mantendo-se constante a temperatura com ambiente climatizado no entorno de 25 °C, após os tempos de contato 5, 10, 15 e 30 min, foi retirada uma

alíquota, por meio de alça bacteriológica de platina com 10 µL e colocada em tubos de ensaio contendo 3 mL do meio de cultura caldo BHI (DIFCO®). Esses tubos foram agitados, incubados a 35°C e as observações feitas nas 96 horas.

A leitura desses tubos indicava os resultados: não-turvação, considerado bactéria inativa (sensível); turvação, bactéria ativa (resistente).

Na análise estatística, utilizou-se a técnica não-paramétrica Teste Q de Cochran, com comparações múltiplas. Com nível de significância ($p \leq 0,05$), levou em consideração a relação dos fatores: resultados bactéria inativa e ativa *versus* concentração de cloro livre *versus* presença/ausência de matéria orgânica *versus* tempo de contato. Formaram-se os seguintes níveis: A ou I; 200 ppm de hipoclorito de sódio sem matéria orgânica (C1S/M); 200 ppm de hipoclorito de sódio com matéria orgânica (C1C/M); 100 ppm (C2), nos tempos de 5, 10, 15 e 30 minutos de contato. Deste modo, obteve-se a configuração de 12 níveis de tratamentos, como exemplo: C1C/M-5, C1C/M-10,, C2-5, C2-10

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como pode ser observado na Tabela 1, quando confrontados por 30 minutos de contato com hipoclorito de sódio na concentração de 200 ppm de cloro livre, sem a presença de matéria orgânica, 100% dos isolados foram inativados. Na mesma concentração, mas na presença de matéria orgânica 1% de leite integral, 84,4% dos isolados apresentaram-se ativos e na concentração de 100 ppm, 75% mostraram-se inativos.

Para explicar a diferença entre o total de isolados inativados na presença de 200 ppm e de 100 ppm de cloro livre, parece correto pensar que uma maior concentração de cloro livre na solução deve corresponder (mantendo outros fatores intervenientes constantes) a um aumento da atividade bactericida (desenhos de experimentos realizados para demonstrar essa hipótese serão apresentados mais adiante, no texto).

Sobre a viabilidade do *S. aureus* na presença de matéria orgânica, conforme informam Macêdo e Barra¹¹, desinfetantes liberadores de cloro livre têm sua ação reduzida porque o cloro oxida primeiramente a matéria orgânica, reduzindo assim sua disponibilidade para ação antimicrobiana. Anteriormente, Lasmanis et al. (1953 apud Dychdala⁶), usando solução de hipoclorito com amostras de *Staphylococcus* (coagulase positiva e

negativa), observaram que com 3% de leite desnatado não foi obtida a completa morte dos organismos e que pequenas quantidades de leite exibiram progressivamente a diminuição no efeito da ação bactericida. Também Bessems¹² fez semelhante verificação com quaternário de amônio e hipoclorito. Adicionando 0,3% de albumina sérica bovina, a concentração desses compostos e o tempo necessários para obter o mesmo efeito de redução logarítmica do micro-organismo, em ausência de proteína, foi de pelo menos o dobro.

A presença da matéria orgânica pode explicar em parte a viabilidade bacteriana observada. Esse raciocínio, no entanto, não pode ser estendido ao caso da atividade do hipoclorito de sódio frente aos isolados de *S. aureus* na concentração de 100 ppm de cloro livre, posto que ausente a matéria orgânica. Para dar conta da interpretação desse resultado parecem pertinentes os argumentos de Sander et al.¹³ quando informam que ao testar-se a sensibilidade de um micro-organismo frente a um desinfetante deve-se levar em consideração todos os fatores que possam interferir na avaliação, principalmente a situação problema específica, isto é, isolados bacterianos dentro de um mesmo gênero e espécie têm diferentes graus de sensibilidade a um mesmo desinfetante. Ou ainda, que o mesmo desinfetante com formulações similares, porém não idênticas, apresenta eficácia diferente contra a mesma bactéria. Com sentido semelhante, pode-se assumir a observação de Lee e Gilbert (1918, apud Wickramanayake e Spoul¹⁴) para quem a resistência aos antimicrobianos de micro-organismos aparentemente similares, pode ser diferente.

Elemento importante de ser anotado é sobre a influência do potencial hidrogeniônico na atividade bactericida de solução com hipoclorito de sódio. Como referido por Romão¹⁵ e Andrade e Macêdo⁵, a forma mais ativa dos compostos liberadores de cloro é o ácido hipocloroso (HOCl), o qual está mais disponível com o pH da solução entre 5 e 8. No entanto, nesse experimento optou-se por não fazer a correção do pH, pois o objetivo foi o de agregar informações sobre a eficácia desse antimicrobiano em cenários epidemiológicos concretos.

Fair et al. e Morris, citados por Dychdala⁶, reforçam a observação de que a atividade do hipoclorito depende do pH. Dychdala⁶ também concorda que o ácido hipocloroso tem maior atividade antimicrobiana, e que a sua presença depende do pH da solução, mas argumenta que a experiência mostra que em solução alcalina tanto o hipoclorito de sódio quanto de cálcio, com pequena quantidade de ácido hipocloroso e grande

do íon hipoclorito definitivamente possui propriedades bactericidas, sugerindo que esse elemento também deve exercer um papel importante na desinfecção.

Uma consideração sobre a técnica empregada. Em testes de avaliação da atividade desinfetante, frequentemente é sugerido o uso de produtos químicos para neutralizar os resíduos antimicrobianos que possam ser carregados junto às subculturas de bactérias suspensas¹⁶. Como neutralizador do cloro, a indicação é o tiosulfato de sódio a 0,6 %. No entanto¹⁷, esse composto pode provocar inibição microbiana em organismos do gênero *Staphylococcus*. Assim, optou-se por usar a técnica de neutralização do cloro por diluição até níveis subinibitórios. Esse procedimento foi realizado quando a alíquota retirada com a alça de platina (10 µL) do tubo teste era inoculada em tubo de ensaio contendo 3 mL de meio líquido caldo BHI, o que significou uma diluição de 300 vezes.

Na Tabela 1 pode-se observar que na concentração de 200 ppm de cloro livre do hipoclorito de sódio, sem a presença de matéria orgânica, nos primeiros 5 minutos de contato 78,1% dos isolados de *Staphylococcus aureus* foram inativados. Aos 10 minutos, e também aos 15 minutos, 96,9% dos isolados foram inativados. Ao tempo de contato de 30 minutos 100% dos isolados apresentaram-se inativos.

Quando os isolados de *Staphylococcus aureus* foram confrontados com o hipoclorito de sódio na

concentração de 200 ppm de cloro livre na presença de matéria orgânica, tanto aos 5 quanto aos 10 minutos de contato 100% permaneceram ativos/resistentes. Aos 15 minutos, 9,4% dos isolados foram inativados. Mesmo com 30 minutos de contato, quando presente a matéria orgânica, apenas 15,6% foram inativados pelo desinfetante ou, por outro lado, 84,4% apresentaram-se ativos.

No confronto dos isolados com a concentração de 100 ppm, aos 5 minutos de contato observa-se que 21,9% dos isolados foram inativados. Aos 10 minutos 34,4% dos isolados foram inativados e aos 15 minutos 46,9% deles. Aos 30 minutos 75% dos isolados estavam inativados, mas, visto de outro modo, 25% dos isolados de *Staphylococcus aureus* ainda estavam viáveis.

Pode-se perceber que quanto maior o tempo de contato, maior inativação de isolados. Para melhor compreensão desse evento recorre-se a Tortora *et al.*³, quando explicam que a taxa de morte está na dependência da carga populacional, das características microbianas, mas também do tempo de exposição. Essa reflexão igualmente coincide com a de Bessems¹⁶, segundo quem a influência do tempo de contato no efeito antimicrobiano de desinfetantes seria relatado com frequência na literatura científica. Em se usando uma concentração constante do antimicrobiano no teste, seu efeito aumentaria com o acréscimo de tempo de contato, o que coincide com o que foi encontrado neste experimento.

Tabela 1. Eficácia do hipoclorito de sódio, verificada pelo teste de suspensão, frente a 32 isolados de *Staphylococcus aureus* obtidos no IPB-LACEN/RS entre 2002 e 2006, em alimentos envolvidos em surtos de DTA.

Tempo de contato	200 ppm ausência de matéria orgânica (C1S/M)		200 ppm presença de matéria orgânica (C1C/M)		100 ppm (C2)	
	I	A	I	A	I	A
5 min	I	25	I	0	I	7
	A	7	A	32	A	25
10 min	I	31	I	0	I	11
	A	1	A	32	A	21
15 min	I	31	I	3	I	15
	A	1	A	29	A	17
30 min	I	32	I	5	I	24
	A	0	A	27	A	8

I= inativa; A= ativa.

Verificando a eficácia do hipoclorito de sódio por tempo de contato e nas diferentes concentrações de cloro, mesmo a relação maior tempo de contato e maior inativação dos isolados tendo ocorrido tanto no módulo experimental com 200 ppm quanto com 100 ppm, observou-se que com concentração de cloro livre maior, menor foi o tempo de contato necessário para que os isolados fossem inativados. A observação da relação entre concentração e atividade antimicrobiana já havia sido anotada anteriormente.

Com relação aos resultados da análise estatística foi concluído que deve haver, para a maior parte das comparações, diferença significativa entre a relação dos fatores concentração, ausência ou presença de matéria orgânica e tempo de contato. Não foram encontradas diferenças significativas, ou seja, poder-se-ia usar um ou outro, nos seguintes tratamentos: C1S/M-5 e C2-30; C1S/M-10 e C1S/M-15; C1S/M-10 e C1S/M-30; C1S/M-15 e C1S/M-30; C1C/M-5 e C1C/M-10; C1C/M-5 e C1C/M-15; C1C/M-5 e C1C/M-30; C1C/M-10 e C1C/M-15; C1C/M-10 e C1C/M-30; C1C/M-15 e C1C/M-30; C1C/M-15 e C2-5; C1C/M-30 e C2-5; C2-5 e C2-10; C2-10 e C2-15.

Chama-se a atenção para o fato de que as relações exclusivamente matemáticas podem não ser absolutas na interpretação dos resultados. Pode-se citar exemplos onde os tratamentos C1S/M-5 *versus* C2-30, ou C1S/M-10 e C1S/M-30 estatisticamente não apresentaram diferença significativa. No entanto, o sanitarista/higienista pode ter um olhar diferente sobre o resultado. Mesmo que a diferença de uma amostra, para o “n” 32 usado neste trabalho não indique matematicamente diferença significativa, o higienista deve pensar que uma única amostra viável após confrontação com o desinfetante tem grande importância, pois pode colocar em risco a segurança do alimento e conseqüentemente à saúde dos comensais.

CONCLUSÃO

Os resultados evidenciaram que, tomando como referência o gênero bacteriano confrontado, o uso do hipoclorito de sódio como barreira sanitária em ambientes de manipulação de alimentos promove maior segurança quando estiver com pelo menos 200 ppm de cloro livre, tempo de contato por 30 min e resíduos orgânicos nas superfícies com níveis inferiores a 1%.

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. [acesso em 06 de abril de 2009]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=27500.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. Ministério da Saúde. [acesso em 08 de novembro de 2006]. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/svs>.
3. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiologia. Porto Alegre: Artmed; 2000.
4. Brasil Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária [ANVISA] Resolução RDC Nº 216, de 15 de Setembro de 2004. [acesso em 24 de julho de 2004]. Disponível em: <http://www.e-legis.bvs.br/leisref>
5. Andrade NJ, Macêdo JAB. Higienização na indústria de alimentos. Falta edição? São Paulo: Livraria Varela; 1996.
6. Dychdala GR. Chlorine and chlorine compounds. In: Block, S.S. Disinfection, sterilization and preservation. 4. ed. Philadelphia, London: Lea & Febiger; 1991. p.131-151.
7. Wiest JM. Desinfecção e desinfetantes. In: Guerreiro M, Oliveira SJ, Saraiva D. et al. Bacteriologia especial: com interesse em saúde pública e saúde animal. Porto Alegre: Sulina; 1984. p. 51-66.
8. Food and Drug Administration – FDA. FDA/ Food Code 2001/ 21 CFR 178. 1010/Ch I (4-1-02 edition). [Accessed 29 jul 2007]. Available at: <http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/FCF178.html>.
9. Sociedade Brasileira Ciência e Tecnologia de Alimentos - SBCTA. Higiene e sanitização para empresas de alimentos. Manual - Série Qualidade. Primeira ed. São Paulo, SP: PROFIQUA; 1995.
10. Brasil, Ministério da Agricultura. Pecuária e Abastecimento Portaria nº 101, de 17 de agosto de 1993. Métodos de Análise Microbiológica para Alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, p. 11937-45, 17 de ago 1993, Seção 1.
11. Macêdo JAB, Barra MM. O estado da arte do processo de desinfecção pelo uso de derivados clorados, em função do pH. Leite & Derivados. 2002; 65: 26-30.
12. Bessems E. The effect of practical conditions on the efficacy of disinfectants. International Biodeterioration & Biodegradation. 1998; 41: 177-83.
13. Sander JE, Hofacre CL, Cheng IH & Wyatt RD. Investigation of resistance of bacteria from commercial poultry sources to commercial disinfectants. Avian Diseases. 2002; 46: 997-1000.
14. Wickramanayake GB, Spoul OJ. Kinetics of inactivation of microorganisms. In: BLOCK, S.S. Disinfection, sterilization and preservation. 4. ed. Philadelphia, London: Lea & Febiger; 1991. Part I, Chapter 3.
15. Romão CMCA. Desinfecção esterilização química. In: Teixeira P e Valle S (org). Biossegurança: uma abordagem multidisciplinar. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 1998. p.133-62.
16. Langsrud S, Sundhein G. Factors influencing a suspension test methods for antimicrobial activity of disinfectants. J Appl Microbiol. 1998; 85 (6): 1006 – 12.
17. World Health Organization - WHO. Guidelines on disinfection in animal husbandry for prevention and control of zoonotic disease. Geneva; 1984.(WHO/VPH/84.4).

Avaliação microbiológica e físico-química de açúcares mascavo comerciais

Physical-chemical and microbiological evaluation of commercial brown sugar

RIALA6/1217

Wesley Cardoso GENEROSO¹, Maria Teresa Mendes Ribeiro BORGES¹, Sandra Regina CECCATO-ANTONINI¹, Augusto Filip MARINO¹, Marcus Vinicius Merfa e SILVA¹, Renata Tiekko NASSU², Marta Regina VERRUMA-BERNARDI^{1*}

*Endereço para correspondência: Departamento de Tecnologia Agroindustrial e Socioeconomia Rural, CCA, UFSCar.

Via Anhanguera, Km 174. CP. 153, CEP:13600-970, Araras, SP,Brasil. e-mail: verruma@cca.ufscar.br.

¹Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Tecnologia Agroindustrial e Sócio-Economia Rural, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) Araras, SP,Brasil

²Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP, Brasil.

Recebido: 01.03.2009 Aceito para publicação: 31.08.2009

RESUMO

Este trabalho teve como objetivos analisar parâmetros microbiológicos e físico-químicos de 31 marcas de açúcares mascavos. Foram realizadas as análises microbiológicas (bactérias mesófilas totais, bolores e leveduras, coliformes totais, *Escherichia coli* e *Salmonella*) e físico-químicas (polarização, umidade, cinzas condutimétricas, cor ICUMSA, açúcar redutor, açúcar redutor total e pH). Os resultados microbiológicos indicaram que houve resultados acima do limite do of “National Food Canners and Processors” apenas para bactérias mesófilas totais. A legislação brasileira estabelece o teor mínimo de 90°S para sacarose como único parâmetro para avaliação do açúcar mascavo, sendo que apenas sete amostras atendiam ao padrão. Os resultados de umidade variaram de 2,13 a 6,02% para cinzas; de 1,15 a 3,45%; açúcares redutores; de 1,17 a 8,51%, redutores totais de 68,90 a 98,21%; pH de 5,24 a 7,8 e cor ICUMSA de 174,6 a 574,5 U.I indicando que os açúcares mascavos comercializados no Brasil não possuem padrão de produção, armazenamento e qualidade final, indicado pelas diferenças dos parâmetros avaliados.

Palavras-chave. cor, qualidade, açúcar mascavo.

ABSTRACT:

This paper aims to evaluate microbiological and physical-chemical parameters of 31 commercial brown sugar. Microbiological analysis (total mesophilic bacteria, mold and yeasts, total coliforms, *Escherichia coli* and *Salmonella*) and physico-chemical analysis (polarization, moisture, conductimetric ashes, ICUMSA color, reducing sugar, total reducing sugar and pH) were carried out. The microbiological results indicated that only the mesophilic bacteria were above the limit of “National Food Canners and Processors”. The Brazilian legislation establishing the minimum content of 90oS for sucrose as the unique parameter to evaluate the brown sugar and only 7 samples met the standard. The results of moisture ranged 2.13 to 6.02% ashes; 1.15 to 3.45%; reducing sugar 1.17 to 8.51%; total reducing sugar 68.90 to 98.21%; pH 5.24 to 7.8 and ICUMSA color 174.6 to 574.5 U.I. Therefore, the brown sugar commercialized in Brazil don't follow a pattern of production, storage and final quality, justified by the significant differences of the value of almost all evaluated parameters.

Key words. color, quality, brown sugar.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, cada vez mais os consumidores têm procurado modificar seus hábitos alimentares pelo consumo de produtos que não tenham sido submetidos a rigorosos processamentos industriais nem tenham recebido adição de substâncias químicas em sua fabricação. De acordo com Mendonça et al.¹, o açúcar mascavo atende aos grupos de pessoas que possuem hábitos alimentares baseados na minimização ou eliminação de produtos químicos agregados.

Os açúcares artesanais, como o mascavo e a rapadura, são produzidos geralmente em indústrias de pequeno porte ou em empresa familiar^{2,3}. Sua produção se dá, basicamente, pelo esmagamento de colmos de cana-de-açúcar, sadios, frescos e com um teor de *Brix* pré-estabelecido, em moenda para a extração do caldo, gerando a garapa e o bagaço. O caldo é inicialmente peneirado para livrá-lo de impurezas que possam ter sido incorporadas na moagem, como pedaços de bagaço. A seguir, a garapa é aquecida e, em muitos casos, tratada com leite de cal para correção da acidez e por último concentrado por evaporação até o ponto de cristalização da sacarose^{3,4}.

Comparativamente, o açúcar mascavo difere do açúcar branco, principalmente, pela sua coloração escura e pelo menor percentual de sacarose⁵. Segundo Coenders⁶, o açúcar mascavo é rico em cálcio, ferro, potássio e diversas vitaminas que não são normalmente encontradas no açúcar refinado, além de diminuir a carga energética específica e sua composição não comprometer a absorção de nutrientes pelo organismo.

De acordo com Spears e Kassouf⁷ seu uso moderado evita obesidade, diabete, diminui sensivelmente as cáries dentárias e os danos à calcificação infantil, além de ajudar no bom desempenho do sistema digestório e das funções hepática e renal, devido aos sais e vitaminas. Recentemente, o açúcar mascavo passou a ser tratado com seriedade quanto às características microbiológicas, além das químicas e tecnológicas, já citadas anteriormente, visto que este tipo de açúcar tem sido a base essencial para a elaboração de diversos tipos de alimentos e bebidas, além do crescente consumo.

A contaminação microbiana resultante do processo produtivo, quando conduzido de maneira adequada, não é o principal problema para o açúcar mascavo, pois é considerada inexistente, dado que no desenvolvimento são atingidas temperaturas superiores às suportadas

por grande parte dos micro-organismos patogênicos e grande parte da contaminação do produto é resultante do armazenamento insatisfatório⁸.

Não se espera uma grande diversidade de micro-organismos em análises microbiológicas de açúcares mascavos, dado que o crescimento dos mesmos depende da obtenção de umidade adequada, geralmente superior à do açúcar^{8,9}.

As regras de mercado valorizam a qualidade dos produtos, sendo o foco essencial para que as empresas sejam competitivas e atendam às demandas do consumidor moderno, o qual busca cada vez mais produtos saudáveis e fáceis de preparar, porém, sem abrir mão do sabor¹⁰, uma vez que o açúcar mascavo provem muitas vezes de técnicas não padronizadas. Relatam ainda que a variedade da matéria-prima e a temperatura de processamento afetam o produto final¹¹.

Este trabalho teve como objetivo verificar a qualidade microbiológica e físico-química de marcas comerciais de açúcares mascavo, bem como comparar os resultados de carboidratos descritos nos rótulos com os obtidos nas análises.

MATERIAL E MÉTODOS

■ Material

Inicialmente foram coletadas 31 (trinta e uma) marcas de açúcar mascavo comercializadas nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, sendo que a escolha das amostras teve como critério as informações na rotulagem, tais como: designação do produto, razão social e endereço do fabricante, peso líquido, ingredientes, data de fabricação, seguindo a recomendação descrita pela Resolução 12/33 de 1978 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (Brasil)¹².

■ Análises microbiológicas

As amostras foram analisadas quanto ao número de mesófilas totais (ICUMSA GS2/3-43)¹³, bolores e leveduras (ICUMSA GS2/3-47)¹², coliformes totais e *Escherichia coli* (Petrifilm - AOAC 991.14 - 3M Microbiology) e *Salmonella* (kit 1-2 Test - AOAC 989.13 - BioControl). As análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular (LAMAM) do DTAiSER/CCA/UFSCar.

■ Análises físico-químicas

Os seguintes parâmetros foram analisados: polarização, umidade, cinzas condutimétricas, açúcar redutor, açúcar redutor total, cor ICUMSA e pH. Todas as metodologias seguiram as recomendações da International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis (ICUMSA¹³) e foram realizadas no Laboratório de Análises e Simulação Tecnológica (LAST) do Departamento de Tecnologia Agroindustrial e Socioeconomia Rural do Centro de Ciências Agrárias da UFSCar. As análises foram realizadas em triplicata.

■ Análise da rotulagem

A análise de rotulagem foi realizada através de averiguação dos rótulos, onde se anotou todas as informações seguindo a normatização estabelecida pela Anvisa¹⁴: valor energético, carboidratos, proteínas, gorduras totais, saturadas e *trans*, fibra alimentar, ferro e sódio.

Em seguida foi realizada uma comparação entre os dados obtidos no rótulo para carboidratos, com os valores obtidos nas análises físico-químicas para açúcares redutores totais, já que estes são responsáveis pela totalidade de carboidratos do produto.

■ Análise estatística

Os dados obtidos nas análises microbiológicas e físico-químicas foram avaliados utilizando o programa estatístico¹⁵, por análise de variância (Anova), observando, assim, se existirá homogeneidade das amostras, e, sendo detectadas diferenças significativas entre as médias ($p \leq 0,05$), realizou-se teste de Tukey. A Análise dos Componentes Principais (ACP) também foi utilizada nos dados físico-químicos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise microbiológica

A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos nas análises microbiológicas das 31 marcas de açúcares mascavo.

A legislação brasileira estabelece valores de coliformes totais como o único parâmetro microbiológico para açúcar mascavo, tendo um limite de 10^2 UFC/g¹⁶. Para este estudo, nenhuma amostra apresentou a presença de coliformes, bem como *Salmonella*.

A presença de coliformes totais e *Escherichia coli* em alimentos é considerada uma indicação de contaminação devida, na maioria das vezes, à higiene e sanificação inadequadas no processamento de alimentos¹⁷.

Para bactérias mesófilas totais, considerando-se os Padrões internacionais do “National Food Canners and Processors” citado por Ceccato-Antonini¹⁸, um limite adequado para garantia da qualidade microbiológica do açúcar mascavo estabelece-se em 50 UFC/g. Desta maneira, verificou-se que dez amostras (2, 6, 12, 17, 20, 21, 22, 23, 27, 31) de açúcar mascavo não se apresentaram dentro deste limite microbiológico exigido.

Grande parte da contaminação por bactérias está ligada à higiene insatisfatória no processo de envase do açúcar ou à conservação inadequada nos estabelecimentos comerciais. A amostra 12 devido a seu alto valor, cerca de 30 vezes superior ao permitido¹⁶, é considerada inaceitável para o consumo humano direto. Um provável fator ligado à esta excessiva carga bacteriana pode ser o teor de umidade elevado, como pode ser verificado nas análises físico-químicas.

Outras características devem ser consideradas para a garantia da qualidade microbiológica do açúcar mascavo, segundo Verruma et al.¹⁹, como um limite de 50 UFC/g de bolores e leveduras e a ausência de *Salmonella* e para ambos os parâmetros, todas as amostras encontraram-se dentro dos padrões estabelecidos.

■ Análises físico-químicas

A Tabela 2 mostra os resultados obtidos nas análises físico-químicas das 31 marcas de açúcares mascavos, mostrando que as amostras apresentaram diferenças significativas para os todos os parâmetros avaliados ($p \leq 0,05$), exceto polarização.

Os resultados de polarização variaram de 74,89 a 96,93°S (Tabela 2). A legislação brasileira estabelece apenas o teor de sacarose (Pol) como único parâmetro para avaliação deste produto⁹ exigindo valor mínimo de 90% ou 90°S. Dos 31 açúcares avaliados, sete apresentaram-se dentro do padrão estabelecido pela legislação brasileira: 21, 7, 4, 15, 23, 13 e 5, com valores de 90,88, 91,09, 91,44, 93,28, 94,04 e 96,93°S respectivamente.

Verruma et al.¹⁹, analisando Pol em nove amostras de açúcares mascavo, descreveram que apenas duas amostras estavam com teores superiores a 90%.

Para os teores de umidade, observou-se que houve uma variação entre 2,13 a 6,02%. Apesar da legislação vigente não especificar o mínimo e o máximo, Verruma et al.¹⁹ sugeriram valores inferiores a 2,4%, em função da estabilidade do produto. Desta forma, apenas a amostra 13 adequa-se com 2,13%.

Tabela 1. Valores médios dos parâmetros microbiológicos dos açúcares mascavo

Amostra	Coliformes (UFC/g)	Bactérias Mesófilas totais (UFC/g)	Bol. e Lev. (UFC/g)	Salmonella
1	Ausência	30,5	1,5	Ausência
2	Ausência	74,5	3,5	Ausência
3	Ausência	25,5	7,0	Ausência
4	Ausência	45,5	5,5	Ausência
5	Ausência	43,5	5,5	Ausência
6	Ausência	56,5	8,5	Ausência
7	Ausência	17,5	4,5	Ausência
8	Ausência	31,5	2,5	Ausência
9	Ausência	30,5	1,5	Ausência
10	Ausência	36,5	26,5	Ausência
11	Ausência	17,5	9,5	Ausência
12	Ausência	1632,5	5,5	Ausência
13	Ausência	19,5	4,5	Ausência
14	Ausência	23,5	10,5	Ausência
15	Ausência	9,5	24,5	Ausência
16	Ausência	14,5	0,5	Ausência
17	Ausência	79,5	2,5	Ausência
18	Ausência	40,5	42	Ausência
19	Ausência	15,5	1,5	Ausência
20	Ausência	101	0,5	Ausência
21	Ausência	59,5	32,5	Ausência
22	Ausência	80,5	1,5	Ausência
23	Ausência	249,5	15,5	Ausência
24	Ausência	39,5	1,5	Ausência
25	Ausência	9,5	0,5	Ausência
26	Ausência	4,0	0,5	Ausência
27	Ausência	54,5	1,5	Ausência
28	Ausência	9,5	1,0	Ausência
29	Ausência	16,5	0,5	Ausência
30	Ausência	38,5	0,5	Ausência
31	Ausência	111,5	1,0	Ausência
	0	1,11	0,5	0

Médias na mesma coluna, seguidas de letras iguais, não diferem significativamente (p 0,05) pelo teste de Tukey.
DMS = Diferença Mínima Significativa.

Tabela 2. Valores médios dos parâmetros físico-químicos dos açúcares mascavo

Amostras	Polarização °S	Umidade %	Cinzas %	AR %	ART %	Cor U.I.	pH
1	89,69 ns	2,98ghijk	1,57pq	5,27efgh	85,37gh	243,2jki	6,11klmn
2	88,13 ns	3,81defg	1,55q	8,21ab	86,07fgh	445,1bc	7,13b
3	86,69 ns	3,61efgh	2,04g	5,25efgh	96,69abc	408,0bcde	6,84e
4	91,09 ns	2,47jk	1,64o	4,01klm	94,61abc	386,1bcdef	7,85a
5	96,93 ns	2,73hijk	1,91i	5,2efghi	98,21 ^a	263,1hijk	6,88de
6	89,34 ns	2,62ijk	1,66no	3,52mno	96,7abc	422,7bcde	6,19jklm
7	90,88 ns	6,02a	2,08f	8,51a	94,61abc	284,6ghij	7,08bc
8	82,11 ns	4,65bcd	2,41c	5,04fghi	94,92abc	470,6b	6,78ef
9	80,25 ns	3,33efghij	1,21t	5,59ef	94,74abc	246,6jk	6,18jklm
10	84,91 ns	4,03cdef	1,75l	5,42efg	95,13abc	213,4ijk	5,89 ^o
11	87,92 ns	3,56efgh	1,83k	4,60hijk	97,29ab	174,6k	6,33ij
12	86,78 ns	2,57ijk	1,59p	4,22jklm	87,22efgh	356,2cdefg	6,23ijkl
13	94,04 ns	2,13k	1,67no	2,88opq	96,18abc	223jk	7,69 ^a
14	88,67 ns	3,00ghijk	1,72lm	3,24nop	90,68cdefg	252,4ijk	6,23ijkl
15	91,44 ns	2,53jk	1,75l	2,27qr	95,14abc	397,2bcdef	6,92cde
16	86,33 ns	5,15ab	3,45a	4,78ghij	94,49abc	405,2bcdef	6,37hi
17	87,94 ns	3,60efgh	1,24t	5,34efgh	93,06abcde	343,5efgh	5,63p
18	88,1 ns	2,93ghijk	2,12e	1,17s	94,9abc	348,6defgh	7,79 ^a
19	83,59 ns	4,89bc	2,03g	4,92fghij	91,06cdefg	259,6hijk	6,51gh
20	89,76 ns	3,95def	2,14e	3,84lmn	94,54abc	398,5bcdef	6,15klmn
21	90,21 ns	3,01ghijk	2,19d	2,72pq	92,67abcde	347,1def	6,25ijk
22	84,46 ns	3,5efghi	1,85jk	4,46ijkl	93,89abcd	362,1cdefg	6,04mno
23	93,28 ns	2,44jk	1,87j	1,88rs	93,28abcde	264,8ijh	6,25ijk
24	78,25 ns	6,00a	3,11b	3,22nop	87,58efgh	474,9cdefg	5,98no
25	86,78 ns	3,29efghij	1,95h	2,20qr	93,10abcde	356cdef	6,66fg
26	82,76 ns	4,03cdef	1,67no	6,74d	68,90i	433,9bcd	6,06lmno
27	74,89 ns	4,95bc	2,06fg	6,93d	87,98defgh	410,2bcde	6,52gh
28	85,36 ns	3,09fghij	1,15t	5,87e	82,90h	315,8fghi	6,79ef
29	85,36 ns	4,15cde	1,68mn	8,18ab	93,19abcde	229,4ijk	7,04bcd
30	79,05 ns	4,22bcde	1,32s	7,73bc	84,31h	574,5 ^a	5,22q
31	84,98 ns	3,84defg	1,43r	7,1cd	91,59bcdef	415,1bcde	5,91 ^o
	22,85	0,94	0,04	0,76	6,16	89,87	0,17

Médias na mesma coluna, seguidas de letras iguais, não diferem significativamente (p 0,05) pelo teste de Tukey.
DMS = Diferença Mínima Significativa – ns=não significativo (p 0,05).

Estudos descritos por Verruma et al.¹⁹, com 9 marcas comerciais de açúcar mascavo, encontraram valores de umidade entre 1,35 e 4,44%. A alta umidade em açúcar pode causar diversos problemas como empedramento, dissolução de cristais (o açúcar se apresentar melado), infecção por micro-organismos, desdobramento de sacarose em glicose e frutose, o que implica baixa vida útil para o produto. Para Sarantopoulos et al.,²⁰ a umidade é o fator de influência máxima na deterioração do açúcar.

Estudos descritos por Silva e Parazzi²¹, sobre umidade de açúcar mascavo, mostraram que o teor de umidade do açúcar mascavo em relação ao convencional cristal ou refinado foi quatro vezes maior, com destaque para as marcas provenientes de coletas em bares e em pequenas propriedades.

De acordo com Lopes e Borges²², para uma melhor qualidade do açúcar, é importante que a variedade de cana utilizada forneça uma garapa com baixo teor de cinzas, pois altos teores de cinzas significam altos teores de potássio, o qual confere um sabor desagradável ao açúcar, além de dificultar a cristalização. Os mesmos autores propõem que este valor não seja superior a 2,2% no açúcar mascavo, garantido assim sua qualidade. Neste trabalho, os valores de cinzas variaram de 1,15 a 3,45%. As amostras 8, 16 e 24 apresentaram valores acima do proposto, portanto aproximadamente 90% estão em conformidade.

Quanto aos resultados obtidos para açúcares redutores (AR), a variação ocorreu entre 1,17 a 8,51%. Conforme sugerido por Lopes e Borges²², os valores de AR devem estar abaixo de 2,4%. A Tabela 2 mostra que apenas as amostras 15, 18, 23 e 25 apresentaram valores adequados.

Estudos descritos por Verruma et al.¹⁹ pesquisando 9 marcas de açúcar mascavo também obtiveram uma variação ampla nos teores de açúcares redutores: 1,43 a 6,59%.

De acordo com Lopes e Borges²² os açúcares redutores (AR) podem ser originários da própria cana, que quando não madura possui teores superiores a 1%, ou originários da inversão da sacarose durante o processo de fabricação. Como consequência do processamento de caldos em altas temperaturas, altos valores de AR podem ser evitados utilizando-se cana madura, fresca e principalmente pela aplicação da cal, promovendo a neutralização do caldo. O alto teor de AR também dificulta a obtenção do ponto final de cozimento para cristalização da sacarose, resultando em um produto com aparência

úmida e com tendência para melar ou empedrar, ou ainda pode causar a perda deste ponto levando o produtor a grandes prejuízos.

Quanto aos resultados obtidos para açúcares redutores totais, as amostras apresentam valores que variaram de 68,90 a 98,21%.

Não há valor máximo e mínimo definido para açúcar redutor total. Os teores no açúcar mascavo podem variar de acordo com a quantidade de açúcares redutores totais existentes no caldo da cana-de-açúcar. No processo produtivo, a cana geralmente é colhida com um teor de *Brix* preestabelecido, sendo assim a quantidade de açúcares no caldo da cana dependente do teor de sólidos solúveis não-açúcares, como sais minerais e ácidos, por exemplo.

Quanto aos resultados obtidos para cor ICUMSA, os valores situados ficaram entre 174,6 (amostra 11) e 574,5 U.I (amostra 30). Para termos de comparação, o valor de cor ICUMSA para o açúcar refinado especial deve ser inferior a 80. Lopes e Borges³, descreveram que o uso excessivo de cal com elevação do pH a valores superiores a 7 também interfere na cor do produto que pode sofrer a destruição da sacarose e o escurecimento do açúcar. Neste trabalho as amostras 2, 4, 8, 13, 18 e 29 apresentaram pH superior a 7, porém somente as amostras 2 e 4 (pH maior que 7,0) apresentaram cor ICUMSA elevadas.

Outro fator é o uso de ácido inoxidável na construção dos equipamentos no lugar do aço carbono, que é uma maneira também de se evitar o escurecimento. A variedade de cana e o local onde ela é plantada podem resultar em caldos ricos em polifenóis ou aminoácidos que acabam resultando em cor no açúcar. Isto pode ser controlado ou evitado pela experiência do agricultor, que pode testar diversos sítios de plantio e variedades.

A cor é um parâmetro importante da aparência, pois é percebido logo no primeiro contato do consumidor com o produto e pode fornecer informação sobre o processamento. De acordo com Lopes & Borges³, durante a fabricação do açúcar mascavo formam-se muitos materiais coloridos como as melanoídnas (cor amarela). Se a temperatura de cozimento for muito alta ou o tempo de cozimento muito longo, podem ser formados compostos denominados caramelos, que possuem cor escura. Os caramelos escurecem o açúcar (açúcar preto), porém também lhe conferem um sabor especial de açúcar queimado que pode agradar alguns consumidores.

O método ICUMSA verifica se a coloração do produto está de acordo com a classificação utilizada pelo fabricante no rótulo do produto. Quanto mais baixo esse

índice, mais claro, ou mais branco, é o açúcar. À medida que esse índice aumenta, o açúcar vai adquirindo uma coloração mais escura²². Mujica e Soto¹¹ relataram que a variedade interfere na coloração do açúcar mascavo.

O mesmo Instituto descreve que a da coloração do açúcar (convencional) está diretamente relacionada ao número de partículas carbonizadas presentes, o que representa falha na higienização do equipamento que entra em contato com o produto, uma vez que tais partículas são arrastadas durante o processo de fabricação ao tamanho dessas partículas, ou seja, quanto menores as partículas, mais branco é o açúcar e vice-versa.

O pH das amostras de açúcares mascavo variou entre 5,22 a 7,85. Lopes & Borges²² relataram que esta variação se dá pela adição de cal na fabricação, não havendo valor mínimo e máximo especificado. De acordo com Mujica e Soto¹¹, a variedade influencia significativamente no pH do açúcar mascavo.

Utilizando-se os dados coletados de cada parâmetro analisado foi possível realizar obter a Análise de Componentes Principais (ACP). A Figura 1 ilustra a distribuição dos atributos parâmetros no espaço definido pela primeira e segunda dimensões. Verificou-se que os Componentes Principais (CP) 1 e 2 explicam juntos 60,56% das variações entre as amostras de açúcar mascavo. O CP1 explicou maior parte da variação das amostras, compreendendo 38,66%, e 21,89% para CP2.

É possível observar na Figura 1 quanto maior a projeção do vetor do parâmetro físico-químico, mais importante para o eixo (1 ou 2) e quanto mais perto a amostra do vetor, mais importante é o atributo para amostra.

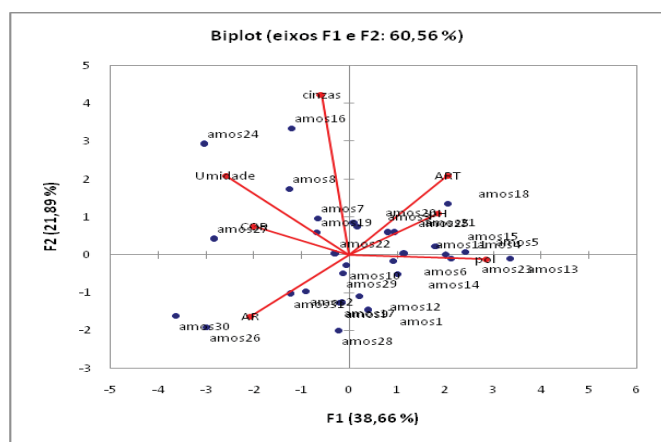


Figura 1. Análise de Componentes Principais (ACP) de açúcar mascavo – posição dos parâmetros físico-químicos e amostras.

Analisando-se a Figura 1 observa-se que os ART, POL, pH localizados à direita na referida Figura, bem como AR localizado no lado esquerdo da mesma contribuíram com o maior peso para a variabilidade associada ao CP1. Já a umidade e cinzas foram os que mais contribuíram para a variabilidade associada ao CP2. Verificou-se que houve grande variabilidade entre as amostras.

Quanto à comparação das informações descritas nos rótulos dos açúcares mascavos, verificou-se que as 31 amostras demonstraram grande similaridade quanto à apresentação das embalagens. As marcas se adequam à legislação vigente estabelecida pela Anvisa¹⁴, exceto pelas amostras 2 e 22, que não apresentava tabela de composição.

O valor energético hoje utilizado é com base em uma alimentação de uma pessoa adulta de 2000 kcal, que deve ser expresso em Kcal e kJ. Na Tabela 3, pode-se observar que dos rótulos analisados, duas marcas utilizam a unidade de cal para representar seu valor, as marcas 23 e a 24, e as amostras 14, 15, 16, 27, 28 e 30 apresentaram apenas o valor em Kcal.

Para carboidratos todas as marcas apresentaram teores próximos (4,5 a 5,0g). Das 31 marcas analisadas verificou-se que 5 marcas (2, 5, 22, 23 e 27) não apresentaram dados sobre teores de carboidratos em seu respectivo rótulo.

Para os valores obtidos para carboidratos neste trabalho os valores variaram 1,17 a 8,51, portanto, verificou-se que das 26 marcas que apresentaram o item carboidrato, 14 apresentaram valores superiores em relação à análise realizada, sendo que destas 4 apresentaram uma diferença superior a 2 gramas, as marcas 13, 15, 18 e 25.

Das 31 marcas analisadas, 68% apresentaram em suas embalagens a informação sobre o teor de proteínas. Verificou-se, como era esperado, baixo teor neste nutriente.

A indicação de gorduras totais, saturadas e *trans* são obrigatórias em todas as embalagens dos alimentos. Conforme a Tabela 3, constatou-se que apenas 21 marcas apresentaram valores de gorduras totais, 22 marcas de gorduras saturadas e 17 marcas de gorduras *trans*.

A quantidade de fibra encontrada no açúcar mascavo é o resultado da má peneiração do caldo de cana-de-açúcar no processo produtivo; sendo assim, partes de bagaço de cana não serão observados em valor significativo, como é possível concluir pela Tabela 3, cujas

Tabela 3. Informações nutricionais descritas nas embalagens dos açúcares mascavos e carboidratos obtidos na análise físico-química.

Marcas comerciais	Valor Energético (kcal - kJ)	Carboidratos rótulo(g)	Carboidratos análise(g)*	Proteínas (g)	Gorduras Totais (g)	Gorduras Saturadas (g)	Gorduras Trans (g)	Fibra Alimentar (g)
1	18 - 76	4,5	5,27	s.i	s.i	s.i	s.i	s.i
2	s.i	s.i	8,21	s.i	s.i	s.i	s.i	s.i
3	18 - 76	5,0	5,25	0	0	0	0	0
4	19 - 80	4,9	4,01	0	0	0	0	<1,0
5	18 - 76	s.i	5,20	s.i	s.i	s.i	s.i	s.i
6	19 - 83	4,9	3,52	0	0	0	0	0
7	19 - 80	4,9	8,51	0	0	0	0	0
8	19 - 76	5,0	5,04	s.i	0	0	0	0
9	19 - 76	5,0	5,59	0	0	0	0	0
10	18 - 76	4,8	5,42	s.i	0,4	0	0	s.i
11	18 - 76	4,8	4,60	s.i	0,4	0	0	s.i
12	20 - 84	4,9	4,22	s.i	s.i	s.i	s.i	s.i
13	20 - 84	4,9	2,88	s.i	s.i	s.i	s.i	s.i
14	20	5,0	3,24	<0,5	<0,5	s.i	s.i	s.i
15	20	5,0	2,27	0	s.i	0	s.i	s.i
16	20	5,0	4,78	0	s.i	0	s.i	s.i
17	18 - 76	4,5	5,34	0	0	0	0	0
18	18 - 76	4,5	1,17	0	0	0	0	0
19	20 - 84	5,0	4,92	0	0	0	0	0
20	19 - 80	4,8	3,84	0	0	0	0	0
21	18 - 76	4,5	2,72	0	0	0	0	0
22	s.i	s.i	4,46	s.i	s.i	s.i	s.i	s.i
23	16	s.i	1,88	s.i	s.i	s.i	s.i	<1
24	18	4,5	3,22	0	0	0	s.i	<1,0
25	20 - 85	5,0	2,20	0	0	0	0	0
26	20 - 85	5,0	6,74	0	0	0	0	0
27	16	s.i	6,93	s.i	s.i	s.i	s.i	s.i
28	20	5,0	5,87	0	0	0	s.i	0
29	20 - 84	4,9	8,18	0	0	0	0	0
30	18	4,5	7,73	0,4	0,23	0	s.i	<1,0
31	19 - 80	4,9	7,10	0	0	0	0	0

Obs. valores referentes a uma colher de chá = 5 g.

s.i = sem informação.

*Valores obtidos na análise físico-química.

amostras 4, 23, 24 e 30 são as únicas a apresentarem valor para este parâmetro.

O ferro, no açúcar mascavo, é oriundo do já existente no caldo de cana-de-açúcar e do resultante do desgaste das moendas e tachos. Embora com baixas quantidades, o açúcar mascavo pode ser utilizado para diminuir o valor diário de ferro a ser consumido pelo ser humano, dado que este elemento é de extrema importância na manutenção do organismo, destarte, a indicação no rótulo do teor de ferro torna-se significativo, embora nenhuma marca analisada tenha apresentado este item no rótulo²³.

CONCLUSÕES

- Os parâmetros físico-químicos analisados apresentaram valores bastante variáveis demonstrando falta de padronização na produção dos açúcares mascavo;
- A legislação brasileira estabelece a polarização como único parâmetro químico para avaliação do açúcar mascavo, e dos 31 açúcares avaliados, apenas sete apresentaram-se dentro do padrão estabelecido;
- Verificaram-se altos teores de umidade e açúcar redutor na maioria dos açúcares, que deveriam ser normatizados, uma vez que estes parâmetros são indicadores que estão intimamente ligados a vida de prateleira do produto;
- A maioria dos açúcares mascavo apresentou contagens de mesófilas totais superiores ao permitido para açúcares, o que pode estar ligado aos altos teores de umidade;
- Quanto à análise de rotulagem, observou-se que parte das exigências não é apresentada nos rótulos;
- Novas resoluções de padronização para açúcar mascavo devem ser realizadas para adequar a garantia de qualidade do produto para o consumidor e assegurar que os pequenos fabricantes se mantenham no mercado.

REFERÊNCIAS

1. Mendonça CR.; Rodrigues RS.; Zambiasi RC. Açúcar mascavo em geleadas de maçã. *Ciência Rural*. 2000; 30 (6):1053-8.
2. Paturau JM. By products of the cane sugar industry. An introduction to their industrial utilization. 2nd ed. New York: Elsevier, 1982.
3. Lopes CH, Borges MTMR. Produção de açúcar mascavo, rapadura e melado de cana. CNA, SEBRAE, SENAR: Capacitação Tecnológica para a Cadeia Agroindustrial. Rio Grande do Sul, 1998.
4. Delgado AA, Delgado AP. Produção de açúcar mascavo, rapadura e melado. Piracicaba: Alves, 1999.
5. Rodrigues RS, Galli DC, Machado MRG. Comparação entre seis marcas de açúcar mascavo. In: Congreso Latinoamericano de Ingeniería Rural, 2.; Congreso Argentino de Ingeniería Rural, 5., La Plata. Anais... La Plata: Clir-Cadir, 1998.
6. Coenders A. Química Culinária. Zaragoza: Editorial Acribia, S.A., 1996.
7. Spears EE, Kassouf AL. A segurança dos alimentos: uma preocupação crescente. *Rev Hig Alimentar*, v.10, n.44. São Paulo, 1996; 18-9.
8. Jay JM. Microbiologia de alimentos. Trad. Eduardo Cesar Tondo *et al.* 6th ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
9. Franco BDGM. Microbiologia de alimentos. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.
10. Deshpande RP, Chinnan MS, McWatters KH. Nutritional, physical and sensory characteristics of various chocolate-flavored peanut-soy beverage formulations. *J Sens Stud*. 2005; 20: 130-45.
11. Mujica MV, Guerra M, Soto MN. Efecto de la variedad, lavado de la caña y temperatura de punte o sobre la calidad de la panela granulada. *Intercien*. 2008; 33(8): 598-603.
12. Brasil. Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos -CNNPA. Resolução nº 12, de 24 de julho de 1978 da Aprova as normas técnicas especiais, do estado de São Paulo, revistas pela CNNPA, relativas a alimentos (e bebidas), para efeito em todo o território brasileiro. Diário Oficial [da] União, Brasília, DF, 24 de jul 1978. Seção1.
13. International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis [ICUMSA]. International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis. England, 2004.
14. Agência Nacional de Vigilância Sanitária [Anvisa]. Rotulagem nutricional obrigatória: manual de orientação às indústrias de Alimentos – 2º Versão atualizada. 2005.
15. StatSoft. STATISTICA [computer program]. Version 6. StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA.
16. Agência Nacional de Vigilância Sanitária [ANVISA]. Resolução - RDC nº 12. 2 de jan. de 2001. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm. Acesso em 28 de fevereiro de 2009.
17. Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. São Paulo: Varela, 1997.
18. Ceccato-Antonini SR. Qualidade de açúcar: aspectos microbiológicos. *J Cana*; abril, 2000.
19. Verruma-Bernardi MR, Borges MTMR, Lopes CH, Modesta RCD, Ceccato-Antonini SR. Avaliação microbiológica, físico-química e sensorial de açúcares mascavos comercializados na cidade de São Carlos – SP. *Braz J Food Technol*. 2007; 10(3):205-11.

AGRADECIMENTOS

À Fapesp pelo Auxílio Pesquisa Processo nº 07/58888-6 e Bolsa de Iniciação Científica Processo nº 07/55507-1.

20. Sarantopoulos C, Oliveira L, Canavesi E. Requisitos de conservação de alimentos em embalagens flexíveis. Instituto de Tecnologia de Alimentos. Campinas, 2001. 39-42.
21. Silva AR, Parazzi C. Monitoramento microbiológico do açúcar mascavo. In: XI Congresso de Iniciação Científica da UFSCar. Anais...São Carlos, 2003. Resumo.
22. Lopes CH, Borges MTMR. Proposta de normas e especificações para açúcar mascavo, rapadura e melado de cana. DTAiSER / Centro de Ciências Agrárias / Universidade de São Carlos 2004. 10p.
23. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial – Inmetro. Açúcar. Disponível em <http://www.inmetro.gov.br/consumidor/produtos/acucar.asp>.

***Staphylococcus aureus* portadores de genes de toxinas isolados em amostras de diferentes fontes de transmissão durante a ordenha**

Toxin gene-carrier *Staphylococcus aureus* isolated from diverse transmission sources during the milking

RIALA6/1218

Luiz Francisco ZAFALON^{1*}, Juliana Rodrigues Pozzi ARCARO², Antônio NADER FILHO³, Luciano Menezes FERREIRA⁴, Josir Laine Aparecida VESCHI⁵

* Endereço para correspondência: Embrapa Pecuária Sudeste, Pesquisa, Sanidade Animal
Rodovia Washington Luís, Km 234, Caixa Postal 339 - CEP 13560-970, São Carlos, SP, Brasil,
e-mail: zafalon@cppse.embrapa.br

¹Embrapa Pecuária Sudeste, Pesquisa / Sanidade Animal, São Carlos, SP, Brasil

²Centro de Bovinos de Leite, Instituto de Zootecnia, Nova Odessa, SP, Brasil

³Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, Brasil.

⁴Assistência Técnica Integrada, Instituto Aequitas, Araraquara, SP, Brasil

⁵Embrapa Semi Árido, Pesquisa, Sanidade Animal, Petrolina, PE, Brasil.

Recebido: 27.05.2009 – Aceito para publicação: 27.07.2009

RESUMO

No presente estudo foi analisada a bactéria *S. aureus* isolada de diferentes fontes de transmissão durante a ordenha de vacas por meio de técnica de amplificação de genes da toxina. As amostras de leite e dos óstios foram obtidas antes da ordenha dos animais e as de teteiras antes e durante a ordenha sob diferentes condições climáticas. A análise dos genes das enterotoxinas A e D e da toxina da síndrome do choque tóxico foi efetuada por meio de técnica de amplificação das respectivas sequências codificadoras. O gene *sea* foi o mais prevalente dentre os pesquisados e a maioria dos isolados foi detectada em amostras de leite de quartos mamários com mastite. A presença de genes de toxinas estafilocócicas em *S. aureus* isolados de diferentes fontes de transmissão dentro da cadeia epidemiológica da mastite bovina evidencia a possibilidade de veiculação desse micro-organismo por meio de leite contaminado e que pode representar riscos à saúde pública.

Palavras-chave. mastite, leite, Saúde Pública, genes de toxinas.

ABSTRACT

S. aureus isolated from diverse transmission sources during the cow milking was studied by amplifying the toxins genes. The milk samples and specimens from teat orifices were collected before milking, and samples from mouthpieces were collected before and during the milking procedure performed at varied climatic conditions. The study on the A to D enterotoxins genes and the toxin of toxic shock syndrome were carried out by amplifying the respective coding sequences. The *sea* gene showed to be the most prevalent among those analyzed, and the majority of isolated were detected in milk samples from mammary quarters with mastitis. The occurrence of staphylococcal toxins genes in *S. aureus* isolated from different sources of bovine mastitis epidemiological chain, evidences the feasibility of this microorganism transmission by contaminated milk, being a potential risk to public health.

Key words. mastitis, milk, Public Health, toxin gens.

INTRODUÇÃO

A ocorrência de micro-organismos que infectam os animais e são transmitidos às pessoas é preocupante, uma vez que algumas das fontes de transmissão de patógenos são importantes produtos na cadeia alimentar humana. Um destes produtos é o leite, reconhecido por ser altamente nutritivo e parte fundamental na dieta de idosos e crianças. A mastite é a principal doença que afeta os bovinos leiteiros, causada principalmente por bactérias, dentre as quais *Staphylococcus aureus*. Este micro-organismo constitui um grande problema em Saúde Pública, pois suas estirpes podem produzir enterotoxinas (SEs) e toxinas como a da “síndrome do choque tóxico” (TSST-1) que podem causar em humanos intoxicações alimentares e até desordens multissistêmicas¹.

Por ser *S. aureus* importante agente infeccioso na cadeia epidemiológica da mastite bovina, o estudo do ambiente de ordenha dos animais é salutar para a identificação das características patogênicas do micro-organismo e de medidas para o seu controle. Ações preventivas poderiam evitar a transmissão desta bactéria de um animal a outro e reduzir os riscos do agente ser transmitido pelo leite. Uma vez que as toxinas produzidas são termoestáveis e não inativadas pelas temperaturas aplicadas durante o processo de pasteurização do leite, a busca de patógenos cujos genes possam ser amplificados, como os genes das principais enterotoxinas e toxinas dentro das propriedades leiteiras, pode fornecer informações sobre a qualidade do produto que será submetido às indústrias².

Em períodos com maiores ocorrências de chuvas, as condições higiênicas do rebanho ficam comprometidas pela influência negativa da elevação dos níveis de umidade que, em conjunto com a temperatura, favorecem a sobrevivência e a proliferação dos *S. aureus*. A literatura registra que em períodos mais chuvosos ocorre um percentual menor dos *S. aureus* com sensibilidade aos princípios ativos de diversos antimicrobianos que foram testados³, quando comparados com os micro-organismos isolados em épocas com índices pluviométricos inferiores, 8,7% contra 27,3%, respectivamente, abrindo caminho para mais estudos sobre a possível maior patogenicidade deste micro-organismo em épocas chuvosas.

Como forma de acrescentar outras informações referentes à epidemiologia da mastite bovina e traçar considerações sobre a sua relação com a saúde pública, estudou-se a capacidade de amplificação de genes de toxinas por *S. aureus* em diferentes fontes de transmissão

no ambiente de ordenha de vacas em lactação, em períodos classificados de acordo com a ocorrência de chuvas.

MATERIAL E MÉTODOS

■ Localização da propriedade

O rebanho fazia parte de estabelecimento de produção leiteira localizado na região de Campinas, interior do Estado de São Paulo, composto por animais das raças Holandesa e Pardo-Suíça. O tipo de ordenha era mecânico em sistema fechado, cuja a obtenção de leite era realizada duas vezes por dia.

■ Seleção dos animais para a colheita de amostras de leite

As amostras de leite foram obtidas no decorrer de 16 meses, entre agosto de 2005 e dezembro de 2006, quando foi investigada a presença de mastite subclínica nas vacas em lactação do rebanho com a realização mensal do *California Mastitis Test* (CMT). A leitura da prova foi considerada como positiva quando era verificada a formação de viscosidade da mistura entre leite e o reagente CMT. Os casos clínicos de mastite também foram investigados, quando alterações macroscópicas do leite ou da glândula mamária eram condizentes para classificar a doença como clínica, como grumos e/ou sinais visíveis de inflamação da glândula. Durante o período em que foi realizado o estudo, o rebanho apresentou uma mediana de 52 vacas em lactação.

■ Método de colheita de leite dos quartos mamários

As amostras de leite com reação positiva ao CMT e as de quartos mamários com alterações macroscópicas da glândula mamária e/ou do leite foram colhidas de acordo com os procedimentos recomendados pelo *National Mastitis Council*⁴. Utilizou-se tubos de ensaio esterilizados para a obtenção de 2 a 5 mL da amostra de leite, em duplicatas, de cada quarto mamário, antes de iniciar a ordenha e após a antissepsia do óstio papilar com álcool etílico 70% (v/v). As amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas com refrigeração por gelo e levadas ao laboratório para isolamento e identificação bacterianos.

■ Amostras obtidas a partir dos óstios papilares

As amostras dos óstios papilares de animais que apresentaram quartos mamários reagentes ao CMT foram obtidas independentemente se todos os quartos estavam

reagentes, com o auxílio de suabe estéril, por meio da realização de movimentos circulares sobre o óstio⁵. Este procedimento foi realizado após a antissepsia efetuada pelo ordenhador. Procedeu-se o transporte das amostras com a presença de água peptonada estéril em cada tubo de ensaio.

■ Amostras originadas das teteiras

As amostras originadas das teteiras foram obtidas após a fricção de suabes estéreis, em movimentos circulares, na porção final de cada um dos quatro insufladores para cada conjunto de ordenha, em todos os conjuntos da ordenhadeira⁶. Os suabes foram transportados em tubos de vidro individuais com água peptonada estéril. As colheitas destas amostras foram realizadas em dois períodos, inicialmente quando metade dos animais haviam sido ordenhados e, em um outro momento, após o término das ordenhas.

■ Classificação dos períodos de obtenção das amostras

Os animais foram distribuídos em dois períodos, de acordo com os índices pluviométricos ocorridos na região em que a propriedade estava localizada⁷. O primeiro período foi denominado “Estação seca” ou “Período seco”, cujo índice pluviométrico máximo entre a realização de duas colheitas de amostras foi igual a 56,2 mm, com precipitação média de 27,9 mm. Por um outro lado, a “Estação chuvosa” ou “Período chuvoso” apresentou índices pluviométricos máximos que permaneceram entre 76,3 mm e 193,8 mm, com uma média de chuvas igual a 113,6 mm.

■ Isolamento e identificação de *Staphylococcus aureus* nas diferentes fontes estudadas

O leite obtido a partir dos quartos mamários foi semeado em placas de Petri com ágar base acrescentado de sangue ovino, na concentração de 5%, com o auxílio de alça de platina, enquanto as amostras obtidas a partir dos óstios e insufladores foram semeadas diretamente com os suabes utilizados nas colheitas. Todas as placas foram incubadas por um período de 18 a 24 horas, à temperatura de 37°C. Após o crescimento das colônias, elas foram submetidas à coloração de Gram, com posterior realização das provas de catalase e coagulase lenta com plasma de coelho⁸. Os cocos que demonstraram ser Gram-positivos e, posteriormente, com reações positivas nas provas da catalase e coagulase foram submetidos à prova para verificação da produção de acetoina e utilização da maltose e da trealose. As amostras positivas a estas provas foram classificadas como *S. aureus*⁹.

■ Análises moleculares das amostras

A participação de *S. aureus* na etiologia da doença foi confirmada pela extração e amplificação do DNA cromossomal específico¹⁰. Para a extração do DNA bacteriano, foi utilizado o Kit GFX Genomic Blood® (GE Healthcare, Amersham Biosciences, São Paulo, Brasil), com o protocolo de extração de DNA para bactérias Gram positivas, as soluções de lise, de extração e de lavagem e as colunas GFX de purificação. A lise bacteriana foi realizada com o auxílio de um pré-tratamento com lisozima.

O protocolo descrito por Martineau et al.¹¹ foi utilizado para a amplificação de fragmentos de DNA cromossômico específico do *S. aureus*. As reações compreenderam um volume final de 20 µL com 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada *dNTP*, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador Sa442-1 (5'- AAT CTT TGT CGG TAC ACG ATA TTC TTC ACG- 3') e Sa442-2 (5'- CGT AAT GAG ATT TCA GTA GAT AAT ACA ACA- 3'), e 0,5 U de *Taq* polimerase em amplificação do tipo *host-start*. As misturas de PCR foram submetidas à desnaturação, por três minutos, a 94 °C e, posteriormente, a 30 ciclos de um segundo, a 95 °C, para a desnaturação e 30 segundos, a 55 °C, para o pareamento e extensão dos oligonucleotídeos iniciadores. Dez microlitros do produto amplificado foram visualizados após eletroforese em gel de agarose em concentração de 2%, corado com brometo de etídio. Marcador de tamanho molecular 100 pb foi utilizado como padrão de peso molecular.

■ Amplificação dos genes das enterotoxinas dos tipos A a D e da toxina TSST-1

Utilizou-se DNAs extraídos das estirpes de *S. aureus* e armazenados a - 20 °C para a pesquisa dos genes de enterotoxinas dos tipos A a D (*sea*, *seb*, *sec* e *sed*) e da toxina da síndrome do choque tóxico (*tst*), por meio da amplificação de suas sequências codificadoras.

Segundo protocolo estabelecido por Cunha et al.¹², as reações compreenderam um volume final de 50 µL, com 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada *dNTP*, 20 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador (JOHNSON et al., 1991) *Sea*1 (5'- TTG GAA ACG GTT AAA ACG AA) e *Sea*2 (5'- GAA CCT TCC CAT CAA AAA CA); *Seb*1 (5'- TCG CAT CAA ACT GAC AAA C) e *Seb*2 (5'- GCA GGT ACT CTA TAA GTG CC); *Sec*1 (5'- GAC ATA AAA GCT AGG AAT TT) e *Sec*2 (5'- AAA TCG GAT TAA CAT TAT CC);

Sed1 (5'-CTA GTT TGG TAA TAT CTC CT) e Sed2 (5'-TAA TGC TAT ATC TTA TAG GG); Tst1 (5'-ATG GCA GCA TCA GCT TGA TA) e Tst2 (5'-TTT CCA ATA ACC ACC CGT TT), 0,5 U de *Taq* polimerase em amplificação do tipo *host-start*, com a utilização de 5 µL de DNA de cada estirpe identificada genotipicamente como pertencente à espécie *S. aureus*.

As misturas de PCR foram submetidas a um primeiro ciclo de 94 °C por quatro minutos, à desnaturação a 94°C por dois minutos, pareamento a 55 °C por um minuto e 30 segundos e extensão dos oligonucleotídeos iniciadores a 72°C por um minuto e 30 segundos, seguido por um segundo ciclo de desnaturação a 94 °C por dois minutos, pareamento a 53 °C por um minuto e 30 segundos e extensão a 72 °C por um minuto e 30 segundos. No terceiro ciclo, a temperatura de pareamento foi reduzida a 51 °C, seguido por mais 37 ciclos a 94 °C por dois minutos, 51 °C por um minuto e 30 segundos e 72 °C por um minuto e 30 segundos. No final dos 40 ciclos, os tubos foram incubados a 72°C por sete minutos e a 4 °C até o momento de retirada do termociclador.

Dez microlitros do produto amplificado foram visualizados após eletroforese (150 V por 1 h e 30 min) em gel de agarose, em concentração de 2%, corado com brometo de etídio. Após leitura em fotodocumentador, os produtos amplificados foram comparados com marcador de tamanho molecular 100 pb.

■ Teste de sensibilidade a antimicrobianos

Os isolados foram submetidos aos testes de sensibilidade *in vitro* a partir da técnica de difusão em disco¹³ em placas de ágar Mueller-Hinton, frente a 12 antimicrobianos representados pela gentamicina (10 µg), penicilina (10 UI), oxacilina (1 µg), tetraciclina (30 µg), cefepime (30 µg), cloranfenicol (30 µg), eritromicina (15 µg), sulfazotrim (25 µg), vancomicina (30 µg), clindamicina (2 µg), ciprofloxacina (5 µg) e rifampicina (5 µg). A aferição dos halos de inibição formados em torno dos respectivos princípios ativos foi realizada segundo o preconizado pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS)¹⁴.

■ Contagem de células somáticas do leite

As amostras de leite para a CCS foram obtidas no mesmo dia em que foram retiradas as amostras de leite para o exame microbiológico, com prévio acondicionamento em frascos plásticos com capacidade para 60 mL, com

a adição de duas pastilhas de bronopol. A determinação celular foi efetuada por contador eletrônico (Somacount 300, Bentley Instruments).

■ Análise estatística

O teste de Kruskal-Wallis, complementado pelo teste de Dunn foi utilizado para verificar a relação existente entre a CCS do leite dos quartos mamários com mastite e a produção de genes de toxinas por *S. aureus*. Os isolamentos dos micro-organismos nas diferentes fontes pesquisadas, de acordo com os índices pluviométricos, assim como a presença dos genes pesquisados foram comparados com a utilização do teste exato de Fisher¹⁵.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A incidência real dos casos de intoxicação estafilocócica no Brasil é difícil de ser conhecida, pois a doença não é de notificação compulsória. Porém, é de senso comum que o leite de vacas com mastite ou os manipuladores envolvidos com a ordenha dos animais podem estar envolvidos na epidemiologia da doença¹⁶. Apesar de outros estafilococos também produzirem enterotoxinas, *S. aureus* mostra-se como o mais importante agente desencadeador das intoxicações estafilocócicas¹⁷. Existem em torno de 20 sorotipos antigênicos de toxinas em *S. aureus*¹⁸, que podem ser divididas em subtipos, de acordo com as suas características imunológicas e físico-químicas, como por exemplo a EEC¹⁹.

S. aureus foi identificado como participante na etiologia infecciosa da mastite bovina em todas as colheitas de amostras de leite que foram realizadas na propriedade, sempre como o mais prevalente quando comparado com outros micro-organismos identificados (dados não tabelados). Dentre as prevalências mensais, a maior foi encontrada em período imediatamente posterior a épocas em que ocorreram grandes quantidades de chuvas no local de estudo.

Na Tabela 1 foram distribuídas as estirpes de *S. aureus* isoladas, de acordo o local e o período em que foram obtidas.

Um total de 245 estirpes de *S. aureus* foram identificadas, dentre as quais 61,2% originaram-se de leite, 26,5% de óstios e 12,2% das teteiras. Dentre as estirpes investigadas, houve predominância das que se originaram de amostras de leite em ambos os períodos classificados de acordo com a ocorrência de chuvas, o “chuvoso” e o “seco” (63,2% e 58,7%, respectivamente). Por um outro

lado, ocorrências inferiores foram encontradas nas teteiras em ambos os períodos, com 13,2% e 11,0% dentre o total de isolados para os períodos “chuvoso” e “seco”, respectivamente. Apesar do número inferior de micro-organismos nas teteiras, em ambos os períodos estudados não foi verificada diferença significativa entre a quantidade de isolados nas diferentes origens pesquisadas, seja para a comparação feita entre leite e óstios ($P=0,2983$) como para a comparação dos valores encontrados para leite e teteiras ($P=0,8417$) e óstios e teteiras ($P=0,3809$).

O fato de ser encontrada uma maior quantidade de isolados no leite não necessariamente significa que esta fonte de transmissão do micro-organismo é a mais importante, uma vez que as relações epidemiológicas existentes entre o patógeno e o ambiente onde ele é encontrado são diferentes. Entretanto, a participação do hospedeiro, representado pelo animal em lactação e a sua capacidade de resposta à invasão e multiplicação do agente infeccioso na glândula mamária, tem um papel importante na epidemiologia da doença.

Tabela 1. *Staphylococcus aureus* identificados de acordo com a origem e o período de ocorrência de chuvas em propriedade leiteira da região de Campinas, SP.

Origem	Períodos de obtenção das amostras					
	Chuvoso		Seco		Total	
	n ¹	%	n	%	n	%
Leite	86	63,2	64	58,7	150	61,2
Óstios	32	23,5	33	30,3	65	26,5
Teteiras	18	13,2	12	11,0	30	12,2
Total	136	100,0	109	100,0	245	100,0

¹ Número de isolados.

Tabela 2. Distribuição das estirpes de *Staphylococcus aureus* de acordo com a amplificação dos genes e a ocorrência de chuvas.

Genes	Origem											
	Leite				Óstios				Teteiras			
	A ¹		B ²		A ¹		B ²		A ¹		B ²	
Genes	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
sea	6	50,0	10	62,5	4	66,7	8	66,7	2	40,0	5	83,3
seb	2	16,7	1	6,2	1	16,6	-	-	1	20,0	1	16,7
sec	-	-	3	18,8	-	-	2	16,6	1	20,0	-	-
tst	1	8,3	2	12,5	1	16,6	2	16,6	1	20,0	-	-
sed	1	8,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
sea + sed	1	8,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
seb + tst	1	8,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	12	100,0	16	100,0	6	100,0	12	100,0	5	100,0	6	100,0

1. A: Estação chuvosa (índices pluviométricos máximos entre 76,3 mm e 193,8 mm, precipitação média de 113,6 mm);

2. B: Estação seca (índice pluviométrico máximo de 56,2 mm, com precipitação média de 27,9 mm).

A Tabela 2 apresenta a distribuição de *S. aureus* e a ocorrência dos genes de toxinas amplificados dentre os pesquisados (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *tst*), nos dois períodos classificados pela ocorrência de chuvas.

Todos os genes pesquisados foram amplificados em micro-organismos isolados em amostras de leite de maneira isolada e, em duas ocasiões, houve co-amplificação de *sea* com *sed* e *seb* com *tst*. Em micro-organismos isolados nas amostras de óstios e teteiras, *sed* não foi amplificado. O gene *sea* foi o de maior prevalência em todas as origens e nas duas estações climáticas, chuvosa e seca (35/57), porém nenhuma diferença estatística foi encontrada quando comparou-se a presença deste gene com a dos outros que foram identificados. Também observou-se que a maioria das estirpes em que se identificou genes de toxinas foram isoladas em amostras de leite de quartos mamários com a mastite (28/57), provavelmente pela maior quantidade de isolados estudados nesta fonte de transmissão.

Diferentemente dos achados contidos neste trabalho, existe relato de não detecção de *sea* em *S. aureus* oriundos de humanos, leite bovino mastítico ou leite do tanque, utilizando-se a ausência do gene para a defesa da tese de *S. aureus* em leite bovino ter uma baixa possibilidade de estar envolvido em intoxicações alimentares estafilocócicas²⁰. Do mesmo modo, outros autores²¹ defendem que estafilococos enterotoxigênicos parecem não ser encontrados com tanta frequência, após o acompanhamento que foi realizado em 20 propriedades e não serem encontrados estes micro-organismos em 15 delas, quando estudado o leite de quartos mamários com mastite ou do tanque de expansão dos estabelecimentos de produção leiteira. Houve relato²² de *S. aureus* que foram obtidos de amostras de leite de quartos mamários com mastite bovina, dentre os quais apenas quatro isolados (6,03%) co-amplificaram os genes *sea* e *seb*, enquanto dois (3,1%) foram positivas para o gene *sec*, em estudo que investigou estes três tipos de genes.

Apesar disso, outros trabalhos demonstram que a dificuldade em encontrar estafilococos produtores de toxinas ou que expressam genes para estas não é uma regra. Dentre 127 amostras de *S. aureus* isoladas de casos de mastite clínica e subclínica, obtidas em 23 municípios do Estado de Minas Gerais, a TSST-1 foi a toxina mais produzida, sendo identificada em 60 amostras (47% do total), seguida pela SED (30%) e a SEB (19%)²³.

Ao ser estudada a codificação dos genes para enterotoxinas em amostras de leite de tanques de expansão

de cinco fazendas em Assis, Estado de São Paulo, *sea* foi o mais frequente (16/41,0%), seguido pelo *sec* (8/20,5%), *sed* (5/12,8%), *seb* (3/7,7%) e *see* (2/5,1%). Entre os genes codificadores para outras enterotoxinas, *seg* foi o mais frequentemente observado (11/28,2%), seguido pelo *sei* (10/25,6%) e por *seh* e *sej*, estes dois últimos com três ampliações (7,7%)²⁴. Os resultados encontrados na propriedade estudada demonstraram que 26 dentre o total de 28 cepas originadas do leite apresentaram somente um gene enterotoxigênico, um porcentual superior ao encontrado na região de Assis, São Paulo, 92,9% contra 64,1%.

O teste para os genes das enterotoxinas (*ent*) e TSST-1 (*tst*) foi realizado em 132 cepas de *S. aureus* e 90 isolados (68,2%) foram positivos para um ou dois genes. Dentre os isolados positivos, 61 (67,8%) o foram para *entA*, 30 (33,3%) para *entB*, 5 (5,6%) para *entC2* e 38 (42,2%) para *tst*. Além disso, 33 (36,7%) co-amplificaram os genes *entA* e *tst*. Nenhum dos 90 *S. aureus* conduziam os genes *entD* e *entE*²⁵.

Sugere-se uma relação entre a produção de TSST-1 e a severidade dos casos de mastite, devido a possibilidade desta representar um fator de virulência em casos mais graves da doença^{16,23}. Entretanto, é mais fácil tentar estabelecer esta relação com aferições do momento em que as amostras são obtidas, devido a dificuldade de obtenção de um histórico dos animais acometidos pela doença, já que, muitas vezes, as amostras de leite chegam para a análise laboratorial sem a descrição do processo infeccioso no animal, assim como dos sinais inflamatórios apresentados, caso existirem.

Van Leeuwen et al.²⁶ pesquisaram dez genes virulentos em amostras humanas e veterinárias. O gene codificador da proteína da síndrome do choque tóxico (*tst*) foi mais frequentemente encontrado entre amostras veterinárias ($P < 0,0001$) e, principalmente, nas amostras relacionadas com a mastite bovina ($P < 0,0001$), quando comparadas com amostras oriundas de humanos. No presente trabalho, *tst* foi encontrado em isolados de leite, óstios e teteiras (7/57) e co-amplificado com *seb* em um isolado originado de amostra de leite de quarto mamário com mastite.

A intoxicação causada por estafilococos pode ocorrer após o consumo de alimentos contaminados com os micro-organismos que podem produzir as toxinas, assim como depois do consumo de alimentos com as enterotoxinas já formadas. A questão representativa do risco à saúde da população é que as toxinas são

caracterizadas por resistirem à pasteurização. A intoxicação após a ingestão do alimento com a toxina apresenta um período de incubação que pode variar de 30 minutos até oito horas, em média duas a quatro horas. Entre os sintomas estão desde vômitos, diarreia e dores abdominais, até sudorese, cãibras, dores de cabeça, calafrios, redução da pressão arterial e até febre, na dependência da quantidade de toxina ingerida²⁷.

De acordo com o exposto no parágrafo anterior, mostra-se preocupante a presença de genes de enterotoxinas em fontes relacionadas com a cadeia epidemiológica da mastite bovina. Constante é a preocupação com o leite cru contaminado e a sua utilização na fabricação de queijos, um dos principais subprodutos originados do leite. Existem relatos de presença de *Staphylococcus* spp. enterotoxigênicos em queijo artesanal e industrial, supondo-se que o tratamento térmico do leite possa ser, em alguns casos, ineficiente ou que possa ocorrer contaminação após o tratamento, devido à manipulação ou contato com superfícies não sanitizadas²⁸.

Apesar de ser incerto o fato de todas as amostras gene-positivas poderem causar um processo de intoxicação alimentar, a existência destes genes em *S. aureus* é necessária para que estas amostras causem este processo²⁵. Dessa maneira, a técnica de PCR permite a detecção do potencial genético para a produção de enterotoxinas, o que a torna útil tanto como um teste de triagem como para a confirmação destas. Desde que o estudo relacionado com enterotoxinas estafilocócicas tenha uma razão epidemiológica, estafilococos gene-positivos para toxinas podem ser considerados produtores de toxinas quando a produção de toxinas *in vivo*, por exemplo durante a infecção, não pode ser conduzida²⁹.

Devido a importância destas toxinas em saúde pública e no setor alimentício, um eficiente teste de triagem para detectar a prevalência de amostras enterotoxigênicas é fundamental³⁰, não apenas no derivado lácteo processado mas também dentro da propriedade leiteira.

Situações como a presença do gene e a não produção de níveis detectáveis de toxinas podem ocorrer devido a um baixo nível de produção de enterotoxina, com limites de detecção não alcançados por um ensaio imunológico. Uma vez que a produção de enterotoxinas por estafilococos pode ser afetada pelas condições de crescimento usadas, como a quantidade de inóculo, temperatura, atividade de água e o pH, é possível que em algumas ocasiões as condições de cultura especificadas para o ensaio imunológico sejam subótimas para a expressão do gene. Por um outro

lado, os genes podem não ser expressos devido a mutações nas regiões de codificação ou regulatória²⁵.

Em períodos mais chuvosos, uma maior amplitude de genes foi encontrada em leite e teteiras, quando comparou-se com períodos de menor ocorrência de chuvas. Nos dois isolados em que foram co-amplificados genes, verificou-se que o período de obtenção foi o classificado como chuvoso (Tabela 2).

Concomitantemente ao estudo das toxinas, os perfis de resistência das cepas de *S. aureus* foi pesquisado e houve uma menor variabilidade dos perfis de resistência quando o gene presente era *sea*. Especificamente no caso deste gene, para cada 4,8 amostras, apareceu um perfil diferente de resistência aos antimicrobianos. Para o *seb*, encontrou-se um perfil diferente para cada 1,2 amostra e *sec* verificou-se um perfil diferente para cada 1,5 amostra. Com relação ao *tst*, foi encontrado um perfil diferente para cada 1,1 amostra.

O perfil de resistência à penicilina foi o mais encontrado, proporcionalmente, em amostras com o gene da toxina "A" (48,3%), seguindo-se *seb*, *tst*, e *sec* (33,3%, 25,0% e 16,7%, respectivamente), diferentemente de outros autores²¹ que relataram que todos os isolados com amplificação de *seb* apresentaram resistência a este princípio ativo. Por um outro lado, os achados desta pesquisa demonstraram que o perfil de sensibilidade a todos os princípios ativos testados foi superior para aquelas cepas em que foi amplificado *sec* (50%). Micro-organismos com o gene para TST foram aqueles que apresentaram o maior número de amostras com resistência à oxacilina (37,5%), enquanto para *sea*, *seb* e *sec* os percentuais variaram de 13,8 a 16,7%.

O estudo da correlação entre a produção de enterotoxinas e a resposta celular verificada pela CCS¹⁶ revelou que, quando estas eram detectadas, as amostras eram oriundas de quartos mamários com contagem superior a 1.000.000 células.mL⁻¹, sugerindo-a como um possível fator de virulência para este agente, apesar da ausência de diferença estatística após a análise dos valores, levando os autores a comentarem sobre a possível presença de outros fatores que podem interferir na contagem celular, além da capacidade de produção de toxinas por parte dos patógenos.

Efetou-se a contagem de células somáticas (CCS) do leite de 25 dentre 28 quartos mamários onde foram isolados *S. aureus* que expressaram genes para as toxinas. A CCS média do leite dos quartos com isolamento de *S. aureus* que expressaram *sea* foi de 551.000 células.mL⁻¹

(n=13), enquanto para aquelas cepas que expressaram *seb*, *sec* e *sed*, as CCS foram, respectivamente, 372.000 células.mL⁻¹ (n=3); 640.000 células.mL⁻¹ (n=3); e 4.050.000 células.mL⁻¹ (n=1). A CCS média foi igual a 1.085.000 células.mL⁻¹ para as cepas com expressão de *tst* (n=4) e 4.000.000 células.mL⁻¹ para a cepa que expressou os genes *seb* e *tst* em conjunto. Ao se dividir as CCS em quatro classes (até 200.000; 200.001 a 500.000; 500.001 a 750.000; >750.000 células.mL⁻¹), não houve diferença estatística (P=0,5498) ao ser comparada a CCS de acordo com a presença do gene. Apesar disso, mais estudos precisam ser realizados para a verificação da relação entre a CCS, uma medida da reação inflamatória da glândula mamária contra o invasão bacteriana, e as toxinas ou os seus genes.

Há uma grande controvérsia sobre o papel das enterotoxinas durante o processo infeccioso causado pelo *S. aureus* nos casos de mastite bovina. A *sec* e a *sed* parecem ser as mais importantes nas infecções intramamárias, já que induzem a liberação de fatores inflamatórios¹⁸. A indução destes fatores poderia levar a uma resposta mais acentuada por parte da glândula afetada e, conseqüentemente, acarretar uma CCS mais elevada. Apesar da pequena quantidade de quartos mamários acompanhados, no presente trabalho foi observado que a CCS daquelas glândulas em que foram isolados *S. aureus* com amplificação de *sec* e *sed* foi superior à CCS do leite das glândulas mamárias infectadas por micro-organismos que amplificaram *sea* e *seb*.

Quando foi analisada a associação entre genes de virulência de *S. aureus* e a presença de mastite subclínica, relatou-se o papel do gene *sej* como um dos fatores de risco. Isolados que abrigavam o gene *sej* também foram positivos para *sed*, sugerindo a possibilidade da virulência das amostras que albergam ambos os genes ser mais alta quando comparada à virulência das amostras que albergam somente o gene *sed*³¹

As enterotoxinas produzidas por *S. aureus* podem estar relacionadas com o agravamento das doenças causadas pelo micro-organismo, além da sua habilidade de causar intoxicação alimentar. Neste sentido, já foram identificados isolados que produziram as enterotoxinas C e a TSST-1 em vacas que não conseguiram responder positivamente ao tratamento contra a mastite. Além disso, amostras bacterianas isoladas em glândula mamária bovina e que secretaram TSST-1, induziram a liberação de citocinas com o conseqüente estabelecimento de um processo inflamatório do tecido mamário ou a cronicidade da mastite. A triagem de enterotoxinas em isolados

bacterianos causadores de mastite nos animais em lactação pode ser de importância para estabelecer se amostras produtoras de enterotoxinas estão associadas com casos mais severos da doença ou com casos em que o tratamento não é eficaz, além da importância no contexto de saúde pública e segurança alimentar³².

Sugere-se que a produção simultânea de mais de uma toxina pode elevar os seus efeitos deletérios isolados e, conseqüentemente, atuar na patogenia das infecções intramamárias causadas por *S. aureus*. Por exemplo, resistência a mais de um antimicrobiano poderia existir em amostras produtoras de mais de um tipo de toxina³³.

A importância do estudo das características dos isolados de *S. aureus* em outras fontes, além do leite dos quartos mamários doentes, reside na possibilidade da existência de portadores de *S. aureus* que facilitam a transmissão dessas bactérias entre animais de um mesmo ambiente, inclusive pelas mãos do ordenhador e de utensílios destinados à ordenha, tais quais as teteiras³⁴. Quando há normas higiênicas de manejo de ordenha mal conduzidas, o papel de transmissão destes agentes pelos portadores torna-se preocupante.

CONCLUSÃO

A presença de genes de toxinas estafilocócicas em *S. aureus* isolados em diferentes fontes de transmissão dentro da cadeia epidemiológica da mastite bovina evidencia a possibilidade de veiculação deste micro-organismos pelo leite, ocasionando riscos à saúde pública.

AGRADECIMENTO

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – Processo 05/53856-3.

REFERÊNCIAS

1. Akineden O, Annemuller, C, Hassan AA, Lammler C, Wolter W, Zschock M. Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. *Clin Diag Lab Immunol*. 2001; 8 (5): 959-64.
2. Sabour PM, Gill JJ, Lepp D, Pacan JC, Ahmed R, Dingwell R et al. Molecular typing and distribution of *Staphylococcus aureus* isolates in Eastern Canadian Dairy Herds. *J Clin Microbiol*. 2004; 42 (8): 3449–55.

3. Zafalon LF, Langoni H, Benvenuto F, Castelani L, Broccolo CR. Aspectos epidemiológicos da mastite bovina causada por *Staphylococcus aureus*. *Vet Zootec*. 2008;15(1):56-65.
4. Harmon RJ, Eberhart RJ, Jasper DE, Langlois BE, Wilson RA. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection. Arlington (VA): National Mastitis Council; 1990.
5. Ingawa K, Adkinson R, Gough R. Evaluation of gel teat cleaning and sanitizing compound status of the goat udder. *J Dairy Res*. 1992; 59: 21-8.
6. McDonald J, Kinsel ML, Adams DS, Darlington R.L. Studying the effect of backflushing milking units. *Vet Med*. 1993; 88: 382-6.
7. CIIAGRO. Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas. Instituto Agronômico de Campinas, Campinas.[acesso em 2006] Disponível em: <<http://ciiagro.iac.sp.gov.br/ciiagroonline/>>.
8. Holmberg O. *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine milk. *Acta Vet Scand*. 1973; 45: 1-144.
9. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. Gram-positive cocci. In: Bergey's Manual Of Determinative Bacteriology. 9th ed. Baltimore: Ed. Williams e Wilkins; 1994. p. 544-51.
10. Ferreira LM, Nader Filho A, Oliveira E, Zafalon LF, Souza V. Variabilidade fenotípica e genotípica de estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas em casos de mastite subclínica bovina. *Cien Rural*. 2006; 36 (4): 1228-34.
11. Martineau F, Picard FJ, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 1998; 36: 618-23.
12. Cunha MLRS, Calsolari RAO, Araújo Júnior JP. Detection of enterotoxin and Toxic Shock Syndrome Toxin 1 genes in *Staphylococcus*, with emphasis on coagulase-negative *Staphylococci*. *Microbiol Immunol*. 2007; 51 (4): 381-90.
13. Bauer AW, Kirby WMM, Truck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am J Clin Pathol*. 1966; 45: 493-6.
14. NCCLS. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 15th Informational Supplement. 2005, 25 (1): 177p.
15. SAMPAIO, I.B.M. Estatística aplicada à experimentação animal. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221p.
16. Sá MEP, Cunha MLRS, Elias AO, Langoni H. Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas. *Braz Journal Vet Res Anim Sci*. 2004; 41 (5): 320-6.
17. Pereira ML, Pereira JL, Serrano AM, Bergdoll MS. Estafilococos: até onde sua importância em alimentos? *Hig Aliment*. 2000; 14 (68-69): 32-40.
18. Gómez C, Pinal L, Franco J, Carrillo JM, Ramírez J. Identification of *Staphylococcus aureus* strains negative for enterotoxins A, B and C isolated from bovine mastitis in México. *Vet Immunol Immunopathol*. 2007; 117: 249-53.
19. Silva WP, Gandra EA. Estafilococos coagulase positiva: patógenos de importância em alimentos. *Hig Aliment*. 2004; 18 (122): 32-40.
20. Hata W, Katsuda K, Kobayashi H, Nishimori K, Uchida I, Higashide M et al. Bacteriological Characteristics of *Staphylococcus aureus* Isolates from Humans and Bulk Milk. *J Dairy Sci*. 2008; 91 (2): 564-9.
21. Peles F, Wagner M, Varga L, Hein I, Rieck P, Gutser K et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine milk in Hungary. *Int J Food Microbiol*. 2007; 118:186-93.
22. Silva ER, Carmo LS, Silva N. Detection of the enterotoxins A, B, and C genes in *Staphylococcus aureus* from goat and bovine mastitis in Brazilian dairy herds. *Vet Microbiol*. 2005; 106:103-7.
23. Silva N, Cardoso HFT, Sena MJ, Carmo LS. Produção da toxina-1 da síndrome do choque tóxico por *Staphylococcus aureus* isolados de leite bovino em Minas Gerais. *Revista Nappgama* 1999; 2 (5):12-4.
24. Rall VLM, Vieira FP, Rall R, Vieitis RL, Fernandes Jr A, Candeias JMG et al. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw and pasteurized milk. *Vet Microbiol*. 2008; 132: 408-13.
25. Chapaval L, Moon DH, Gomes JE, Duarte FR, Tsai SM. Use of PCR to detect classical enterotoxins genes (*ent*) and toxic shock syndrome toxin-1 gene (*tst*) in *Staphylococcus aureus* isolated from crude milk and determination of toxin productivities of *S. aureus* isolates harboring these genes. *Arq Inst Biol*. 2006; 73 (2): 165-9.
26. Van Leeuwen WB, Melles DC, Alaidan A, Al-Ahdal M, Boelens HAM, Sniijders SV et al. Host- and tissue-specific pathogenic traits of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 2005; 187 (13): 4584-91.
27. Brabes KCS, Carvalho EP, Dionísio FL, Pereira ML, Garino Júnior F, Costa EO. Participação de espécies coagulase positivas e negativas produtoras de enterotoxinas do gênero *Staphylococcus* na etiologia de casos de mastite bovina em propriedades de produção leiteira dos Estados de São Paulo e Minas Gerais. *Revista Nappgama* 1999; 2 (3): 4-11.
28. Guedes Neto LG, Veras JF, Sena MJ, Cerqueira MMOP, Santos WLM, Souza MR et al. Isolamento e identificação de *Staphylococcus* spp. e suas enterotoxinas de amostras de queijo de coalho produzidos em Pernambuco, Brasil. *Hig Aliment*. 2005; 19 (130) (encarte eletrônico).
29. Vieira-da-Motta O, Folly MM, Sakyiama CCH. Detection of different *Staphylococcus aureus* strains in bovine milk from subclinical mastitis using PCR and routine techniques. *Braz J Microbiol*. 2001; 32:27-31.
30. Morandi S, Brasca M, Lodi R, Cremonesi P, Castiglioni B. Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products. *Vet Microbiol*. 2007; 124:66-72.
31. Zecconi A, Cesaris L, Liandris E, Dapra V, Piccinini R. Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. *Microb Pathogen*. 2006; 40: 177-83.
32. Kenny K, Reiser RF, Bastida-Corcuera FD, Norcross NL. Production of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 1993; 31 (3): 706-7.
33. Fagundes, H, Oliveira, CAF. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. *Cien Rural*. 2004; 34 (4): 1315-20.
34. Araújo WP. Fagotipagem de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos, isoladas de leite. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 1998; 35 (4): 161-5.

Validação intralaboratorial de metodologia quantitativa para determinação de L-fenilalanina em farinha de trigo por espectrofotometria derivada segunda

Single-laboratory validation of a quantitative methodology for determination of L-phenylalanine in wheat flour by second derivative spectrophotometry

RIALA6/1219

Raquel Linhares CARREIRA¹, Camila Salles RAMOS¹, Lidiane Amorim MUNDIM¹, Letícia Gonçalves LIMA¹, Scheilla Vitorino Carvalho de SOUZA², Marialice Pinto Coelho SILVESTRE^{1*}

Endereço para correspondência: Laboratório de Bromatologia-Pesquisa, Departamento de Alimentos Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Presidente Antônio Carlos, 6627, CEP 31.270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil.
e-mail: malice@farmacia.ufmg.br

¹Laboratório de Bromatologia-Pesquisa, Departamento de Alimentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais,.

²Regra Consultoria e Projetos Ltda.

Recebido: 23.07.2009 – Aceito para publicação: 31.08.2009

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi validar um método quantitativo para determinação de L-fenilalanina (Fen) em farinha de trigo por espectrofotometria derivada segunda. A amostra de farinha de trigo, na quantidade de 0,525g, foi submetida à hidrólise ácida com HCl a 5,7 mol/L, a 110 °C, por 24 h. O material hidrolisado foi reconstituído para 50 mL com tampão fosfato de sódio a 0,1 mol/L, pH 7,0. As soluções preparadas a partir dessa amostra foram submetidas às leituras de absorvância, entre 230 nm e 280 nm, em espectrofotômetro UV/VIS. Os espectros de derivada segunda foram traçados e os valores das áreas dos picos negativos foram utilizados para estimar os teores de Fen. A linearidade do método foi demonstrada na faixa de 0,010 mg/mL a 0,035 mg/mL (correspondente a teores de 251 mg/100g a 877 mg/100g de Fen em farinha de trigo). Efeitos de matriz foram observados. A determinação de Fen não sofreu interferência de compostos como L-tirosina e L-triptofano. As porcentagens de recuperação variaram de 81 % a 118 % e os desvios padrão relativos de repetitividade e reprodutibilidade parcial foram respectivamente 11 % e 15 %, para amostras contendo 354 mg/100g, demonstrando adequada recuperação e precisão do método. Os limites de detecção e quantificação foram, respectivamente, 63 mg/100g e 175 mg/100g. Os parâmetros de desempenho estudados indicaram adequação do método para o monitoramento e controle de teores de Fen em farinha de trigo.

Palavras-chave. L-fenilalanina, farinha de trigo, espectrofotometria derivada segunda, validação de métodos.

ABSTRACT

The aim of this paper was the validation of a methodology for determination of L-phenylalanine (Phe) in wheat flour by second derivative spectrophotometry. For this purpose, 0.525g of wheat flour was hydrolyzed with HCl 5.7 mol/L at 110 °C for 24 h. This material was diluted to 50 mL with 0.1 mol/L sodium phosphate buffer, pH 7.0. The solutions prepared from this hydrolyzed were measured on UV/VIS spectrophotometer at wavelength range from 230 nm to 280 nm. The second derivative spectrophotometry's spectra were plotted and the values of the negatives peaks areas were used for estimating the Phe contents. Linearity was demonstrated in the range of 0.010 mg/mL to 0.035 mg/mL (corresponding to 251 mg/100g to 877 mg/100g of Phe in flour). Matrix effects were observed. The Phe determination was not affected by similar compounds such as L-tyrosine and L-tryptofan. The recoveries ranged from 81 % to 118 % and the relative standard deviation under repetitivity and within-reproducibility conditions were 11 % and 15 %, respectively, for samples at 354 mg/100g, showing the adequate recovery and precision of the methodology. The limits of detection and quantification were 63 mg/100g and 175 mg/100g, respectively. The studied parameters indicated that this methodology is suitable for monitoring and controlling of Phe contents in wheat flour

Key words. L-phenylalanine, wheat flour, derivative spectrophotometry, method validation.

INTRODUÇÃO

A Fenilcetonúria (PKU) é uma desordem autossomal recessiva, causada pela deficiência ou ausência da atividade da enzima fenilalanina hidroxilase (PAH), resultando em redução ou ausência da conversão da L-fenilalanina (Fen) em L-tirosina e, conseqüentemente, no aumento da produção de metabólitos, tais como, fenilactato, piruvato, ortohidroxi-fenilacetato e feniletilamina^{1,2,3}. O acúmulo desses metabólitos anormais e de Fen no plasma podem ocasionar graves conseqüências no sistema nervoso central, ainda durante a infância, assim como falhas no andar ou falar, tremor, microcefalia, falhas no crescimento e retardo mental, progressivo e irreversível^{2,3}.

O tratamento da PKU é basicamente dietético e consiste na redução dos níveis plasmáticos elevados de Fen para concentrações consideradas não lesivas ao sistema nervoso, de acordo com a faixa etária do paciente^{2,3,4,5}. Esta dieta pobre em Fen deve ser iniciada até o terceiro mês de vida do recém-nascido e mantida por toda a vida^{3,6,7,8}.

Dentro do grupo de erros inatos do metabolismo de aminoácidos, a PKU é a manifestação clínica mais encontrada³. A PKU acomete aproximadamente 1:8.000 recém-nascidos na Europa Ocidental, em média 1:10.000 nos Estados Unidos, mas é muito mais rara em japoneses e quase desconhecida em africanos. Já no Brasil, a incidência é de uma criança fenilcetonúrica a cada 15.000 recém-nascidos, ocorrendo variações de prevalência de acordo com a região geográfica^{1,4,5}.

Os produtos designados para grupos especiais de consumidores, como os fenilcetonúricos, devem apresentar, de forma bem especificada, o teor dos componentes cuja ingestão deve ser controlada. Para isto, a dosagem de Fen nos alimentos deve ser realizada empregando-se métodos analíticos confiáveis⁹.

Várias técnicas podem ser utilizadas para dosar o teor de Fen nos alimentos, tais como analisador de aminoácidos, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)^{9,10,11}, pelo emprego de um sensor enzimático de membrana, "enzyme membrane sensor"⁸, CLAE hidrofílica¹² e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)⁹.

A espectrofotometria derivada segunda (EDS) é uma técnica analítica simples, rápida e de custo baixo, considerada, por vários autores, como um método quantitativo e qualitativo vantajoso, de grande utilidade. Baseia-se na derivação do espectro de absorção normal dos compostos analisados^{13,14,15,16}.

Ichikawa e Hiroshi^{17,18,19,20} relataram a eficiência da EDS para medir Fen em proteínas ou em hidrolisados proteicos. Estes autores, primeiramente, examinaram resíduos de Fen em proteínas e demonstraram que entre 245 nm e 270 nm os resíduos de aminoácidos de L-tirosina e L-triptofano não interferiram significativamente nas propriedades da Fen. Dois anos mais tarde, determinaram Fen, por esta técnica, em proteínas desnaturadas, encontrando resultados que concordavam com os descritos na literatura. Vários autores têm relatado a grande confiabilidade do uso da EDS, nesta faixa de comprimento de onda, para quantificar os resíduos de Fen em proteínas, desde que variáveis como o pH e a adição de outras substâncias sejam controladas^{13,15,16,17,19,20,21,22,23}.

Ressalta-se, ainda, que no laboratório onde o presente trabalho foi desenvolvido, a EDS foi utilizada, com êxito, para a avaliação do grau de exposição²⁴ e para a quantificação de Fen em diversos hidrolisados proteicos^{25,26,27,28,29}.

A farinha de trigo ocupa um lugar relevante na alimentação do brasileiro, com grande utilização no preparo de alimentos, tanto em nível doméstico quanto industrial. Entretanto, sua introdução na alimentação de fenilcetonúricos é restrita, e depende do nível de Fen no soro destes pacientes, pois faz parte dos alimentos de uso proibido para PKU³⁰. Neste sentido, a confiabilidade dos resultados das determinações dos teores Fen em farinhas é determinante para que este alimento seja utilizado de maneira segura nas dietas de fenilcetonúricos.

Apesar de fundamentais para a garantia da confiabilidade dos resultados de ensaios, as validações de métodos ainda têm sido reconhecidas como um dos pontos críticos em sistemas de gestão da qualidade laboratoriais³¹. Processos de validação que fornecem parâmetros de desempenho, indicando adequação para uso de um determinado método, têm dominado as aplicações práticas. Todavia, considerando que estudos de validação são fundamentalmente baseados em testes de hipóteses estatísticas, procedimentos de validação também devem fornecer uma verificação básica de que as premissas, feitas com relação aos princípios destes testes, não sejam violadas³².

Considerando que não existem relatos na literatura sobre o emprego da EDS para a quantificação de Fen em farinha de trigo, bem como, sobre a validação de métodos quantitativos para a análise de Fen em farinha de trigo ou outros alimentos por EDS ou outras técnicas, este trabalho objetivou a validação intralaboratorial de

um método de ensaio com propósito de quantificação de Fen em farinha de trigo por EDS.

MATERIAL E MÉTODOS

■ Amostras

Foram utilizados 5 pacotes de farinha de trigo tipo I, contendo 1 kg cada, amostrados aleatoriamente e adquiridos em um único comércio de Belo Horizonte, MG, Brasil. Estas amostras da mesma marca e lote foram devidamente homogeneizadas, por quarteamento, e armazenadas em frascos de vidros, devidamente identificados e hermeticamente fechados, sob refrigeração entre 2 °C e 8 °C.

■ Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

Soluções estoque de L-fenilalanina, L-tirosina e L-triptofano de 0,001 mol/L

As soluções estoque de aminoácidos foram preparadas por pesagem (balança analítica eletrônica, Hangping, FA2004, Shanghai, China) e dissolução de 0,0041 g, 0,0045 g e 0,0051 g dos respectivos padrões de Fen, L-tirosina e L-triptofano (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) para 25 mL de tampão fosfato de sódio a 0,1 mol/L, pH 7,0, em balão volumétrico. Estas soluções foram preparadas no mesmo dia dos ensaios, sendo mantidas armazenadas sob refrigeração entre 2 °C e 8 °C, até o momento do uso.

Curva de calibração de L-fenilalanina, L-tirosina e L-triptofano

Soluções de 0; 0,010; 0,015; 0,020; 0,025; 0,030 e 0,035 mg/mL foram preparadas pela diluição de alíquotas de 0; 303, 454, 605, 757, 908 e 1059 µL (Pipetman P100 e P1000) das respectivas soluções estoque para 5 mL de tampão fosfato de sódio a 0,1 mol/L, pH 7,0, em balão volumétrico. Estas soluções foram preparadas no momento dos ensaios.

Tampão fosfato de sódio 0,1 mol/L pH 7,0

O fosfato de sódio monobásico (solução A) (Synth, Diadema, SP, Brasil) na quantidade de 24,01 g e 28,40 g de fosfato de sódio bibásico (solução B) (Synth, Diadema, SP, Brasil) foram pesados (balança analítica eletrônica, Hangping, FA2004, Shanghai, China) e diluídos, separadamente, para 1000 mL de água destilada e deionizada, em balão volumétrico. Estas soluções foram

utilizadas no ajuste do pH para 7,0 (Potenciômetro, Quimis, Q 400 A, Diadema, SP, Brasil). Esta solução tampão foi preparada no mesmo dia dos ensaios, sendo armazenada sob refrigeração entre 2 °C e 8 °C, até o momento do uso.

Solução de ácido clorídrico 5,7 mol/L

Ácido clorídrico concentrado 37 % (Synth, Diadema, SP, Brasil) (48 mL) foi diluído com 52 mL de água destilada e deionizada. Esta solução foi preparada semanalmente e mantida armazenada entre 20 °C e 30 °C.

Solução de hidróxido de sódio 3 mol/L

O hidróxido de sódio (Synth, Diadema, SP, Brasil) na quantidade de 120,00 g foi pesado (balança analítica eletrônica, Hangping, FA2004, Shanghai, China) e dissolvido em água destilada e deionizada, em banho de gelo, e transferido para um balão volumétrico de 1000 mL, completando-se o volume com água destilada e deionizada. Esta solução foi preparada semanalmente e mantida armazenada entre 20 °C e 30 °C.

■ Procedimento analítico

Hidrólise ácida

A farinha de trigo tipo I foi submetida à hidrólise sob vapor ácido (HCL a 5,7 mol/L, 110 °C, 24 h) para liberação da Fen. Assim, pesou-se 0,525 g de farinha de trigo (balança analítica eletrônica, Hangping, FA2004, Shanghai, China), quantidade esta que foi uniformemente distribuída em 12 tubos de borossilicato de 0,5 cm de diâmetro (Hialoquímica, Belo Horizonte, MG, Brasil). Estes tubos foram agrupados em um frasco maior, ao qual foi adicionado 0,75 mL de HCl a 5,7 mol/L. Este frasco foi fechado, mantido sob vácuo por 30 min e levado para hidrólise à 110 °C em estufa (Quimis, Q-317B- 12, Diadema, SP, Brasil), por 24 h. O material presente nos tubos foi reconstituído em tampão fosfato de sódio 0,1 mol/L pH 7,0. Seguiu-se o ajuste do pH para 7,0 (pHmetro Quimis, Q 400 A, Diadema, SP, Brasil) com solução de hidróxido de sódio a 3 mol/L e a transferência para balão volumétrico de 50 mL, completando-se o volume com a solução tampão fosfato de sódio 0,1 mol/L pH 7,0. A amostra hidrolisada foi filtrada (papel de filtro qualitativo, J.Prolab, São José dos Pinhais, PR, Brasil) e armazenada sob refrigeração até o momento do uso. Desta solução de farinha hidrolisada, foram retirados 1,9 mL completando-se o volume para 5 mL em balão

volumétrico, com tampão fosfato de sódio a 0,1 mol/L pH 7,0.

Determinação espectrofotométrica da L-fenilalanina

As soluções foram submetidas às leituras de absorvância entre 230 nm e 280 nm em espectrofotômetro CECIL (modelo CE2041, Buck Scientific, Inglaterra), para cobrir a faixa de absorção da Fen que varia de 245 nm a 270 nm¹⁶. Os espectros de derivada segunda foram traçados em computador com o software GRAMS-UV (Galactic Industries Corporation, Salem, NH, EUA), acoplado ao espectrofotômetro. Neste intervalo, a Fen apresentou picos negativos na derivada. A área do pico de maior amplitude, situado entre 255 nm e 260 nm, foi escolhida para ser integrada. Os valores das áreas correspondentes foram utilizados, na análise de regressão, para o cálculo do teor de Fen na farinha de trigo.

■ Procedimento de validação

Os parâmetros linearidade, efeitos de matriz, seletividade, exatidão, precisão, limites de detecção e de quantificação do equipamento foram estabelecidos em ensaios com soluções padrão e materiais de referência. A adequação para uso do método foi avaliada em função dos parâmetros estudados e respectivos critérios de aceitabilidade definidos. O procedimento de validação adotado foi baseado em um delineamento experimental simples e testes estatísticos robustos, incluindo verificações das premissas relacionadas a cada teste^{33,34,35}. O nível de significância adotado nos testes de hipóteses foi $\alpha = 0,05$.

Linearidade

Avaliação da linearidade foi conduzida conforme procedimentos propostos por Souza & Junqueira³⁶. Uma curva de calibração foi preparada, nos níveis de concentração 0,010; 0,015; 0,020; 0,025; 0,030 e 0,035 mg/mL de Fen em tampão fosfato de sódio a 0,1 M pH 7,0 (correspondentes a 251, 376, 501, 627, 752 e 877 mg/100g de Fen em farinha de trigo), sendo três replicatas independentes de cada nível. As soluções foram analisadas em ordem aleatória. Brancos foram preparados em triplicata para avaliação do ruído, mas não foram incluídos nos cálculos da regressão.

Os parâmetros da regressão foram estimados pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO). Em seguida, gráficos dos resíduos da regressão foram construídos e examinados para investigação de perfis óbvios, sendo indicados como *outliers* (valores

dispersos) os pontos fora do intervalo $\pm t_{(0,975;n-2)} s_{res}$, sendo s_{res} o desvio padrão dos resíduos da regressão³⁷. Os *outliers* foram formalmente diagnosticados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife³⁸. Este teste foi aplicado sucessivamente até que novos *outliers* não fossem detectados ou até uma exclusão máxima de 22 % no número original de resultados³⁹. As premissas relativas à análise de regressão foram verificadas sendo: normalidade⁴⁰, homoscedasticidade^{41,42} e independência dos resíduos da regressão⁴³. Testes de F foram conduzidos para verificar o ajuste ao modelo linear por meio da avaliação das significâncias da regressão e do desvio da linearidade⁴⁴.

Efeitos de matriz

Para verificação dos efeitos de matriz, duas curvas de calibração foram estudadas nos níveis de 0,010; 0,015; 0,020; 0,025; 0,030 e 0,035 mg/mL, sendo cada nível em três replicatas independentes, e analisadas em ordem aleatória, na mesma bateria analítica. A curva usual do analito foi preparada conforme descrito nos experimentos de avaliação da linearidade. Para a curva do analito na matriz utilizou-se 1,9 mL de extratos hidrolisados de amostras de farinha de trigo adicionados de 0, 303, 454, 605, 757, 908 e 1059 μ L da solução estoque de Fen, completando-se o volume para 5 mL em balão volumétrico, com tampão fosfato de sódio a 0,1 mol/L pH 7,0. Os brancos preparados para cada curva não foram incluídos nos cálculos.

Os parâmetros da regressão foram estimados e as premissas relativas ao MMQO também foram verificadas para estas curvas. Uma vez comprovadas as premissas e o ajuste ao modelo linear, a inclinação e a interseção obtidas para a curva usual foram comparadas com aquelas calculadas para a curva em matriz. A premissa de homogeneidade das variâncias dos resíduos das curvas foi avaliada pelo teste de F⁴⁵, para verificar se inclinações e interseções seriam comparadas pelo teste de t com as variâncias combinadas ou distintas⁴⁶.

Seletividade

Para complementar os estudos de efeitos de matriz, nos quais foram considerados interferentes oriundos das amostras, reagentes e materiais envolvidos nos ensaios, a seletividade também foi investigada por meio de experimentos com Fen na presença e ausência de outros aminoácidos aromáticos.

Três curvas de calibração foram construídas, sendo de L-tirosina, L-triptofano e Fen, cada uma com 3

pontos (0,010, 0,020 e 0,035 mg/mL), em triplicata. Em seguida, três outras curvas de calibração foram preparadas, sendo a primeira contendo um *pool* dos três aminoácidos, a segunda com Fen associada à L-tirosina e a terceira composta por Fen e L-triptofano, todas nas concentrações de 0,010, 0,020 e 0,035 mg/mL, em triplicata.

Exatidão, precisão e limites

Devido à inexistência de materiais de referência certificados devidamente caracterizados para Fen em farinha de trigo, os parâmetros recuperação e precisão (sob condições de repetitividade e reprodutibilidade parcial) foram pesquisados em ensaios com materiais de referência (amostras previamente caracterizadas por CLAE no nível de 354 mg/100g, representativas dos níveis reportados para Fen em farinha de trigo em tabelas de composição centesimal, com valores médios de 400mg de Fen/100g de farinha de trigo) ⁴⁷. Doze replicatas independentes destas amostras foram divididas em quatro lotes, com três replicatas cada, analisadas em quatro diferentes dias, por dois analistas. As concentrações de Fen foram preditas por meio de equações obtidas pelo método de adição de padrão de Fen nas amostras, devido aos resultados dos estudos de efeitos de matriz.

Os resultados de recuperação obtidos foram analisados quanto à presença de *outliers* pelo teste de Grubbs ^{48,49,50}. As estatísticas de Grubbs para um outlier (G_1), dois outliers vicinais (G_2) e dois outliers polares (G_3) foram calculadas simultaneamente para os resultados obtidos no nível de concentração estudado. A indicação de *outlier* por, pelo menos, uma destas estatísticas seria suficiente para excluir o dado. Após um primeiro ciclo, o teste de Grubbs foi sucessivamente aplicado até que novos *outliers* não fossem detectados ou até uma exclusão máxima de 22 % no número original de resultados de recuperação ³⁹.

Inexatidão foi investigada por meio da média de recuperação obtida para as replicatas de amostras adicionadas no nível de concentração estudado, após o diagnóstico de *outliers*. O critério de aceitabilidade adotado foi de média de recuperação entre 80 % a 110 % ⁵¹.

As precisões sob condições de repetitividade e reprodutibilidade parcial foram expressas em termos de desvios padrão relativos e estimadas por análise de variância dos resultados de recuperação obtidos para as doze replicatas de amostras adicionadas no nível de concentração estudado ^{52,53,54,55}. As premissas de normalidade ⁴⁰ e homoscedasticidade dos resíduos

dos resultados de recuperação ^{41,42}, relativas à análise de variância, foram previamente testadas. Devido a indisponibilidade de farinha de trigo sem o analito Fen, os limites de detecção e de quantificação teóricos foram estabelecidos como a média das leituras obtidas para branco de solvente mais três e dez desvios padrão, respectivamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Linearidade

Os resultados obtidos nos experimentos para avaliação da linearidade estão demonstrados nas Figuras 1, 2, 3, 4, 5 e na Tabela 1. As premissas de que os resíduos da regressão seguem a distribuição normal são homoscedásticos e independentes foram confirmadas, garantindo uma aplicação segura dos testes de hipóteses de t e F, além do emprego adequado do MMQO sem ponderações.

Tabela 1. Estatísticas da análise de variância da regressão, incluindo teste de desvio da linearidade, para curva de Fen em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,0 (0,010 mg/mL a 0,035 mg/mL)

Estatística	Curva Usual
<i>Regressão</i>	
F	$1,146 \times 10^3$
F_{critico}	4,600
p	$p < 0,001$
<i>Desvio da linearidade</i>	
F	1,711
F_{critico}	3,478
p	$p > 0,05$

F = razão entre variâncias, F_{critico} = valor crítico tabelado, p = significância

A Figura 1 ilustra os gráficos exploratórios dos resíduos da regressão com indicação dos *outliers* tratados. Os perfis destes gráficos de resíduos demonstraram que não houve tendências óbvias que demonstrassem heteroscedasticidade ou desvio de linearidade. Os intervalos de confiança dos resíduos ($\pm t_{(0,975;n-2)} s_{\text{res}}$) sugeriram a presença dois *outliers*, sendo um no nível 0,020 mg/mL e outro no nível 0,035 mg/mL, os quais foram confirmados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife.

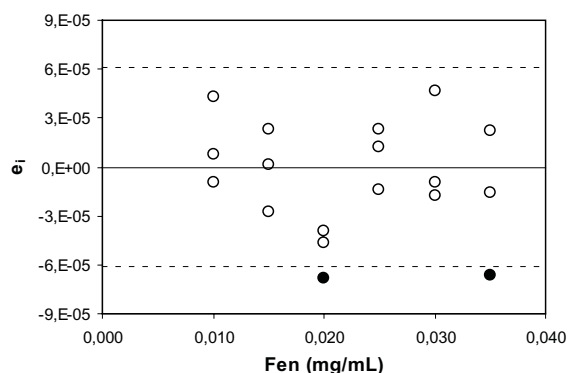


Figura 1. Gráfico exploratório dos resíduos da regressão da curva de Fen em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0 (0,010 mg/mL a 0,035 mg/mL), com indicação dos respectivos outliers diagnosticados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife.

$$e_i = \text{resíduo da regressão}, \bullet = \text{outlier}, \text{---} = \pm t_{(0,975;n-2)} S_{res}$$

O gráfico de Ryan-Joiner, ilustrado na Figura 2, indicou correlação significativa entre os resíduos da regressão obtidos para cada curva e os valores normais teoricamente esperados. O coeficiente de correlação foi de 0,9895, com valor crítico de 0,9529, demonstrando que o desvio da distribuição normal não foi significativo ($p > 0,10$).

A premissa de homoscedasticidade dos resíduos da regressão foi confirmada. A variabilidade dos resíduos ao longo das concentrações estudadas foi constante, uma

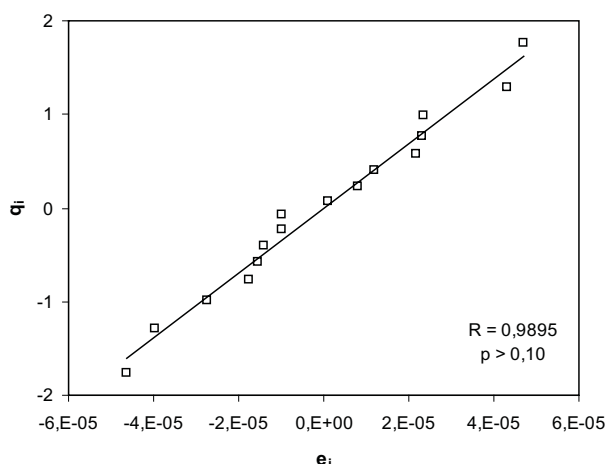


Figura 2. Gráfico de probabilidade normal da curva de Fen em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0 (0,010 mg/mL a 0,035 mg/mL).

e_i = resíduo da regressão, q_i = valor normal esperado, R = coeficiente de correlação de Ryan-Joiner, p = significância do desvio da distribuição normal.

vez que a estatística t de Levene, estimada em 0,676, não foi significativa ($p > 0,05$) (Figura 3).

Houve independência dos resíduos da regressão. A estatística de Durbin-Watson calculada foi de 1,592 ($p > 0,10$), sugerindo que não houve autocorrelação (Figura 4).

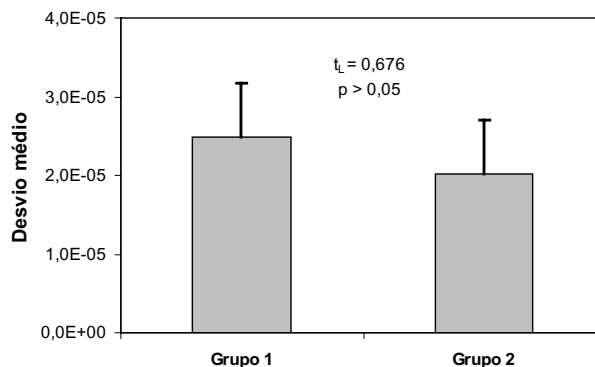


Figura 3. Representação da homogeneidade das variâncias da curva de Fen em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0 (0,010 mg/mL a 0,035 mg/mL) pelo teste de Levene modificado.

t_L = estatística t de Levene, p = significância, Grupo 1 = 0,010; 0,015 e 0,020 mg/mL, Grupo 2 = 0,025; 0,025 e 0,030 mg/mL.

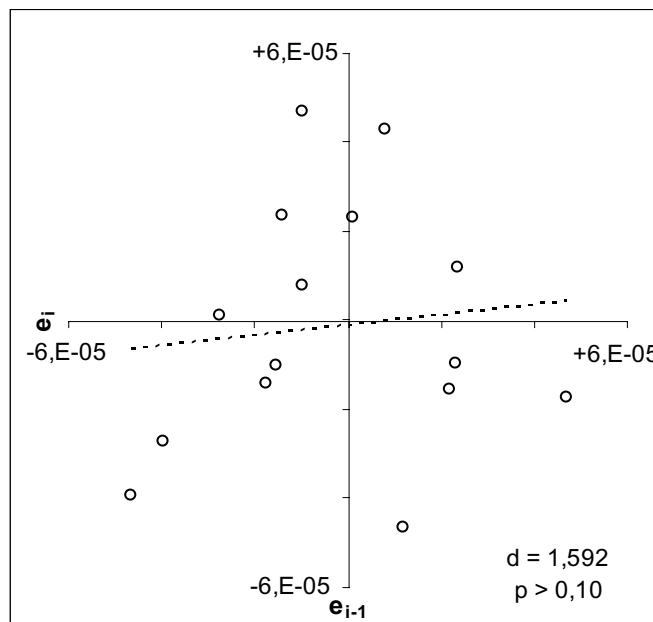


Figura 4. Gráfico de Durbin-Watson da curva de Fen em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0 (0,010 mg/mL a 0,035 mg/mL).

e_i = resíduo da regressão, d = estatística de Durbin-Watson, p = significância.

A regressão apresentou-se altamente significativa ($p < 0,001$), enquanto o desvio de linearidade não foi significativo ($p > 0,05$) (Tabela 1), indicando linearidade na faixa estudada de 0,010 mg/mL a 0,035 mg/mL. A curva de calibração com respectiva equação e coeficiente de determinação está ilustrada na Figura 5.

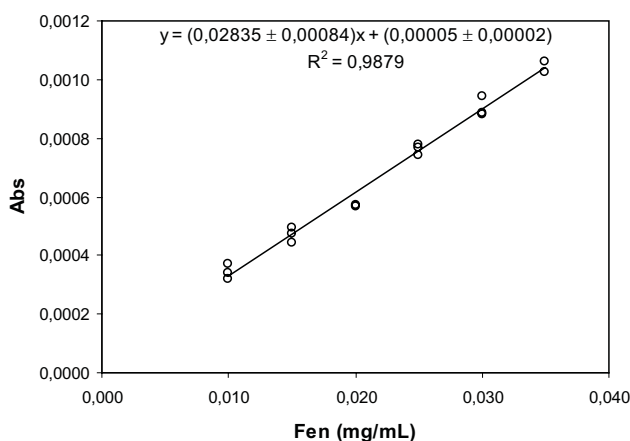


Figura 5. Curva de calibração da curva de Fen em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0, na faixa de 0,010 mg/mL a 0,035 mg/mL, com respectiva equação e coeficiente de determinação.

Abs = leitura de absorvância, y = resposta, x = concentração de Fen em mg/mL, R^2 = coeficiente de determinação

■ Efeitos de matriz

As curvas de calibração usual e em matriz, com respectivas equações e coeficientes de determinação, obtidas nos estudos de efeitos de matriz estão apresentadas na Figura 6. Pelo teste de resíduos padronizados Jackknife foram detectados um *outlier* na curva usual e outro *outlier* na curva de matriz, ambos no nível 0,035 mg/mL. Todas as premissas relativas ao MMQO foram confirmadas para as curvas de calibração usual e em matriz. Distribuição normal dos resíduos da regressão foi observada pelos coeficientes de correlação de Ryan-Joiner ($p > 0,10$). Homoscedasticidade foi obtida com estatísticas t de Levene não significativas ($p > 0,05$). Independência dos resíduos da regressão foi indicada pelas estatísticas de Durbin-Watson ($p > 0,10$). Regressões significativas ($p < 0,001$) e desvios de linearidade não significativos ($p > 0,05$) foram diagnosticados pelos testes de F da análise de variância. Estes resultados (Tabela 2) permitiram a comparação das inclinações e interseções pelo teste de t para avaliação dos efeitos de matriz.

O teste de F indicou heterogeneidade das variâncias dos resíduos das curvas usual e em matriz (

Tabela 2. Avaliação da linearidade das curvas de calibração de Fen usual e em matriz, na faixa de 0,010 mg/mL a 0,035 mg/mL, nos experimentos de efeitos de matriz

Estatística	Curva Usual	Curva em Matriz
Número de observações		
n	17	17
Normalidade		
R	0,9770	0,9922
$R_{\text{cítrico}}$	0,9549	0,9549
p	$p > 0,10$	$p > 0,10$
Homoscedasticidade		
t_l	0,766	-1,681
$t_{\text{cítrico}}$	2,131	2,131
p	$p > 0,05$	$p > 0,05$
Independência		
d	1,775	1,616
p	$p > 0,10$	$p > 0,10$
Regressão		
F	$5,540 \times 10+2$	$1,767 \times 10+2$
$F_{\text{cítrico}}$	4,543	4,543
p	$p < 0,001$	$p < 0,001$
Desvio da linearidade		
F	3,268	2,522
$F_{\text{cítrico}}$	3,357	3,357
p	$p > 0,05$	$p > 0,05$

n = número de observações, R = coeficiente de correlação de Ryan-Joiner, p = significância, t_l = estatística t de Levene, d = estatística de Durbin-Watson, F = razão entre variâncias, estatísticas críticas = valores críticos tabelados.

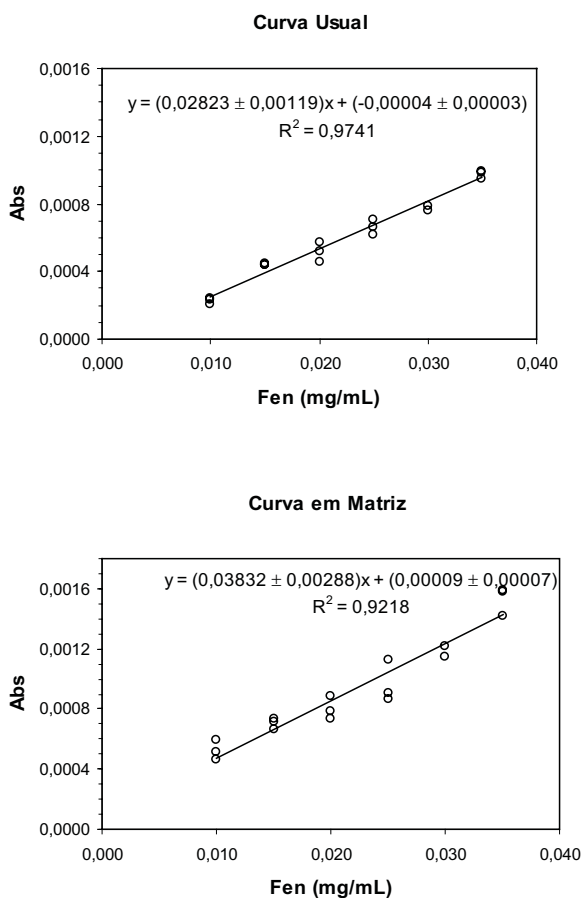


Figura 6. Curvas de calibração de Fen usual e em matriz, na faixa de 0,010 mg/mL a 0,035 mg/mL, com respectivas equações e coeficientes de determinação.

Abs = leitura de absorvância, y = resposta, x = concentração de Fen em mg/mL, R^2 = coeficiente de determinação

$F = 5,882$, com $p = 0,001$) e o uso do teste de t com variâncias distintas para avaliação dos efeitos de matriz. Assim, não houve diferença significativa quando as interseções da curva usual e em matriz foram comparadas entre si ($p > 0,05$). Contudo, as inclinações diferiram significativamente ($p < 0,05$), indicando efeitos de matriz (Tabela 3). Com base nestes resultados, foi possível inferir que curvas usuais de Fen não forneceram as mesmas respostas que amostras de farinha de trigo contendo Fen nas mesmas concentrações. Diferença significativa entre os interceptos era esperada, pois não havia disponibilidade de amostras de farinha de trigo isentas de Fen. Esta diferença corresponderia ao teor prévio do aminoácido presente nos extratos da farinha utilizados para preparo de cada ponto da curva de calibração em matriz. A ausência de diferença significativa entre os interceptos provavelmente ocorreu devido a efeitos de compostos presentes na amostra, com

ação supressora sobre a Fen. Houve ainda a diferença significativa entre as inclinações, o que reiterou a indicação de presença de interferentes oriundos da matriz. Para que tais interferências fossem consideradas de maneira a não afetarem os resultados de Fen nas amostras de farinha, o método de adição foi adotado. Ou seja, para quantificação de Fen em amostras, sete alíquotas de 1,9 mL foram retiradas de cada solução de amostra hidrolisada, adicionadas de 0, 303, 454, 605, 757, 908 e 1059 μ L da solução estoque de Fen, completando-se o volume para 5 mL em balão volumétrico, com tampão fosfato de sódio a 0,1 mol/L pH 7,0.

■ Seletividade

Quando as curvas de calibração de L-tirosina e L-triptofano foram lidas nas condições experimentais para determinação de Fen não houve detecção. Além disto, evidenciou-se que os espectros de Fen não foram afetados pela presença dos outros aminoácidos aromáticos estudados. As respostas obtidas para as curvas de Fen associada à L-tirosina e L-triptofano isoladamente e para aquela preparada com uma mistura destes três aminoácidos, não diferiram daquelas observadas para Fen na ausência destes compostos (Figura 7). Tais resultados indicaram a seletividade do método, confirmando a capacidade de determinar o analito em estudo na presença de outros compostos de comportamento similar.

Tabela 3. Comparações entre as interseções e inclinações das curvas usual e em matriz para Fen

Estatística	Curva Usual
<i>Interseção</i>	
t_a	1,714
$t_{critico}$	2,093
p	$p > 0,05$
<i>Inclinação</i>	
t_b	3,237
$t_{critico}$	2,093
p	$p < 0,05$

t_a = estatística t para contrastes entre interseções, $t_{critico}$ = valor crítico tabelado, t_b = estatística t para contrastes entre inclinações, p = significância.

■ Exatidão, precisão e limites

O teste de Grubbs não indicou presença de *outliers* ($p > 0,05$) entre os resultados de recuperação obtidos para as doze replicatas de amostra analisadas no nível de concentração estudado. Os valores estimados para G_1 foram 0,945 e 1,848, para a menor e maior recuperação, respectivamente, com valor crítico de 2,285. O valor estimado para G_2 foi de 2,79, com valor tabelado de 3,91. Para G_3 os valores estimados para as duas menores e para as duas maiores recuperações,

respectivamente de 0,1933 e 0,5910, também foram inferiores ao valor tabelado de 0,7004.

Os valores individuais de recuperação variaram de 81 % a 118 %. O perfil destes resultados de recuperação individuais nos quatro diferentes ensaios pode ser observado na Figura 8. A média de recuperação alcançada para as doze replicatas de amostra contendo 354 mg/100g de Fen em farinha de trigo foi de 94 %, atendendo aos critérios estabelecidos de 80 % a 110 % (EC, 2002). Estes resultados

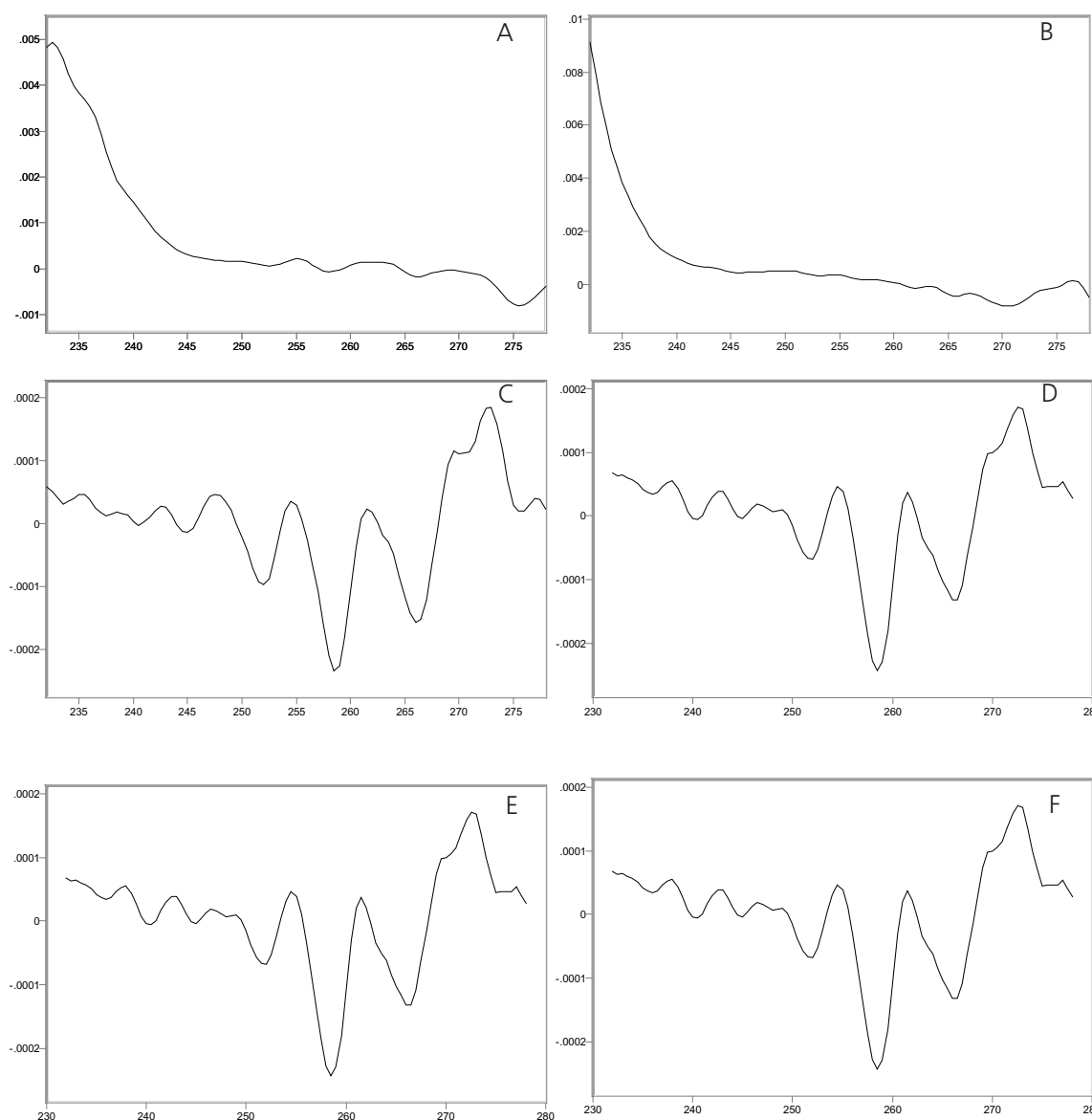


Figura 7. Espectros obtidos para as soluções de 0,035 mg/mL utilizadas no estudo de seletividade, sendo: A = solução de L-tirosina, B = solução de L-triptofano, C = solução combinada de Fen e L-tirosina, D = solução combinada de Fen e L-triptofano, E = solução pool de Fen, L-tirosina e L-triptofano, e F = solução de Fen.

indicaram que a recuperação do método é adequada e que o mesmo não é inexato no nível de estudado.

Os resíduos, obtidos pela diferença entre a recuperação média e os valores individuais de recuperação obtidos em cada dia, apresentaram distribuição normal, com coeficiente de correlação de Ryan-Joiner de 0,9742 ($p > 0,10$), e homoscedasticidade, com estatística F_L de 0,183 ($p > 0,05$), permitindo a estimativa de DPR_r e DPR_R por análise de variância.

Os valores de DPR_r e DPR_R , estimados por análise de variância, foram 11 % e 15 %, respectivamente, sinalizando a precisão do método.

O limite de detecção teórico foi de 63 mg/100g, enquanto que o de quantificação foi de 175 mg/100g. Estes limites foram, provavelmente, subestimados, uma vez que os experimentos foram conduzidos com branco de reagentes. De qualquer forma, a faixa de validação do método encontra-se acima destes valores, ou seja, de 251 mg/100g a 877 mg/100g de Fen em farinha de trigo.

CONCLUSÃO

Linearidade foi determinada, com efeitos de matriz significativos, em uma faixa de concentração compatível com os níveis usualmente reportados para Fen em farinha de trigo. Comprovou-se seletividade, recuperação e precisão do método, com limites de detecção e quantificação teóricos suficientes para determinação do analito. Os parâmetros de desempenho estudados indicaram adequação do método para o propósito de monitoramento dos teores de Fen em farinha de trigo.

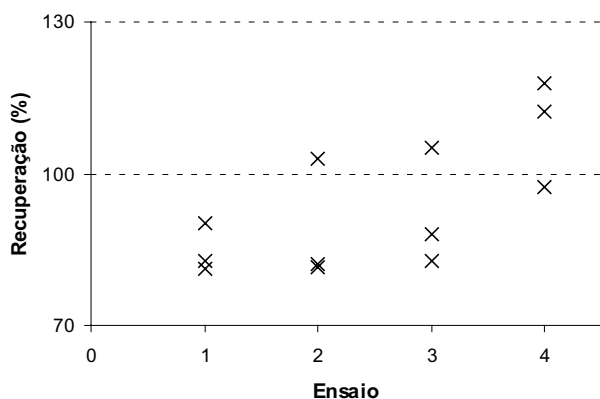


Figura 8. Porcentagens de recuperação individuais obtidas para as doze replicatas de amostra (contendo 354 mg/100g de Fen em farinha de trigo), analisadas em quatro ensaios, sob condições de repetitividade e reprodutibilidade parcial.

REFERÊNCIAS

1. Ramaswami U, Smith I. Phenylketonuria. *Curr Paediatrics*. 1997; 7: 251-255.
2. Starling ALP, Aguiar MJB, Kanufre VC, Soares SF. Fenilcetonúria. *Rev Méd Minas Gerais*. 1999; 9: 106-10.
3. Mira NVM, Marquez UML. Importância do diagnóstico e tratamento da fenilcetonúria. *Rev Saúde Publ*. 2000; 34: 86-96.
4. Hendriksz CJ, Walter JH. Update on phenylketonuria. *Curr Paediatrics*. 2004; 14: 400-6.
5. Marco D, Waitzberg DL. Erros congênitos do metabolismo – fenilcetonúria. In: Waitzberg DL. *Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica*. 3.ed. São Paulo: Atheneu; 2004. p. 449-57.
6. Lopez-Bajonero LJ, Lara-Calderon P, Galvez-Mariscal A, Velasquez-Arellano A, Lopez-Munguia A. Enzymatic production of a low-phenylalanine product from skim milk powder and caseinate. *J Food Sci*. 1991; 56: 938-42.
7. Martins AM, Fisberg RM, Schmidt BJ. Fenilcetonúria: abordagem terapêutica. São Paulo: Nestlé; 1993.
8. Shimamura S, Tamura Y, Miyakawa H, Saito H, Kawaguchi Y, Isomura N, et al. Peptide mixture and products thereof. Moringa Milk Industry Co., Ltd., Tokio, Japan, Patents US 5952193, A23C 21/02; A23C 21/04; A23C 21/06; A61K 38/01. 1997 Apr 14; 1999 Sep 14.
9. Piecyk M, Srama A, Bzducha A, Obiedzinski M. Application of HPLC and GC/MS to quantification of phenylalanine in chosen kinds of food for particular nutritional uses. *Acta Sci Pol Technol Aliment*. 2007; 6(2): 5-18.
10. Keohane PP, Grimble GK, Brown B, Spiller RC. Influence of protein composition and hydrolysis method on intestinal absorption of protein in man. *Gut*. 1985; 26: 907-13.
11. Grimble GK, Keohane PP, Higgins BE, Kaminsk Jr MV, Silk DBA. Effect of peptide chain length on amino acid and nitrogen absorption from two lactoalbumin hydrolysates in the normal human jejunum. *Clin Sci*. 1986; 71: 65-9.
12. Carreira RL, Barbosa CMS, Junqueira RG, Motta S, Silvestre MPC. Emprego da cromatografia líquida de alta eficiência hidrofílica na determinação dos aminoácidos de hidrolisados de caseína. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2002; 22 (3): 229-32.
13. O'Haver TC, Green GL. Numerical error analysis of derivative spectrometry for the quantitative analysis of mixtures. *Anal Chem*. 1976; 48 (2).
14. Ragone R, Colonna G, Balestrieri C, Servillo L, Irace G. Determination of tyrosine exposure in proteins by second derivative spectroscopy. *Biochem*. 1984; 23: 1871-5.
15. Grant A, Bhattacharyya PK. Application of derivative spectroscopy to the determination of chromatographic peak purity. *J Chromatog A*. 1985; 347: 219-35.
16. Rojas FS, Ojeda CB, Pavon JMC. Derivative ultraviolet-visible region absorption spectrophotometry and its analytical applications. *Talanta*. 1988; 35: 753-61.
17. Ichikawa T, Terada H. Second derivate spectrophotometry as an effective tool for examining phenylalanine residues in proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1977; 494: 267-70.
18. Ichikawa T, Terada H. Estimation of state and amount of phenylalanine residues in proteins by second derivative spectrophotometry. *Biochim Biophys Acta*. 1979; 580: 120-8.
19. Ichikawa T, Terada H. Determination of phenylalanine, tryptophan and tyrosine in a mixture of amino acids by second derivative spectrophotometry. *Chem Pharm Bull*. 1981; 29 (2): 438-44.

20. Ichikawa T, Terada H. Effect of dodecyl sulfate on the spectral properties of phenylalanil residues in serum albumin detected by second derivative spectrophotometry. *Biochim Biophys Acta*. 1981; 671 (1): 33-7.
21. Brandts JF, Kaplan LJ. Derivate spectroscopy applied to tyrosiyl chromophores. Studies on ribonuclease, lima bean inhibitors, insulin, and pancreatic trypsin inhibitor. *Biochem*. 1973; 12 (10): 2011-24.
22. Matsushima A, Inoue Y, Shibata K. Derivate absorption spectrophotometry of native proteins. *Anal Biochem*. 1975; 65 (3): 362-68.
23. Cahill JE, Padera FG. Derivative analysis of UV/visible spectra. *American Laboratory*. 1980; 12: 101-12.
24. Morais HA, Marco LM, Oliveira MC, Silvestre MPC. Casein hydrolysates using papain: peptide profile and encapsulation in liposomes. *Acta Alim*. 2005; 34 (1): 59-69.
25. Soares RDL, Biasutti EAR, Capobiango M, Vieira CR, Silva VDM, Januário JN, Aguiar MJB, Silvestre MPC. Preparation of enzymatic skim milk hydrolysates with low phenylalanine content. *Acta Farmac Bonaer*. 2006; 25: 325-32.
26. Lopes DCF, Delvivo FM, Silvestre MPC. Hydrolysates of skim milk powder: peptide profiles for dietetic purposes. *Brit Food J*. 2005; 107 (1): 42-53.
27. Capobiango M, Lopes DCF, Carreira RL, Afonso WO, Segall SD, Silvestre MPC. Optimization of enzyme assisted processes for extracting and hydrolysing corn proteins aiming phenylalanine removal. *Int J Food Eng*. 2007; 3: 1-19.
28. Lopes DCF, Bizzotto CS, Silva VDM, Afonso WO, Lopes Jr CO, Silvestre MPC. Obtention of low-phenylalanine protein hydrolysates from rice: use of two pancreatins. *J Food Technol*. 2008; 6: 57-65.
29. Vieira CR, Lopes Jr CO, Ramos CS, Capobiango M, Silvestre MPC. Extração enzimática das proteínas da farinha de arroz. *Ciênc Tecnol Alimen*. 2008; 28: 599-606.
30. NUPAD – Núcleo de ações e pesquisas em apoio diagnóstico. [acesso em: 15 de outubro de 2008]. Disponível em: <<http://www.nupad.medicina.ufmg.br>>.
31. King B. In-house method validation. A guide for chemical laboratories. LGC Limited. 2003.
32. Thompson M, Ellison SLR, Wood R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure Appl Chem*. 2002; 74: 835-55.
33. Souza SVC, Lima JA, Teodoro JC, Junqueira RG. Validação intralaboratorial de método quantitativo para determinação múltipla de resíduos de avermectinas em leite bovino por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de fluorescência. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2007; 27 (4): 787-92.
34. Souza SVC, Pinto CT, Junqueira RG. In-house method validation: application in arsenic analysis. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2007; 20: 241-47.
35. Souza SVC, Junqueira RG, Ginn R. Analysis of semicarbazide in baby food by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS-MS) - In-house method validation. *J Chromatogr A*. 2005; 1077: 151-8.
36. Souza SVC, Junqueira RG. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. *Analytica Chimica Acta*. 2005; 552: 25-35.
37. Meyer PC, Zund RE. Statistical methods in analytical chemistry. New York: John Wiley & Sons; 1993.
38. Belsley DA, Kuh E, Welsch RE. Regression diagnostics: identifying influential data and sources of collinearity. New York: Wiley; 1980.
39. Horwitz W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. *Pure Appl Chem*. 1995; 67: 331-43.
40. Ryan TA, Joiner BL. Normal probability plots and tests for normality. The State College: Pennsylvania State University; 1976.
41. Levene H. Robust tests for equality of variances. In: Olkin I, Ghurye SG, Hoeffding W, Madow WG, Mann HB. (Ed.) Contributions to probability and statistics. Stanford: Stanford University Press; 1960. p. 278-92.
42. Brown MB, Forsythe AB. Robust tests for the equality of variance. *J Am Stat Assoc*. 1974; 69: 364-7.
43. Durbin J, Watson GS. Testing for serial correlation in least squares regression ii. *Biometrika*. 1951; 38: 159-78.
44. Draper N, Smith H. Applied regression analysis. New York: Wiley; 1998.
45. Snedecor GW, Cochran WG. Statistical methods. Ames: Iowa State University; 1989.
46. Armitage P, Berry G. Statistical methods in medical research. Oxford: Blackwell Science Ltd.; 1994.
47. USDA (United States Department of Agriculture). Human Nutrition Information Service. Agriculture Handbook. Composition of Foods: Cereal Grains and Pasta. Number 8-20, 1989. Modified From Drake, D.L., S.E. Gebhardt, R.H. Matthews. Updated: Friday, May 26, 2006. [acesso em: 08 de junho de 2008]. Disponível em: <<http://food.oregonstate.edu/g/comp/compa.html>>.
48. Grubbs F. Procedures for detecting outlying observations in samples. *Technometrics*. 1969; 11: 1-21.
49. Barret V, Lewis T. Outliers in statistical data. 3 ed. New York: John Wiley; 1994.
50. Burke S. Missing values, outliers, robust statistics & non-parametric methods. *LC GC*. 2001; 19-24.
51. EC (European Commission). Commission decision 2002/657/EC of 12 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Communities*, 2002, L 221/8.
52. ISO (International Standards Organization). ISO 5725-1. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Parts 1, 2, 3, 4 and 6. Geneva: ISO; 1994.
53. ISO (International Standards Organization). ISO 5725-5. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 5. Geneva: ISO; 1998.
54. Kuttatharmmakul S, Massart DL, Smeyers-Verbeke J. Comparison of alternative measurement methods. *Anal Chim Acta*. 1999; 391: 203-25.
55. Maroto A, Riu J, Boqué R, Rius FX. Estimating uncertainties of analytical results using information from the validation process. *Anal Chim Acta*. 1999; 391: 173-85.

Conformidade da rotulagem de repositores hidroeletrolíticos prontos para consumo de marcas nacionais em relação à legislação brasileira

Label conformity of carbohydrate-electrolyte beverages ready to drink from national brands in respect to Brazilian law

RIALA6/1220

Ângela Antunes SILVA¹, Carolina Gomes da ROCHA¹, Marcelo Antônio MORGANO², Njurka Maritza Almeyda HAJ-ISA³, Késia Diego QUINTAES^{1*}

*Endereço para correspondência: Departamento de Nutrição Clínica e Social, Escola de Nutrição, Universidade Federal de Ouro Preto. Campus Morro do Cruzeiro, s/n, CEP: 35400-000. Ouro Preto, MG, Brasil. e-mail: kesia@enut.ufop.br

¹Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brasil

²Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos, Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, SP, Brasil.

³Faculdade de Americana, Americana, SP, Brasil.

Recebido:10.12.2008 – Aceito para publicação em : 10.08.2009.

RESUMO

O comércio de alimentos para praticantes de atividade física, incluindo os repositores hidroeletrolíticos (RHE), está em expansão, necessitando de fiscalização sobre sua composição e rotulagem nutricional. Este trabalho objetivou avaliar os rótulos de RHE nacionais prontos para consumo, comercializados em hipermercados de Belo Horizonte (MG) e de Campinas (SP), analisando sua conformidade em relação às legislações vigentes do Brasil. Foram determinados os teores de sódio e potássio por espectrometria de emissão e de cloreto pelo método de Mohr, em 44 amostras de RHE de 4 marcas. Todas as marcas apresentaram informação insuficiente, infringindo a RDC 259/2003 e ausência da indicação quantitativa do conteúdo líquido em cor contrastante, contrapondo a Portaria 157/2002. Os rótulos ilegíveis das marcas C e D apresentaram não conformidade às Portarias 222/98 e 29/98, respectivamente. Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o teor de pelo menos um eletrólito calculado e o valor declarado no rótulo, sendo que em 61,4% das amostras o teor mensurado diferiu em $\pm 20\%$ do valor rotulado, não satisfazendo assim a RDC 360/2003 da ANVISA. Os teores dos eletrólitos variaram entre 33,3-102,7 mg/200mL para sódio; 21,6-101,4 mg/200mL para potássio e 49,8-125,12 mg/200mL para cloreto, valores que podem contribuir para hiponatremia. Concluiu ser necessária revisão das formulações e rótulos pelos fabricantes, assim como a fiscalização pelos órgãos competentes, visando garantir a funcionalidade dos RHE.

Palavras-chave. sódio, hidratação, exercício, rotulagem nutricional.

ABSTRACT

The food market for special products for individuals who practice physical activity, including carbohydrate-electrolyte beverages (RHE), is growing and inspection is required about its chemical composition and nutritional labels. This study evaluated labels of RHE ready for consumption, commercialized in supermarkets of Belo Horizonte (MG) and Campinas (SP), and analyzed their compliance to Brazilian regulations. Sodium and potassium contents were determined in laboratory by emission spectrometry, as well as chloride contents by the Mohr method in 44 samples of 4 different brands. All brands were in disagreement with the Brazilian legislation regarding labeling. A difference ($p < 0.05$) between the amount observed of at least one electrolyte and the amount declared in the label was found, where 61% of them exceeded the labeled value in $\pm 20\%$. The concentration ranges (mg/200mL) of the electrolytes in the samples studied were: Na (33,3 to 102,7), K (21,6 to 101,4) and Cl (49,8 to 125,12), values that can contribute to hyponatremia. It was concluded that manufacturers should review their product formulation and labels and that the inspection by competent agencies should be more severe, so that the RHEs can have their function preserved.

Key words. sodium, hydration, exercise, nutritional label

INTRODUÇÃO

O calor corporal resultante do exercício físico resulta em perda hídrica influenciada, entre outros fatores, pela temperatura e a umidade do ambiente^{1,2}. O aumento na temperatura corporal resulta em elevação da sudorese evitando o acúmulo de calor no organismo, podendo variar entre 0,8-2,0L/hora a perda de água³, devendo ser evitadas perdas superiores a 2% do peso corporal^{1,4}. Os efeitos fisiológicos da desidratação induzida pelo exercício têm sido alvo de diversos estudos que comparam os efeitos da reposição parcial, total e da não reposição das perdas hídricas nas respostas fisiológicas^{3,5,6}. A desidratação pode ser prevenida com ingestão similar à taxa de perda de líquidos^{4,6,7} podendo ser feita mediante o consumo de bebidas carbonatadas contendo eletrólitos, em especial o sódio e o potássio^{7,8}.

Todavia, o limiar entre o estado hidratado e o desidratado é muito estreito, o que justifica o fato da desidratação ser comumente observada em desportistas^{1,4}. Tem sido relatado que durante o exercício os atletas não bebem voluntariamente água em quantidade suficiente para prevenir a desidratação⁴. O uso de bebidas contendo carboidratos e eletrólitos faz parte das estratégias que visam a hidratação do atleta^{1,3}.

No Brasil, o comércio de alimentos para praticantes de atividades físicas, incluindo os repositores hidroeletrólitos, está em expansão⁹. Por este motivo, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabeleceu normas para a rotulagem destes produtos¹⁰, as quais juntamente com as normas gerais de rotulagem de alimentos determinadas por esta mesma Agência e pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), normatizam o comércio de alimentos no país^{10,18}.

Este estudo objetivou avaliar a conformidade da rotulagem de repositores hidroeletrólitos nacionais prontos para consumo, dispostos à venda em duas metrópoles brasileiras, em relação às legislações vigentes no Brasil, bem como determinar quimicamente a composição eletrólítica destes produtos.

MATERIAL E MÉTODOS

■ Amostras

Em consulta no site da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)¹⁹, foram identificados 100 produtos

classificados como “repositores hidroeletrólitos” (RHE), de fabricação nacional, na forma pronta para o consumo (fluido), destinados a praticantes de atividades físicas, com registro vigente e deferido com data igual ou anterior a julho de 2007. Nesse mês foram coletados aleatoriamente, em hipermercados das cidades de Belo Horizonte (MG) e Campinas (SP), dois lotes distintos dos RHE disponíveis. Estas cidades foram escolhidas por estarem na região de abrangência de estudo prévio sobre padrão de consumo alimentar populacional brasileiro²⁰.

Os rótulos dos produtos encontrados foram avaliados quanto à conformidade a: Lei 10.674/2003; Resolução da Diretiva Colegiada (RDC) de números 340/2002, 259/2002, 359/2003 e 360/200; as Portarias 222/1998, 29/1998 e 27/1998, sendo todas legislações vigentes da Anvisa; e a Portaria 157/2002 do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO)^{10,18}.

■ Reagentes

Os reagentes e ácido clorídrico e nítrico usados foram de grau analítico (Merck®). Para a preparação das curvas analíticas foram usados soluções-padrão de referência de 1000 mg L⁻¹, marca Merck®. A água empregada nos procedimentos foi previamente destilada e deionizada, resultando em uma água com resistividade igual 18,2 MΩ cm⁻¹.

Todas as vidrarias foram previamente descontaminadas por imersão em solução de ácido nítrico a 50% (v/v) por 24 horas, seguida de enxágue com água destilada e deionizada.

■ Métodos analíticos

*Determinação de Sódio e Potássio*²¹

Uma alíquota de 5,00 mL do RHE foi transferida para um balão volumétrico de 25,00 mL, seguido da adição de 5,0 mL de ácido clorídrico concentrado, grau analítico. A mistura foi mantida em agitação por 2 horas usando um agitador mecânico orbital e posteriormente, completou-se o volume do balão volumétrico com água destilada e deionizada. Dois brancos foram preparados da mesma forma omitindo-se a amostra.

Para a quantificação dos teores de Na e K presente nos RHE foi usado um espectrômetro de emissão com fonte de plasma de argônio indutivamente acoplado (ICP OES), com detecção simultânea e visão radial, modelo Baird ICP 2000 (Massachusetts, USA). As

determinações foram feitas em triplicata e as condições ótimas para determinação dos minerais estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Condições de operação do ICP OES com configuração radial usadas nas determinações dos elementos minerais Na e K presentes nas amostras de isotônicos.

Parâmetro	Condição de operação	
Potência do plasma (kW)	0,90	
Gerador de rádio – frequência (MHz)	40,00	
Gás refrigerante (Ar) (L min ⁻¹)	15,00	
Gás auxiliar (Ar) (L min ⁻¹)	1,50	
Vazão de amostra (L min ⁻¹)	2,55	
Altura de observação vertical (mm)	19,00*	
Pressão do nebulizador (bar)	3,00	
Comprimento de onda	Na (nm)	589,59
	K (nm)	766,49
Curva analítica	Na (mg L ⁻¹)	10 a 250
	K (mg L ⁻¹)	2 a 50

*Acima da bobina de indução.

Garantia da qualidade analítica

A precisão do método usado para a determinação de Na e K foi avaliada pelo coeficiente de variação (%) para as cinco repetições analíticas e foi de 1 % tanto para o Na quanto para o K indicando alta homogeneidade entre as repetições. A exatidão do método foi avaliada através de ensaio de recuperação de padrão de concentração de Na e K presente numa amostra de RHE foi de 101 % e 93%, respectivamente.

Determinação de cloreto²²

A determinação de cloreto presente nos RHE foi realizada segundo o método de Mohr²². Uma alíquota de 5,00 mL da amostra foi titulada com solução padrão de nitrato de

prata 0,1 neq L⁻¹ padronizada como indicador solução de cromato de potássio de 5% (p/v) e o ponto final da titulação foi aquele onde a primeira coloração castanha foi persistente por 30 segundos. As determinações foram realizadas em triplicata. Quando necessário foi feito o ajuste do pH para a faixa de 6,5 a 9 com soluções 0,1 M de hidróxido de sódio e bicarbonato de sódio.

Estatística

Com os teores dos eletrólitos (Na, K, Cl) mensurados em cada amostra foram calculados a média e o desvio padrão no programa Microsoft® Excel® 2008 for Mac (versão 12.1.7). Foi avaliada a normalidade dos dados pelo método Shapiro Wilk W considerando a distribuição normal quando $p > 0,05$. As médias dos dados de cada eletrólito, por sabor e marca, foram comparadas com os declarados em rótulos. Posteriormente foi verificada a existência de diferenças estatísticas entre elas por análise de variância (ANOVA) e, quando diferenças acusadas, o teste de Tukey foi aplicado para avaliar diferenças entre as médias, calculando-se a mínima diferença significativa (dms).

Também foi calculado o coeficiente de variação (cv) dos valores dos eletrólitos mensurados em cada lote de igual marca e sabor visando avaliar homogeneidade do conteúdo de cada composto por produto, sendo considerado homogêneo o produto cujo cv entre os dos lotes avaliados fosse inferior a 10%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos supermercados visitados foram identificados à venda 22 sabores de RHE de 4 marcas distintas, totalizando 44 amostras. Embora os nomes das marcas não possam ser revelados, é possível dizer que todas as 4 marcas encontradas são tradicionais e com propaganda de seus produtos veiculadas em cadeia nacional. As marcas codificadas (A, B, C, D) e seus respectivos produtos estão descritos a seguir na Tabela 2.

Independentemente da marca e do sabor, todos os produtos analisados estavam adequados nas seguintes legislações: Lei federal 10.674/200317; Portaria 27/199811; Resolução RDC 340/200213 e Resolução RDC 359/200314, todas expedidas pela ANVISA (Figura 1). Estas legislações versam respectivamente sobre a obrigatoriedade de produtos alimentícios comerciais informarem sobre a presença de glúten, regulamenta as declarações relacionadas ao conteúdo de nutrientes (informação nutricional

complementar), obriga o fabricante declarar a presença do corante tartrazina (INS 102) por extenso na lista de ingredientes e estabelece as porções de alimentos embalados para fins de rotulagem nutricional.

Tabela 2. Identificação das 44 amostras de repositores hidroeletrólitos analisados.

Marcas	Amostras	
	n=44	Sabores
A	18	açai/guaraná, framboesa, frutas cítricas, laranja, limão, maracujá, pêssego, tangerina, uva.
B	12	abacaxi, laranja, limão, maracujá, tangerina, uva.
C	12	abacaxi, água de coco, limão, maracujá, tangerina, uva verde.
D	2	limão.

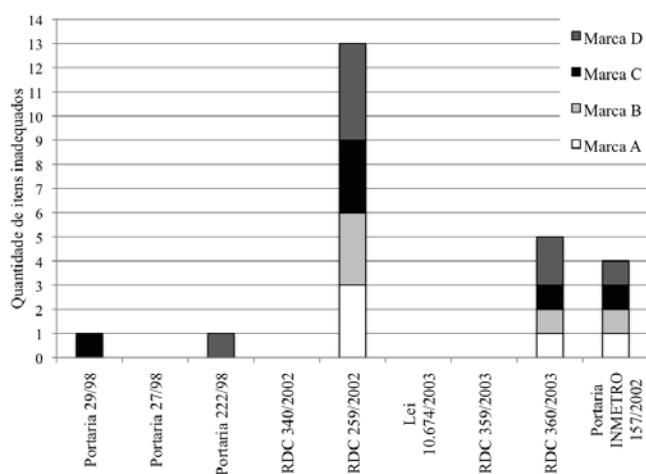


Figura 1. Quantidade de inadequações encontradas em repositores hidroeletrólitos nacionais em relação às legislações consultadas, segundo as marcas dos produtos.

Por outro lado, todos os produtos infringiram, no mínimo em um item, alguma das seguintes legislações: Portaria 29/1998¹² e 222/1998¹⁰, Resolução RDC 259/2002¹⁴ e RDC 360/2003¹⁶ da ANVISA, e a Portaria do INMETRO 157/2002¹⁸. A legislação mais infringida foi a Resolução

RDC 259/2002¹⁴ da Anvisa, com um total 13 infrações, seguida pela Resolução RDC 360/2003¹⁶ do mesmo órgão, com um total de 5 infrações (Figura 1, Tabela 3).

Com respeito à Portaria 222/1998¹⁰ da ANVISA, os produtos infringiram o item 9.1.2.3 por não apresentarem em destaque a informação “Recomenda-se que os portadores de enfermidades consultem um médico e ou nutricionista, antes de consumir este produto” (Tabela 3). Todavia, é importante destacar que todos os produtos atenderam esta Portaria no item 4.3.1, o qual define fatores específicos dos repositores hidroeletrólitos relativos a poder opcionalmente conter potássio, vitaminas e ou outros minerais, além de apresentar concentrações variadas de sódio, cloreto e carboidratos.

Dentre as marcas, a D foi a que mais apresentou itens em descumprimento, com um total de oito não-conformidades. A marca C apresentou seis itens não conformes em quatro legislações distintas. As marcas A e B apresentaram igualmente desconformidade em cinco itens, infringindo três das legislações consultadas (Figura 1, Tabela 3).

Cabe mencionar que a marca D foi a única que comercializou os RHE em lata de alumínio, tendo o rótulo impresso no próprio corpo da embalagem. Nas demais marcas as bebidas foram encontradas embaladas em frascos plásticos com rótulos de papel ou de plástico.

Foi constatado que alguns produtos apresentavam ausência de especificação do sabor registrado na ANVISA. Essa situação foi observada para os sabores limão, abacaxi, uva verde e tangerina na marca C e, no sabor limão da marca D. Os demais RHE apresentaram registro individual por sabor e marca na referida Agência.

Uma possível explicação para a ausência de registro específico de sabor estaria no fato de que no Brasil a legislação vigente que versa sobre alimentos e rotulagem nutricional seja muito genérica e apresente certos pontos críticos, os quais ainda necessitam de aprimoramento²³.

A composição, temperatura e características sensoriais da bebida esportiva, entre elas o sabor, podem estimular sua ingestão pelo indivíduo, sendo que este último pode influenciar na composição centesimal do produto^{1,5,7-8,24,25}, indicando a importância de existirem várias opções de sabores de RHE no mercado para atender o público alvo, com suas respectivas composições expressas na rotulagem nutricional.

Em se tratando da rotulagem nutricional dos RHE, é importante destacar que a legislação brasileira, além de extensa, é muito diversificada^{26,27}, fato que pode, ao menos

Tabela 3. Legislação de rotulagem consultada, infringida pelos repositores hidroeletrólíticos avaliados, segundo a marca

Legislação infringida	Marca	Inadequação encontrada dos rótulos
Portaria 29/1998 ¹² , ANVISA, item 8.2.4	C	Não contém em destaque a informação “Diabéticos: contém (especificar o mono e ou dissacarídeo)”
Portaria 222/1998 ¹⁰ , ANVISA, item 9.1.2.3	D	Não apresentava em destaque a informação “Recomenda-se que os portadores de enfermidades consultem um médico e ou nutricionista, antes de consumir este produto”.
Portaria 157/2002 ¹⁸ , INMETRO, item 4.1.1	A, B, C, D	Na informação nutricional, a indicação quantitativa do conteúdo líquido em algarismos tamanho inferior ao regulamentado.
RDC 259/2002 ¹⁴ , ANVISA, item 3.1	A, B	Utilização de vocábulos, denominações, símbolos ou representações gráficas que tornam a informação falsa ou insuficiente induzindo o consumidor a erros ou atribuindo ao produto efeitos ou propriedades que não podem ser demonstradas.
RDC 259/2002 ¹⁴ , ANVISA, item 4	D	Informação obrigatória escrita com caracteres de tamanho, realce e visibilidade não adequados.
RDC 259/2002 ¹⁴ , ANVISA, item 6.5.1	A, B, C	Identificação do lote na embalagem, fora do rótulo.
RDC 259/2002 ¹⁴ , ANVISA, item 6.6.2	A, B, C	Falta informação sobre temperaturas máxima e mínima e tempo de conservação do produto depois de aberto.
RDC 259/2002 ¹⁴ , ANVISA, item 8.1	D	Denominação de venda do alimento (repositor hidroeletrólítico) sem contraste de cores que assegure sua correta visibilidade
RDC 360/2003 ¹⁶ , ANVISA, item 3.4.1.4	D	Rotulagem nutricional em lugar pouco visível, sem caracteres legíveis nem cores contrastantes.
RDC 360/2003 ¹⁶ , ANVISA, item 3.5.1	A, B, C, D	O teor de no mínimo um dos eletrólitos determinado extrapolou os $\pm 20\%$ permitidos.

em parte, contribuir para o elevado teor de inadequações observadas nos produtos (Figura 1, Tabela 3).

Todavia, mesmo com os entraves da legislação, a adesão às normas de rotulagem é de fundamental importância, visando a proteção do consumidor. As mensagens dispostas nas embalagens de bebidas, na forma de imagens ou palavras, são capazes de transmitir informações subliminares no cérebro, induzindo ao consumo inconsciente, o que justifica a importância da fiscalização e rigor nas regulamentações de rotulagem²⁸.

Entre as informações inadequadas veiculadas na rotulagem, foi verificado no presente estudo que as marcas

A, B e C atribuem ao consumidor dos seus produtos sensações que não podem ser demonstradas. Entre elas se destacaram as seguintes: “Com Marca A você vai mais longe”; marca B “... sem pesar no estomago” e marca C “... sem provocar sensação de peso no estomago”. A marca D mostra ilustrações duvidosas, que vão desde um homem em movimento usando terno e falando no celular ao esportista, fazendo alusão ao uso do RHE nestas situações, além de garantir que o produto “Hidrata e ajuda repor os sais minerais para o seu dia-a-dia”.

Estas constatações apontam para uma situação favorável a auto prescrição de RHE. Estudo recente

reportou que em São Paulo capital o consumo de suplementos nutricionais, entre eles de RHE, é feito em grande escala por auto prescrição (42,8%), seguido pela indicação de treinadores (27,5%). O referido estudo dá destaque às bebidas esportivas, uma vez que estas representaram o suplemento mais frequentemente utilizado por frequentadores de academia de Ginástica em São Paulo, SP²⁹.

No presente estudo foi notado que a marca C descumpriu o item 8.2.4 da portaria 29/1998¹², fato que pode colocar em risco a saúde de consumidores diabéticos, atletas ou não, uma vez que não especifica a presença de mono ou dissacarídeos, ou seja, de carboidratos glicêmicos com baixo grau de polimerização no RHE.

Inadequações em alimentos destinados a praticantes de atividade física também foram encontradas por Borges e colaboradores⁹, os quais constataram que muitos destes produtos comercializados em Goiânia (GO, Brasil), estavam inadequados às legislações vigentes da ANVISA (Portaria 29/1998¹² e 222/1998¹⁰ e RDC 259/2002¹⁴). As inconformidades detectadas por estes pesquisadores estavam relacionadas à denominação de venda, informações obrigatórias, conteúdo líquido, lote, prazo de validade, além do uso de ilustrações e expressões proibidas⁹.

No presente estudo foi notado ainda que todos os produtos analisados não atendiam às exigências mínimas do Inmetro¹⁸ no que tange ao tamanho dos caracteres alfanuméricos da tabela nutricional, fato que dificulta a leitura e conseqüentemente o conhecimento do conteúdo de micro e macro nutrientes veiculados pelo produto. Na marca D este particular foi agravado pela má qualidade da impressão dos rótulos nos lotes avaliados e no uso de cores claras (branco e verde claro), não contrastantes entre si, limitando ainda mais a visibilidade da informação.

No que tange ao teor dos eletrólitos, das 44 amostras analisadas, apenas 17 (38,6%), continham os teores dos três eletrólitos mensurados (Na, K e Cl), dentro da margem de tolerância estabelecida pela RDC 360/2003¹⁶ da Anvisa (Tabela 4).

Houve variações significativas ($p < 0,05$) entre as quantidades de eletrólitos observadas e os valores declarados nos rótulos de todas as marcas. Entre os produtos da marca A, apenas para o teor de potássio na bebida sabor pêssego não apresentou diferença do rotulado ($p = 0,0116$). Também na marca A foi notado que todos os sabores apresentaram coeficientes de variação inferiores a 7,5%. Similar resultado foi obtido na marca

D, produto sabor limão, mas a diferença encontrada foi apenas no valor de Na ($p = 0,012$).

Os RHE da marca B apresentaram inadequação simultânea nos três eletrólitos quantificados em todas as amostras avaliadas (K $p = 0,004$; Na $p = 0,044$; Cl $p = 0,002$). Nesta marca, os coeficientes de variação das bebidas abacaxi e laranja foram superiores a 13 e 12% para o K e Na, respectivamente. No caso do RHE sabor laranja, foi notado coeficiente de variação elevado para o Cl, enquanto no sabor uva o Na apresentou coeficiente de variação elevado.

Na marca C foi constatado que os sabores tangerina e limão apresentaram diferenças significativas na quantidade de cloreto quantificada e a rotulada ($p = 0,042$ e $p = 0,049$, respectivamente). No caso do sabor limão, os coeficientes de variação para K e Na foram superiores a 10%. Ainda na marca C foi verificado que o sabor uva verde deferiu nos três eletrólitos quantificados (K $p = 0,038$; Na $p = 0,021$; Cl $p = 0,043$), apresentando simultaneamente grande variação no teor de sódio entre os lotes examinados ($cv = 40,34$). O teor de K na bebida sabor água de coco comercializada pela marca C diferiu do rotulado ($p = 0,094$), sendo que os teores medidos de Na e cloreto mostraram variações superiores a 10% entre os lotes pesquisados.

Coefficientes de variação superiores a 10% podem indicar processos de produção com desvios importantes na etapa de dosagem dos eletrólitos dos produtos. Tal situação foi constatada em diversos produtos, apontando para a necessidade de aplicação de técnicas de formulação adequadas, visando a padronização dos valores dentro da faixa pretendida, de forma a não comprometer o principal objetivo do produto em questão.

Adicionalmente, pode ser notado na Tabela 4 que as discrepâncias entre os teores dos eletrólitos determinados e os valores rotulados nos RHE, variaram em até 64,45%, para o sódio (marca C, uva verde), 71,1% para o potássio (marca C, água de coco) e 62,8% para o cloreto (marca C, água de coco), valores que comprometem a alegação funcional dos produtos.

A preocupação com os teores dos eletrólitos nos RHE permeia a funcionalidade hidratante da bebida. Distúrbios hidroeletrólíticos podem afetar o esportista, incluindo a desidratação, hipoidratação e hiponatremia³⁰, podendo ser grave em função da duração e intensidade³¹. Por tanto é indiscutível a importância da concordância entre o teor rotulado dos eletrólitos e o dosado em laboratório, de bebidas esportivas^{26,27}.

Tabela 4. Conteúdo de sódio, potássio e cloreto declarado nos rótulos (Rót) dos repositores hidroeletrólitos (RHE) avaliados; média e desvio padrão (DP) dos valores determinados em laboratório*, seguido da respectiva diferença percentual em relação ao rotulado (Dif R).

n°	marca	RHE sabor	lote	Sódio				Potássio				Cloreto			
				média (mg/200mL)	DP	Rót.	Dif R (%)	Média (mg/200mL)	DP	Rót.	Dif R (%)	média (mg/200mL)	DP	Rót.	Dif R (%)
1		frutas	1	85,3	0,8	90	5,2	24,6	0,1	24	-2,5	92,9	3,9	84	-10,6
2		cítricas	2	77,8	0,5	90	13,5	22,5	0,1	24	6,3	89,2	1,6	84	-6,2
3		maracujá	1	86,9	0,6	90	3,4	25,6	0,6	24	-6,8	102,0	1,1	84	-21,4
4			2	78,5	0,7	90	12,8	23,1	0,2	24	3,8	111,2	3,2	84	-32,4
5		uva	1	80,4	0,6	90	10,6	23,2	0,3	24	3,4	94,1	0,7	84	-12,0
6			2	79,3	0,3	90	11,9	22,2	0,2	24	7,5	95,8	4,3	84	-14,0
7		pêssego	1	79,0	0,4	90	12,2	24,7	0,5	24	-2,9	97,8	4,2	84	-16,4
8			2	78,8	0,2	90	12,5	23,3	0,4	24	3,1	98,2	0,5	84	-16,9
9	A	limão	1	78,2	0,4	90	13,1	22,6	0,5	24	5,8	93,1	2,3	84	-10,8
10			2	77,0	0,5	90	14,5	21,8	0,6	24	9,3	100,3	1,9	84	-19,4
11		laranja	1	77,5	0,1	90	13,9	22,8	0,2	24	5,2	93,6	2,4	84	-11,4
12			2	77,3	0,2	90	14,1	22,0	0,5	24	8,5	97,3	1,1	84	-15,8
13		tangerina	1	78,1	0,7	90	13,2	22,7	0,4	24	5,3	96,6	1,1	84	-15,0
14			2	76,8	0,4	90	14,7	21,7	0,4	24	9,5	94,6	2,4	84	-12,6
15		açaí/ guaraná	1	79,3	0,3	90	11,9	22,8	1,0	24	5,2	99,0	3,5	84	-17,9
16			2	83,2	0,4	90	7,6	24,5	1,1	24	-2,1	95,1	2,4	84	-13,2
17		framboesa	1	75,7	0,8	90	15,9	21,6	0,2	24	10,0	106,0	2,6	84	-26,2
18			2	82,8	0,7	90	8,0	24,8	0,5	24	-3,5	100,5	1,2	84	-19,6
19		limão	1	102,7	0,5	90	-14,1	34,1	0,4	24	-42,0	113,7	1,8	84	-35,4
20			2	83,3	1,2	90	7,4	28,0	0,6	24	-16,5	101,5	3,2	84	-20,8
21		laranja	1	101,0	2,8	90	-12,2	33,5	1,0	24	-39,5	115,0	1,3	84	-36,9
22			2	84,3	0,1	90	6,4	27,6	0,1	24	-14,9	97,1	3,4	84	-15,6
23	B	maracujá	1	101,0	0,14	90	-12,2	33,7	0,2	24	-40,3	125,1	1,6	84	-48,9
24			2	94,8	0,3	90	-5,3	32,1	0,4	24	-33,8	109,2	1,1	84	-30,0
25		abacaxi	1	96,7	0,7	90	-7,5	32,7	0,4	24	-36,3	109,7	2,0	84	-30,6
26			2	101,9	0,2	90	-13,2	34,5	0,6	24	-43,8	120,9	6,7	84	-43,9
27		tangerina	1	100,9	0,5	90	-12,1	32,7	0,6	24	-36,2	120,7	6,3	84	-43,7
28			2	94,1	0,4	90	-4,6	30,7	0,4	24	-28,1	104,8	5,0	84	-24,8
29		uva	1	77,2	0,7	90	14,2	30,3	0,4	24	-26,0	97,8	4,5	84	-16,4
30			2	94,6	0,5	90	-5,1	29,9	0,5	24	-24,7	103,5	2,8	84	-23,2
31		uva verde	1	33,3	0,1	95	64,9	24,3	0,3	69	64,8	57,2	1,9	121	52,7
32			2	60,0	0,5	61	1,7	41,0	0,2	48	14,7	59,7	2,6	45	-32,7
33		tangerina	1	62,8	0,3	95	33,9	44,2	0,7	69	35,9	54,5	0,7	121	55,0
34			2	60,8	0,4	95	36,0	41,1	0,4	69	40,5	56,5	1,6	121	53,3
35	C	maracujá	1	61,1	1,1	95	35,7	45,6	0,7	69	34,0	57,6	2,4	121	52,4
36			2	63,7	0,8	95	32,9	46,1	0,3	69	33,3	119,2	3,1	121	1,5
37		limão	1	53,7	0,0	61	11,9	40,3	0,5	48	16,0	49,8	1,1	45	-10,7
38			2	62,9	0,1	61	-3,1	47,0	0,2	48	2,1	56,2	3,0	45	-24,9
39		abacaxi	1	64,3	0,5	61	-5,5	47,1	0,2	48	2,0	57,2	1,1	45	-27,1
40			2	57,9	0,3	61	5,2	41,9	0,6	48	12,6	57,7	0,9	45	-28,2
41		água de coco	1	51,4	0,5	48	-7,1	101,4	1,2	328	69,1	119,0	2,4	320	62,8
42			2	44,5	0,5	48	7,3	94,64	1,0	328	71,1	119,3	3,0	320	62,7
43	D	limão	1	51,6	0,3	52	0,8	24,0	0,2	25	3,8	69,9	1,1	48	-45,6
44			2	50,1	0,2	52	3,7	24,1	0,4	25	3,4	64,5	1,6	48	-34,4

* determinações feitas em triplicata.

Cabe destacar que o rótulo dos dois lotes correspondentes ao sabor uva verde da marca C apresentaram valores diferentes para o conteúdo dos eletrólitos analisados (Tabela 4). Neste produto, o teor de sódio no lote 1 apresentou 64,9% de diferença entre o teor de sódio rotulado e quantificado, enquanto que o teor cloreto determinado no lote 2 ultrapassou os 20% da diferença permitida com o teor declarado no rótulo.

O cloreto esteve presente em todos os produtos avaliados, em todas as marcas pelo menos uma amostra não esteve conforme com a tolerância estabelecida na legislação vigente¹⁶. O teor de cloreto apresentou discrepância de $\pm 20\%$ do declarado no rótulo em 56,82% dos RHE, abrangendo produtos de todas as quatro marcas incluídas no estudo (Tabela 4).

As concentrações de Na estiveram inadequadas em relação ao rotulado em 11,36% dos RHE, todos da marca C, nos sabores uva verde, tangerina e maracujá. Na análise das concentrações de K foi constatado que a margem de variação permitida pela ANVISA foi infringida por 40,9% dos RHE analisados. Todos os produtos da marca B e 4 produtos da marca C estavam entre os que apresentavam a referida inadequação (Tabela 4).

O potássio e o sódio são eletrólitos encontrados no suor em concentrações variáveis em função da intensidade do exercício, condições climáticas e composição corporal, fato que corrobora para sua inclusão em bebidas destinadas à praticantes de atividades físicas³¹. No que tange à absorção, há necessidade simultânea de sódio e glicose na mucosa do intestino delgado neste processo. Assim, em líquidos que tenham propósito de reposição hidroeletrólítica é imprescindível a presença simultânea em quantidades adequadas de glicose e sódio³¹.

No que se refere ao teor adequado, é sabido que a composição do RHE deve ter concentração de sódio entre 30 e 100 mmol/L, o que corresponde a 138 e 460mg/200mL (mg de sódio por porção de consumo do RHE). As soluções com teores superiores a 100 mmol/L (460mg/200mL) de sódio podem até resultar em situações clínicas de hipernatremia³².

Usando como critério o teor mínimo de sódio esperado para bebida com função de reposição hidroeletrólítica, que é de 30mmol/L (138mg/200mL)³², pode ser verificado que nenhum dos RHE apresentava esta concentração na rotulagem ou no teor quantificado em laboratório (Tabela 4). Desta forma, todos os RHE analisados apresentavam concentração de sódio conducente à hiponatremia.

Pesquisadores australianos relataram caso de hiponatremia em paciente que ingeriu RHE comercial. Nesse estudo foi investigado o teor dos eletrólitos sódio e potássio de três marcas comerciais de RHE, a saber: Gastrolyte®, Powerade® e Gatorade®. Os resultados mostraram os seguintes valores 60, 5 e 18mmol/L de sódio, e 20, 7 e 3mmol/L de potássio, respectivamente. Nenhum dos RHE analisados pelos pesquisadores apresentou o perfil hidroeletrólítico proposto pela OMS, a saber: 90mmol/L de sódio e 20mmol/L de potássio. Na anamnese foi constatado que o paciente havia tomado a bebida Powerade®, tendo sido concluído esta ingestão foi determinante do quadro de hiponatremia apresentado (sódio sérico = 124mmol/L)³³.

No presente estudo, considerando a concentração ideal de sódio e potássio (Na = 90mmol/L ou 414mg/200mL e K = 20mmol/L ou 156mg/200mL)³³, foi verificado que nenhum dos produtos analisados apresentava perfil eletrólítico condizente para promover a reposição hidroeletrólítica alegada na rotulagem dos RHE, seja pelos teores rotulados ou pelos quantificados (Tabela 4).

A recomendação da Associação Americana de Dietistas (ADA) é de que a bebida hidroeletrólítica apresente teor de sódio em torno de 50mmol/L ou aproximadamente 200mg/L, salientando que a concentração usualmente é bastante variável entre as bebidas comerciais disponíveis³¹. Mesmo assim, em nenhum momento a ADA considera que o teor rotulado dos eletrólitos apresente discrepância significativa em relação ao quantificado.

O presente estudo, embora com a limitação do número de marcas envolvidas, permitiu mostrar que a função da rotulagem dos RHE está deturpada frente à quantidade de irregularidades observadas, sendo esta uma tendência constatada em todas as marcas. Fiscalizar os produtos e empresas ajudaria evitar falhas graves na informação nutricional e impedir que o consumidor tenha acesso ao consumo de produto potencialmente perigoso à saúde.

CONCLUSÃO

Os rótulos de repositores hidroeletrólíticos, de quatro marcas distintas comercializados em duas metrópoles nacionais, apresentam adequações à Lei 10.674/2003, Portaria 27/98 e RDC 359/2003. Por outro lado, foram constatadas diversas infrações em relação às demais legislações vigentes no Brasil, a saber: Portaria 29/98, Portaria 222/98, RDC 259/2002, RDC 360/2003 e Portaria Inmetro

157/2002. As marcas A e B apresentaram individualmente um total de 5 infrações, enquanto as marcas C e D apresentaram 6 e 8 infrações, respectivamente.

Entre as inadequações estão incluídas as discrepâncias que extrapolam a margem de 20% entre os teores rotulados e quantificados de sódio, potássio e cloreto, fato que pode colocar em risco a saúde do consumidor e ao mesmo tempo se opõe ao propósito alegado pelos produtos. Outro agravante o constitui as variações do teor dos eletrólitos avaliados entre distintos lotes de produção, apontando para falhas no processo produtivo das bebidas. A concentração de sódio e de potássio, rotulada e quantificada, em todos os RHE analisados é favorável à hiponatremia.

Mais esforços são necessários para que as empresas mantenham a declaração dos nutrientes em concordância com o apresentado pelo produto e, neste caso visando que os RHE tenham sua função preservada.

AGRADECIMENTOS

Morgano MA agradece ao CNPq e Quintaes KD agradece à Fapemig, ambos pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Casa DJ, Armstrong LE, Hillman SK, Mountain SJ, Reiff RV, Rich BS, et al. National Athletic Trainer's Association Position Statement (NATA): Fluid replacement for athletes. *J Athl Train*. 2000; 35: 212-24.
2. Vimieiro-Gomes AC, Rodrigues LOC. Avaliação do estado de hidratação dos atletas, estresse térmico do ambiente e custo calórico do exercício durante sessões de treinamento em voleibol de alto nível. *Rev Paulista Edu Física*. 2001; 15:201-11.
3. Armstrong LE, Soto JAH, Hacker FT, Casa DJ, Kavouras SA, Maresh CM. Urinary indices during dehydration, exercise and rehydration. *Int J Sport Nutr*. 1998; 8:345-55.
4. Machado-Moreira CA, Vimieiro-Gomes AC, Silami-Garcia E, Rodrigues LOC. Hidratação durante o exercício: a sede é suficiente? *Rev Bras Med Esporte*. 2006; 12:405-9.
5. Koulmann N, Melin B, Jimenez C, Charpenet A, Savourey G, Bittel J. Effects of different carbohydrate-electrolyte beverages on the appearance of ingested deuterium in body fluids during moderate exercise by humans in the heat. *Eur J Appl Physiol*. 1997; 75:525-13.
6. Armstrong LE, Maresh CM, Gabaree CV, Hoffman JR, Kavouras SA, Kenefick RW, et al. Thermal and circulatory responses during exercise: effects of hypohydration, dehydration, and water intake. *J Appl Physiol*. 1997; 2: 2028-35.
7. Davis JM, Lamb DR, Pate RR, Slentz CA, Burgess WA, Bartoli WP. Carbohydrate-electrolyte drinks: effects on endurance cycling in the heat. *Am J Clin Nutr*. 1988; 48:1023-30.
8. Davis MJ, Burgess WA, Slentz CA, Bartoli WP. Fluid availability of sports drinks differing in carbohydrate type and concentration. *Am J Clin Nutr*. 1990; 51:1054-7.
9. Borges RF, Sarmiento RM, Ferreira TAPC. Conformidade da rotulagem de alimentos para praticantes de atividade física segundo a legislação brasileira. *Hig Aliment*. 2005; 15:127-35.
10. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº.222 de 24 de março de 1998. Aprova o Regulamento Técnico referente a Alimentos para Praticantes de Atividade Física. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. 1998 25 mar. Seção 1.
11. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº.27 de 13 de janeiro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico referente à Informação Nutricional complementar. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. 1998 16 jan; (11-E):1; Seção 1.
12. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº.29 de 13 de janeiro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico referente a Alimentos para Fins Especiais. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. 1998 15 jan; (10-E):8; Seção 1.
13. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. Resolução RDC n.340, de 13 de dezembro de 2002. Determina que as empresas fabricantes de alimentos que contenham na sua composição o corante tartrazina (INS 102) devem obrigatoriamente declarar na rotulagem, na lista de ingredientes, o nome do corante tartrazina por extenso. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. 2002 18 dez; Seção 1.
14. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa Resolução RDC nº 259, de 20 de setembro de 2002. Aprova regulamento técnico sobre rotulagem de alimentos embalados. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. 2002 23 set; (184):33; Seção 1.
15. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa Resolução RDC nº.359, de 23 de dezembro de 2003. Aprova o regulamento técnico de porções de alimentos embalados para fins de rotulagem nutricional. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. 2003 26 dez; (251):28; Seção 1.
16. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa Resolução RDC nº.360, de 23 de dezembro de 2003. Aprova o regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. 2003 26 dez; (251):33; Seção 1.
17. Brasil. Congresso Nacional. Lei n.10.674, 16 de maio de 2003. Obriga que os produtos alimentícios comercializados informem sobre a presença de glúten. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. 2003 19 maio; (94):1; Seção 1.
18. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial – Inmetro. Portaria nº 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] República Federativa do Brasil. 2002 20 ago; (EI):161; Seção 1.
19. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. <http://www.anvisa.gov.br/> [Acesso em 30 de julho de 2007].
20. Galeazzi MAM, Domene SMA, Sichiari, R. Estudo multicêntrico sobre consumo alimentar. *Cad. Debate*. 1997; Volume especial: 1-62.

21. Morgano MA, Queiroz SCN, Ferreira M. Determinação dos teores de minerais em sucos de frutas por espectrometria de emissão óptica em plasma indutivamente acoplado (ICP OES). *Ciênc Tecnol Aliment*. 1999; 19: 344-8.
22. 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.
23. Ferreira AB, Lanfer-Marquez UM. Legislação brasileira referente à rotulagem nutricional de alimentos. *Rev Nutr*. 2007; 20: 83-93.
24. American College of Sports Medicine – Position Stand: exercise and fluid replacement. *Med Sci Sports Exerc*. 1996; 29: 1-11.
25. Wouassi D, Mercier J, Ahmaidi S, Brun JF, Mercier B, Orsetti A, et al. Metabolic and hormonal responses during repeated bouts of brief and intense exercise: effects of pre-exercise glucose ingestion. *Eur J Appl Physiol*. 1997; 76: 197-202.
26. Petrus RR, Faria JAF. Processamento e avaliação de estabilidade de bebida isotônica em garrafa plástica. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2005; 25: 518-24.
27. Amendola C, Iannilli I, Restuccia D, Santini I, Vinci G. Multivariate statistical analysis comparing sport and energy drinks. *Innovative Food Sci Emerging Technol*. 2004; 5: 263-7.
28. Karremans JC, Stroebe W, Claus J. Beyond Vicary's fantasies: The impact of subliminal priming and brand choice. *J Experiment Social Psychol*. 2006; 42: 792-8.
29. Hirschbruch MD, Fisberg M, Mochizuki L. Consumo de suplementos por jovens frequentadores de academias de ginástica em São Paulo. *Rev Bras Med Esporte* 2008; 14: 539-43.
30. Noakes DT. Overconsumption of fluids by athletes. *BMJ* 2003; 327: 113-4.
31. ADA Reports. Position of the American Dietetic Association, Dietitians of Canada and American College of Sport Medicine: Nutrition and athletic performance. *J Am Diet Ass*. 2000; 100: 1543-56.
32. Sena LV, Maranhão HS, Morais MB. Avaliação do conhecimento de mães sobre terapia de reidratação oral e concentração de sódio em soluções sal-açúcar de preparo domiciliar. *J Pediatr*. 2001; 77: 481-6.
33. Hornung TS. Hyponatremia after rehydration with sports drinks. *Lancet* 1995; 345: 1243.

Avaliação da qualidade físico-química de alimentos comercializados em restaurantes *self-service*

Evaluation of quality of foods commercialized in self-service restaurants

RIALA6/1221

Julianna SHIBAO^{1*}, Roberto Carlos Fernandes BARSOTTI¹, Estevão de Camargo PASSOS¹, Luiz Carlos MARONO², Yara Lucia de Castro ROUSSENG², Maria de Lourdes Paixão da SILVA¹, André Luis Monteiro ARAÚJO¹, Eduardo GONZALEZ¹, Mário TAVARES¹

*Endereço para correspondência: Seção de Bromatologia e Química, Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Regional de Santos - Rua: Silva Jardim, 90, Vila Nova, 11015-020, Santos, SP, Brasil. e-mail: jushibao@usp.br

¹Instituto Adolfo Lutz – Laboratório Regional de Santos – Seção de Bromatologia e Química

²Divisão de Vigilância Sanitária, Secretaria de Saúde Pública, Prefeitura Municipal de Praia Grande, SP, Brasil
Recebido: 27.01.2009 – Aceito para publicação: 31.07.2009

RESUMO

O consumo de alimentos fora do domicílio vem aumentando no Brasil, podendo expor a riscos sua qualidade e a saúde dos consumidores. Assim, este trabalho avaliou a qualidade físico-química dos alimentos servidos nos balcões de restaurantes *self-service* no município de Praia Grande/SP, em 2006. Foram coletadas 154 amostras de alimentos, compreendendo água, óleo de fritura, salada crua e salada de maionese. As análises realizadas nas amostras de água foram odor, cor aparente, turbidez, pH, fluoreto, cloro residual livre e cloro residual total. Nos óleos foram analisados em laboratório a acidez e os compostos polares e, no momento da coleta, a temperatura e a prova denominada “oil test”. Nas saladas cruas foram realizadas análises microscópicas e, nas de maionese, análises sensoriais e macroscópicas. Os resultados obtidos demonstraram que 52% das amostras de água foram reprovadas, principalmente pelo parâmetro fluoreto; nos óleos foram 25% de reprovação; já nas saladas cruas foi de 90% de aprovação e nas saladas de maionese 100% foram aprovadas. Esses resultados demonstram a importância das boas práticas de fabricação e manipulação em unidades de alimentação e que o monitoramento das preparações comercializadas em restaurantes *self-service* é de fundamental importância para garantir a segurança do alimento fornecido ao consumidor.

Palavras-chave. Vigilância Sanitária, Saúde Pública, alimentos, análise físico-química, restaurantes *self-service*.

ABSTRACT

The food consumption outside home boundary has been increasing in Brazil, which is a risk factor for product quality and consumers' health.. Therefore, the purpose of this study was to evaluate the quality of foods served in the balconies of self-service restaurants in the Praia Grande city, Sao Paulo State, Brazil, in 2006 year. 154 samples were collected by the Sanitary Vigilance of that city, such as water, frying oil, crude salad and cooked mayonnaise salad. The analyses in the water were odor, color, turbidity, pH, fluoride, free residual chlorine and total residual chlorine. In frying oils, acidity, polar compounds, temperature and “oil test” were investigate. In the crude salad was analyzed microscopically, and finally in the cooked mayonnaise salad was done sensorial analyses and macroscopic. All samples were analyzed in Adolfo Lutz Institute Regional Laboratory of Santos city. The results had demonstrated that 52% of the water samples were inappropriate, specially fluoride parameter; in oils 25% were inappropriate, in the crude salad was 90% of approval and in the cooked mayonnaise salad 100% of the samples had been approved. These results demonstrate the importance of a good food practices and manipulation in restaurants and the importance of an intensive plan to guarantee the quality control of the preparations commercialized in *self-service* and the security of the food that is supplied to consumer.

Key words. Sanitary Vigilance, Public Health, food, phisical-chemical analysis, *self-service* restaurant.

INTRODUÇÃO

No Brasil visualiza-se uma tendência de crescimento no número de refeições realizadas fora do domicílio. Em média, a população brasileira gasta 25% das despesas alimentares em consumo fora de casa, de acordo com a Pesquisa de Orçamento Familiar (POF) do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística e da Associação Brasileira de Bares e Restaurante¹.

Com o crescimento desses serviços, observa-se que os alimentos ficam mais expostos a uma série de perigos associados a práticas incorretas de manipulação e processamento que levam a alterações físico-químicas dos mesmos. Nesse sentido, os operadores que atuam na preparação das refeições são fundamentais na prevenção das doenças de origem alimentar para a população que se alimenta fora do domicílio^{2,3}.

A segurança sanitária dos alimentos ofertados para consumo da população é um dos desafios da Saúde Pública. A produção de refeições envolve um conjunto de ferramentas para a garantia da qualidade e segurança. A detecção e rápida correção de falhas no processamento dos alimentos, bem como a adoção de medidas preventivas, são hoje a principal estratégia para o controle de qualidade desses produtos⁴.

Para a prevenção das doenças de origem alimentar são preconizadas a educação e a formação dos operadores que trabalham em serviços de alimentação, pois se considera primordial a incorporação de práticas voltadas para o controle de qualidade e a segurança do alimento².

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), vinculada ao Ministério da Saúde, exerce um papel importante na área de alimentos, pois compreende não só ações de fiscalização, como também orientando e informando produtores e consumidores⁵.

Ao longo dos anos, diversas medidas têm sido regulamentadas a fim de garantir a qualidade dos alimentos, desde regulamentos técnicos específicos até normas de caráter geral, aplicáveis a todo tipo de produtos alimentícios⁵. A Anvisa, no conjunto de suas ações de controle na área de alimentos, tem um programa de Capacitação de Recursos Humanos em Sistemas Modernos de Inspeção Sanitária.

Suas ações visam: 1) avaliar as práticas adotadas pelos estabelecimentos produtores e prestadores de serviços da área de alimentos e de alimentação; 2) intervir nas situações de risco de contaminações por perigos químicos, físicos ou biológicos, ou em casos de riscos

de possíveis agravos pelos alimentos colocados para consumo. Essas ações devem ser colocadas em prática pela vigilância sanitária dos municípios para melhorar a qualidade dos alimentos servidos⁶.

Nesse contexto, os municípios com vocação turística merecem atenção especial visto que, além da população fixa, recebem um grande número de visitantes. É o caso de Praia Grande, no Estado de São Paulo, uma estância balneária, com mais de 230.000 habitantes⁷, que chega a receber um milhão de turistas na época de veraneio, os quais usufruem dos alimentos oferecidos pelos restaurantes do tipo *self-service*.

A Secretaria da Saúde Pública do citado município realizou, em 2006, o Programa da Qualidade dos Alimentos em *Self-service*, em parceria com o Laboratório Regional de Santos do Instituto Adolfo Lutz (IAL), com o objetivo de identificar possíveis riscos de infecção alimentar e orientar os responsáveis pelos estabelecimentos⁸.

Este trabalho teve como objetivo avaliar as condições físico-químicas dos seguintes alimentos comercializados em restaurantes *self-service* do município de Praia Grande, Estado de São Paulo, envolvidos no referido programa: água de abastecimento público, óleo de fritura, salada crua e salada cozida de maionese.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no município de Praia Grande, São Paulo, no ano de 2006. Foram coletadas pela equipe da Vigilância Sanitária do Município de Praia Grande, no total, 154 amostras, assim distribuídas: 44 de água de abastecimento público, 44 de óleo de fritura, 41 de salada crua e saladas cozidas de maionese. A coleta foi realizada no período de 03 de junho de 2006 a 18 de dezembro de 2006, correspondendo a 25 semanas.

Antes das tomadas das amostras foi feita uma avaliação das condições de higiene do local, em especial da manutenção da caixa d'água, verificação do procedimento empregado no processo de fritura em cada estabelecimento, presença de insetos e roedores e higiene na manipulação dos alimentos.

Os estabelecimentos foram selecionados segundo o planejamento de visitas periódicas elaboradas pelos dois órgãos públicos envolvidos.

Todas as análises laboratoriais foram efetuadas na Seção de Bromatologia e Química do Laboratório Regional de Santos do IAL.

Quarenta e quatro amostras de água de abastecimento público foram coletadas em recipientes plásticos, transparentes e estéreis. As análises foram realizadas logo após a chegada das amostras no laboratório quanto aos seguintes parâmetros: odor, cor aparente, turbidez, fluoreto, cloro residual livre (CRL), cloro residual total (CRT) e pH.

Quarenta e quatro amostras de óleo foram obtidas no momento da fritura nos restaurantes *self-service* visitados, e guardadas em frascos plásticos escuros, com tampa, para evitar sua oxidação. As amostras foram conservadas em freezers até o início das análises.

Nas amostras de óleo foi medida, durante a fritura, a temperatura e realizada a prova denominada "Oil test" e, em laboratório, os teores de acidez, em ácido oléico e compostos polares.

Quarenta e uma amostras de salada crua foram coletadas em recipientes de alumínio lacrados e conservadas na geladeira até o momento das análises microscópicas para verificar presença de larvas e parasitas.

Vinte e cinco amostras de salada cozida de maionese também foram acondicionadas em recipientes de alumínio lacrados e conservados na geladeira até o momento das análises. Foram realizadas análises sensoriais e macroscópicas para pesquisa de parasitas, larvas e sujidades.

As análises realizadas no óleo e na água basearam-se nos "Métodos físico-químicos para análise de alimentos"⁹ e em manuais do aparelho para determinação de compostos polares e polímeros conhecido como "Fri-check" e dos kits utilizados na prova do "Oil test", com escala de 4 cores e respectivas interpretações, a saber: azul escuro (bom); azul claro (regular); marrom (trocar); verde (péssimo).

As análises micro e macroscópica foram efetuadas segundo a metodologia descrita por Dimov¹⁰ e as análises sensoriais, de acordo com Rodas¹¹.

Ressalte-se que, no mesmo programa, também foram realizadas análises microbiológicas das amostras de água e alimentos, a serem descritas em outro trabalho.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados obtidos, de um total de 154 amostras, 116 (75,3%) foram aprovadas e 38 (24,7%) reprovadas (Tabela 1).

A Figura 1 apresenta os dados obtidos para as amostras de água de abastecimento público. Com base nos limites estabelecidos pela Portaria nº 518/2004, do Ministério da Saúde, 11 (25%) estavam em desacordo com relação a pelo menos um ensaio¹².

Os parâmetros físico-químicos com o maior número de amostras reprovadas foram o fluoreto com 5 amostras (11,4%) sendo que a maior parte dessas condenações foram por valores acima dos limites estabelecidos pela Portaria nº 518/2004. Seguido do fluoreto, os parâmetros cloro residual livre e cor aparente apresentaram 3 reprovações (6,8%). O parâmetro odor não foi objetável, enquanto que a turbidez e o pH exibiram valores dentro dos limites estabelecidos e recomendados pela citada Portaria, respectivamente.

Esses resultados gerais das amostras de água foram também observados por Freitas¹³, onde a maior parte das inconformidades foi por fluoreto, seguido de cloro residual livre. Além disso, é concordante também com os resultados encontrados por Tavares¹⁴ na Região Metropolitana da Baixada Santista, Estado de São Paulo.

Tabela 1. Amostras de alimentos comercializadas em restaurantes *self-service* do Município de Praia Grande/SP – total e percentual de aprovação e reprovação.

Amostras	Total	Aprovadas	Reprovadas
Água de abastecimento	44	33 (75%)	11 (25%)
Óleo de fritura	44	33 (75%)	11(25%)
Salada crua	41	37 (90,3%)	4(9,7%)
Salada cozida de maionese	25	25 (100%)	0 (0%)
Total	154	116 (75,3%)	38 (24,7%)

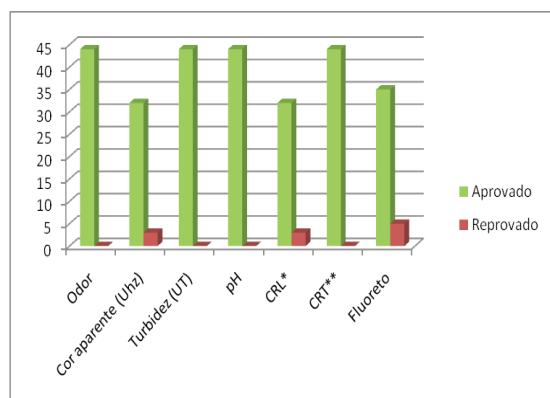


Figura 1. Resultados das análises físico-químicas em amostras de água de abastecimento público coletadas durante o programa.

*Cloro Residual Livre

** Cloro Residual Total

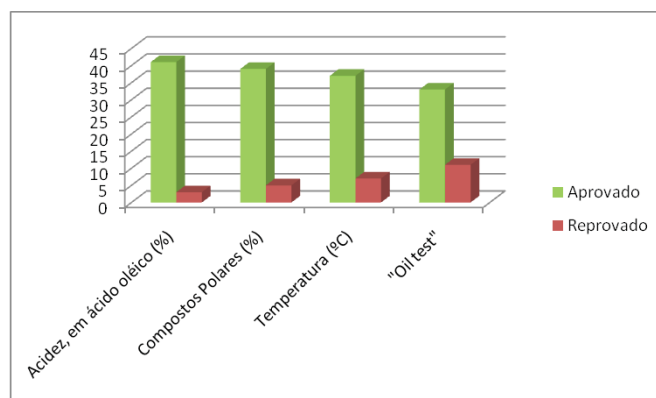


Figura 2. Resultados das análises físico-químicas em amostras de óleo de fritura coletadas durante o programa.

Já a Figura 2 revela que, do total de 44 amostras de óleo de fritura coletadas, 33 (75%) foram aprovadas e 11 (25%) reprovadas, com base nos limites máximos para acidez, em ácido oléico (0,9%) e compostos polares (25%) recomendados pelo Informe Técnico nº 11/2004¹⁵ e na temperatura máxima estabelecida pela Resolução nº 216/2004¹⁶, ambas da Anvisa.

Dentre os parâmetros reprovados isoladamente, a temperatura foi o mais discordante, com 7 amostras (15,3%). Observou-se que, no momento da coleta, as fritadeiras utilizadas no processo não possuíam nenhum controle de temperatura, o que pode ter contribuído para este resultado. A seguir, estiveram os compostos polares com 5 (11,4%) e a acidez, com 3 (6,8%) amostras insatisfatórias. Com relação ao "Oil test", do total de amostras, 13 foram consideradas boas (29,5%), 20 consideradas regulares (45,5%), 9 deveriam ser trocadas (20,5%) e 2 se revelaram péssimas (4,5%) de acordo com a escala do mencionado kit.

A análise de compostos polares é considerada internacionalmente como uma das principais características de qualidade dos óleos e gorduras utilizados em frituras, como já foi observado por Tavares¹⁷. Apesar da prova de campo denominada "Oil Test" ser considerada limitada, ela serviu como indicativo da qualidade do óleo de fritura por ser de fácil execução¹⁸.

Tais constatações se assemelharam a trabalho realizado em 2005 com óleo de fritura coletado em estabelecimentos e no comércio ambulante da Região Metropolitana da Baixada Santista¹⁷ e com resultados obtidos por Ans¹⁹ em óleos de frituras utilizados em lanchonetes e restaurantes.

De um total de 41 amostras de salada crua analisadas, 4 foram reprovadas (10%) e 37 aprovadas (90%), conforme mostra a Figura 3.

As inconformidades se deram pela presença de insetos vivos ou mortos do gênero *Drosophila*, segundo a Resolução nº 175/2003 da ANVISA²⁰. A presença de insetos do gênero *Aphis* sp e de ácaros, larvas de vida livre e ovos não causou reprovação, porém a presença de todos ou de alguns deles indica má higienização da amostra podendo causar riscos à saúde do consumidor transmitindo doenças parasitárias.

Resultados semelhantes foram encontrados por Oliveira e Germano²¹ na Região Metropolitana de São Paulo. A má higienização de hortaliças reflete a falta de qualificação dos manipuladores de alimentos. Por seu lado, o segmento de restaurantes comerciais necessita qualificar a gestão de pessoas nas empresas, para que possa

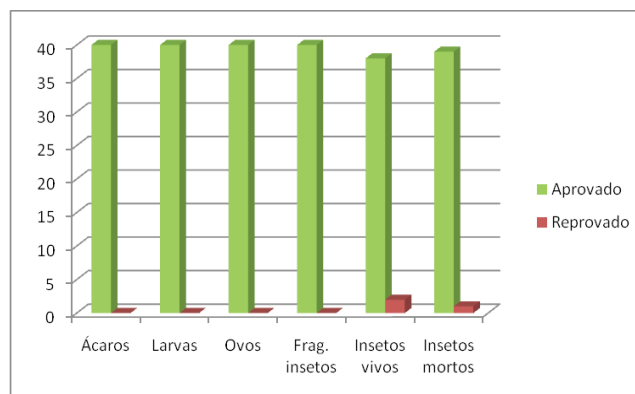


Figura 3. Resultados das análises microscópicas das amostras de salada crua coletadas durante o programa.

oferecer condições de segurança alimentar à população consumidora, como também concluíram Cavalli e Salay²².

Todas as análises realizadas nas amostras de salada cozida de maionese foram aprovadas. Os parâmetros macroscópicos analisados foram sujidades, parasitas, larvas, conforme a Resolução nº 175/2003 da ANVISA²⁰ e, características sensoriais, de acordo com a norma ABNT NBR 12806²³.

CONCLUSÃO

Considerando os resultados deste estudo, fica cada vez mais evidente a importância de levantamentos sistemáticos que tornem efetivo o controle de qualidade dos alimentos de restaurantes *self-service* do município de Praia Grande.

As amostras de água foram as que apresentaram maior número de condenações. Sabendo-se da importância de se controlar de modo efetivo o processo de fluoretação das águas de abastecimento, tanto para o sucesso dos programas de profilaxia de cárie dental, quanto para a prevenção da fluorose dentária, é necessário proceder a levantamentos periódicos do teor de flúor encontrado nas águas de abastecimento público pois, segundo a literatura consultada, este parâmetro é o mais discrepante dos padrões estabelecidos.

Além disso, a cloração das águas tratadas deve ser melhorada para uma efetiva qualidade microbiológica.

Sabe-se que alterações físico-químicas nos alimentos implicam a formação de compostos que podem trazer implicações nutricionais é de fundamental importância o monitoramento adequado da qualidade de óleos e gorduras empregados no processo de fritura pelos órgãos competentes.

Nas saladas cruas houve um baixo índice de resultados insatisfatórios, pois o regulamento técnico brasileiro, por ser abrangente, não dá amparo legal para as condenações pela presença de larvas de vida livre, naturalmente presentes em hortaliças.

O monitoramento das preparações comercializadas em restaurantes *self-service* é de fundamental importância para garantir a segurança do alimento que é fornecido ao consumidor. Essas ações deveriam ser permanentes, realizadas pelos órgãos competentes, e não apenas uma medida realizada em épocas de veraneio ou surtos alimentares.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem à equipe da Vigilância Sanitária da Prefeitura Municipal de Praia Grande pelo auxílio prestado durante as coletas das amostras.

REFERÊNCIAS

1. Associação Brasileira de Bares e Restaurantes [ABRASEL]. [acesso em 10 de janeiro de 2009]. Disponível em: <http://www.abrasel.com.br/index.php/atualidade/item/5522/>.
2. Panetta JC. O manipulador: fator de segurança e qualidade dos alimentos. *Hig Alimentar*. 1998; 12 (57): 8-10.
3. Góes JAW, Furtunato DMN, Veloso IS, Santos JM. Capacitação dos manipuladores de alimentos e a qualidade da alimentação servida. *Hig Alimentar*. 2001; 15 (85): 20-2.
4. Germano, PML, Germano, MIS. Higiene e vigilância Sanitária de alimentos. São Paulo: Varela; 2001.
5. Almeida-Muradian, LB, Penteado, MVC. Vigilância Sanitária: Tópicos sobre Legislação e Análise de Alimentos. 1º ed. Rio de Janeiro: Ed Guanabara Koogan; 2007.
6. Brasil. Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999 da ANVISA. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. *Diário Oficial [da] União, Brasília*, 1999. Disponível em <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=16621&word=>.
7. Região Metropolitana da Baixada Santista. [acesso em 5 de janeiro de 2009]. Disponível em http://pt.wikipedia.org/wiki/Regi%C3%A3o_Metropolitana_da_Baixada_Santista.
8. Solano, P. Vigilância Sanitária inspeciona *fast foods* para evitar contaminação alimentar. [15 de fevereiro de 2008]. Disponível em http://www.praiagrande.sp.gov.br/pgnoticias/noticia_02.asp?cod=5715&cd_categoria=
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.
10. Dimov, MN, Silveira, VR, Elian, SN, Penteado, ADV. Extração de sujidades em farinha de trigo integral: validação de metodologia. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2004; 63 (1): 91-6.
11. Rodas, MAB, Torre, JCMD, Takeda, MM. Abordagem da análise sensorial no laboratório de saúde pública [Manual]. São Paulo, São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2004.
12. Brasil Ministério da Saúde. Portaria nº 518 de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativas ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade e dão outras providências. *Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil, Brasília, DF*, p. 266-9, 26 de mar. 2004, Seção 1.
13. Freitas, VPS, Brígido, B M, Badolato, MIC, Alaburda, J. Padrão físico-químico da água de abastecimento público da região da Campinas. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2002; 61 (1): 51-8.

14. Tavares, M, Mello, ARP, Sousa, CV; Souza, DL, Gonzalez, E, Sutilo, ECL. et al. Avaliação da qualidade da água para consumo humano na região metropolitana da Baixada Santista, estado de São Paulo, no biênio 2003-2004. *Bol Inst Adolfo Lutz* 2005; 15 (2): 10-2.
15. Agência Nacional de Vigilância Sanitária [Anvisa]. Informe Técnico nº 11, de 5 de outubro de 2004 (c). Óleos e gorduras utilizados em frituras. [acesso em 07 de outubro de 2007]. Disponível em: http://anvisa.gov.br/alimentos/informes/11_051004.htm.
16. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária [Anvisa] Resolução RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004 (b). Dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF 2004. Disponível em <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=12546&word=>.
17. Tavares, M., Gonzalez, E, Silva, MLP, Barsotti, RCF, Kumagai, EE, Caruso, MSF. et al. Avaliação da qualidade de óleos e gorduras utilizados para fritura no comércio da região metropolitana da Baixada Santista, Estado de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 2007, 66 (1): 40-4.
18. Sanibal, EAA, Mancini Filho, J. Alterações Físicas, Químicas e Nutricionais de Óleos Submetidos ao Processo de Fritura. Caderno de Tecnologia de Alimentos & Bebidas: 48-54, *Food Ingredients South America* [periódico na Internet] 2002 [acesso em 30 de novembro de 2007]. Disponível em http://www.feg.unesp.br/~rioparaiba/biodiesel/alteracoes_oleo_de_fritura.pdf.
19. Ans, VG, Mattos, ES, Jorge, N. Avaliação da qualidade dos óleos de fritura usados em restaurantes, lanchonetes e similares. *Ciênc Tecnol Aliment*.1999; 19 (3): 413-9.
20. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária [Anvisa] Resolução RDC nº 175, de 8 de julho de 2003.. Aprova o regulamento técnico de avaliação de matérias macroscópicas e microscópicas prejudiciais à saúde humana em alimentos embalados. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2003. [acesso em 29 de novembro de 2007]. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/rdc/175_03rdc.html.
21. Oliveira, CAF, Germano, PML. Estudo da ocorrência de enteroparasitas em hortaliças comercializadas na região metropolitana de São Paulo, SP, Brasil. I - Pesquisa de helmintos. *Rev Saúde Pública* 1992, 26 (4): 283-9.
22. Cavalli, SB; Salay, E. Gestão de pessoas em unidades produtoras de refeições comerciais e a segurança alimentar. *Revista de Nutrição*. 2007; 20 (6): 657-67.
23. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 12806: Análise sensorial de alimentos e bebidas. Terminologia. Rio de Janeiro, 1993.

Contaminação bacteriológica de águas subterrâneas da região oeste de Santa Catarina, Brasil

Bacteriological contamination of groundwater of the western area of Santa Catarina, Brazil

RIALA6/1222

Patrícia da Silva MALHEIROS^{1*}, Daniela Fernanda SCHÄFER², Indianara Maria HERBERT², Sônia Mari CAPUANI², Eliane Machado da SILVA², Cassius Ugarte SARDIGLIA², Diane SCAPIN², Eliandra Mirlei ROSSI², Adriano BRANDELLI¹

*Endereço para correspondência: Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul Av. Bento Gonçalves 9500, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil.
e-mail: patimalheiros@yahoo.com.br

¹Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

²Laboratório de Pesquisa e Diagnóstico em Microbiologia, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade do Oeste de Santa Catarina, São Miguel do Oeste, SC, Brasil

Recebido: 29.04.2009 – Aceito para publicação: 23.08.2009

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar a qualidade bacteriológica de águas subterrâneas da região oeste do Estado de Santa Catarina, onde é comum a utilização de poços comunitários ou particulares. As amostras foram avaliadas pela técnica de fermentação em tubos múltiplos de acordo com a metodologia descrita no American Public Health Association e segundo a instrução normativa 62 de 26 de agosto de 2003, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Além disso, foi realizado levantamento de dados por meio de um questionário, cujas questões foram respondidas pelo responsável pelo respectivo poço. Das 212 amostras de água analisadas, 161 (75,94%) estavam impróprias para o consumo humano, conforme a Portaria 518/2004 do Ministério da Saúde. Apesar dos altos índices de contaminação bacteriológica nas amostras avaliadas, a maioria dos consumidores julga essa água de boa qualidade e por isso, apenas 10% dos usuários costumam filtrar e 8% fervem a água antes do consumo. Portanto, torna-se necessário a adoção de medidas preventivas e o tratamento das águas já comprometidas.

Palavras-chave. gastroenteropatias, poços, coliformes, microbiologia da água.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the bacteriological quality of groundwater in the west region of the State of Santa Catarina, where it is common the use of private or community wells. The samples were assessed by Multiple Tube Fermentation technique according to methodology described in the American Public Health Association guidelines, and in accordance with Federal Decree 62, 26 August 2003 of Brazilian Ministry of Agriculture and Supply. A data survey was conducted by means a questionnaire which was asked to be answered by persons responsible for the wells. According to the Decree 518/2004 of the Brazilian Ministry of Health, of 212 analyzed water samples, 161 (75.94%) unsuitable for human consumption, as high rates of bacterial contamination were detected. Despite high levels of bacterial contamination in samples, the majority of consumers consider this water of good quality and, therefore only 10% of the consumers used to filter the water and 8% had the habit in boiling it before consumption. Urgent preventive actions should be provided in order to improve the quality of these well-waters, and also to set the adequate treatment of water in contaminated wells.

Key words. gastrointestinal diseases, wells, coliforms, water microbiology.

INTRODUÇÃO

A qualidade bacteriológica é uma das características mais importantes da água de consumo, principalmente por que a mesma está diretamente ligada com doenças de origem hídrica¹. Apesar de indispensável para a vida humana, a água pode atuar como um reservatório de diversos tipos de patógenos como parasitas, fungos, vírus e bactérias. A transmissão de doenças infecciosas pela água acontece não somente em países em desenvolvimento devido à escassez de recursos e métodos para avaliação qualitativa e purificação, mas também em países desenvolvidos onde micro-epidemias são reportadas quase diariamente².

As águas subterrâneas são consideradas como um recurso utilizado por ampla parcela da população brasileira. Em função do baixo custo e facilidade de perfuração a captação de água do aquífero livre, embora mais vulnerável a contaminação, é muito utilizada no Brasil³.

Diversos fatores podem comprometer a qualidade da água subterrânea. Destes, destacam-se o destino final dos esgotos domésticos e industriais em fossas e tanques sépticos, a disposição inadequada de resíduos sólidos urbanos e industriais, postos de combustíveis e de lavagem. Além disso, a modernização da agricultura representa uma das principais fontes de contaminação das águas subterrâneas por bactérias, vírus patogênicos, parasitas, substâncias orgânicas e inorgânicas. Em muito locais o cultivo das lavouras é realizado sem práticas conservacionistas, com uso intensivo de agrotóxicos e fertilizantes, podendo contaminar os mananciais de água das propriedades.

Aliado a esses problemas a maioria dos dejetos são descartados nos mananciais de água. A contaminação da água é aumentada com a destruição das matas ciliares, com o uso do solo fora da sua condição de melhor aptidão e com manejo inadequado do solo, entre outros. Os dejetos bovinos e suínos depositados no solo representam risco de contaminação das fontes de água, uma vez que esses animais são reservatórios de diversos micro-organismos indicadores e patogênicos⁴.

Em decorrência do fato de que os micro-organismos patogênicos usualmente aparecem de forma intermitente e em pequeno número na água, deve-se pesquisar outros grupos de micro-organismos que coexistem com os patogênicos nas fezes. Assim, a presença de coliformes fecais na água constitui um indicador de

poluição fecal, uma vez que são originários do homem e de animais de sangue quente.

A água de consumo humano é um dos importantes veículos de enfermidades diarreicas de natureza infecciosa, o que torna primordial a avaliação de sua qualidade microbiológica. As doenças de veiculação hídrica são causadas principalmente por micro-organismos patogênicos de origem entérica, animal ou humana, transmitidas basicamente pela rota fecal-oral, ou seja, são excretados nas fezes de indivíduos infectados e ingeridos na forma de água ou alimento contaminado por água poluída com fezes⁴.

O presente estudo teve por objetivo avaliar a qualidade bacteriológica de águas subterrâneas em propriedades rurais da região oeste do Estado de Santa Catarina buscando identificar as possíveis causas do elevado número de enfermidades gastrointestinais.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliadas 212 amostras de águas subterrâneas provenientes de diversas propriedades rurais situadas na região Oeste do Estado de Santa Catarina. Destas, 86 foram provenientes de poços com profundidade acima de 80 m e 126 de fontes superficiais (máximo 30 m de profundidade). Para coleta utilizou-se um recipiente estéril, o qual foi identificado e transportado ao laboratório, sob refrigeração, num período máximo de 12 horas.

As análises microbiológicas foram realizadas conforme a metodologia prescrita pela APHA (1998), segundo Instrução Normativa 62 de 26 de agosto de 2003, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento⁵. Foram realizados os seguintes exames: presuntivo para coliformes, confirmativo para coliformes totais, confirmativo para coliformes termotolerantes. A partir da combinação de números correspondentes aos tubos que apresentaram resultado positivo, foi verificado o Número Mais Provável de acordo com a tabela de NMP conforme os procedimentos básicos de contagem. O valor obtido foi expresso em NMP/100 mL. A contagem total de heterotróficos foi avaliada por semeadura de superfície em Agar Padrão para Contagem (PCA) sendo os resultados expressos em UFC/mL.

Além disso, foi aplicado um questionário com os responsáveis por cada poço, no momento da coleta, no intuito de verificar sua opinião em relação à qualidade microbiologia da água que eles utilizam.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram que 161 (75,94%) amostras de água dos 212 poços avaliados foram impróprias para o consumo humano, conforme os padrões bacteriológicos estabelecidos pela portaria 518/2004 do Ministério da Saúde⁶. Além disso, verificou-se que 95,2% (120) das amostras de águas superficiais e 45,3% (39) de poços semi-artesianos e profundos foram impróprias para o consumo.

Das amostras consideradas impróprias, 153 (95,03%) demonstraram a presença de coliformes totais, 114 (70,81%) contaminação por coliformes termotolerantes e 68 (42,24%) apresentaram contaminação com mais de 500 unidades formadoras de colônias de organismos heterotróficos/mL.

As amostras impróprias para o consumo apresentaram uma média de NMP 354,8/100 mL de coliformes totais, 159/100 mL de termotolerantes e 1726 UFC/mL de heterotróficos.

A presença de coliformes verificada nas águas dos poços avaliados torna essas não potáveis, segundo o Ministério da Saúde⁶. Desse modo, o elevado número de amostras com contaminação bacteriológica é preocupante, uma vez que pode gerar enfermidades de veiculação hídrica. Resultados semelhantes foram observados em um estudo realizado na faixa de Gaza, onde a água distribuída para a população estava deteriorada, contribuindo para o surgimento de doenças¹. No Brasil, a água consumida pela população do distrito do Sana, Macaé, RJ, foi avaliada, sendo que os resultados indicaram baixa qualidade microbiológica dessas amostras⁷.

A presença de coliformes totais foi observada em 95% das amostras e coliformes termotolerantes foram isolados de 70,8%. Esses resultados estão de acordo aos encontrados por Silva & Araújo³, que demonstraram contaminação por coliformes totais em 90,8% das amostras e coliformes termotolerantes em 65,8%. Já em relação à presença de mais de 500 unidades formadoras de colônias de organismos heterotróficos/mL nossos resultados foram diferentes desses autores, que encontraram tais organismos em 74,1% das amostras analisadas. Na faixa de Gaza a percentagem de coliformes totais e termotolerantes variou de 6 a 20% e de 2 a 12% respectivamente, conforme o local de captação e época do ano¹. Na Ucrânia foi realizado um estudo avaliando a qualidade microbiológica de aproximadamente 1750 amostras de águas para consumo humano. Os autores encontraram a presença de coliformes totais em 41% das amostras e coliformes fecais em 30%⁸.

Na região do extremo oeste catarinense a contaminação microbiológica das águas é preocupante, pois em 2005 foi registrado um porcentual de 54,7% e em 2006 de 56,7% de amostras impróprias para o consumo humano⁹.

Em relação aos poços avaliados observou-se que aproximadamente 60% apresentavam mata ciliar e/ou reflorestamento em seu entorno, porém em área menor do que a estabelecida pela instrução normativa 13 de 2009¹⁰, que estabelece que a zona de proteção imediata deva abranger um raio de 15 metros em área rural, se possível a partir de sua captação, cujo local deve ser cercado, impedindo a entrada de pessoas alheias, animais ou quaisquer poluentes, o que não foi observado em nenhum dos mananciais analisados.

Em 50% foi observado o cultivo de lavoura e/ou pastagens e menos de 10% apresentavam fossas nas proximidades. Além disso, observou-se que aproximadamente 80% dos poços apresentavam tampa e/ou isolamento da área, entretanto esse isolamento não era adequado, conforme especificações acima mencionadas. Essas proteções inadequadas podem justificar a elevada contaminação bacteriológica encontrada nas amostras.

Torna-se importante destacar que a maioria dos poços avaliados neste estudo estavam localizados em pontos baixos da cidade gerando maior possibilidade de níveis elevados de contaminação. Amaral et al⁴ afirmam que, nas fontes localizadas nos pontos mais baixos do terreno (38,1% dos poços e 77,7% das nascentes) podem-se verificar diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o número de micro-organismos obtidos nos períodos de chuva e estiagem. Essa constatação está relacionada ao escoamento de águas superficiais, que entram em contato com ambientes contaminados, em direção às fontes situadas nos pontos mais baixos do terreno.

Amr e Yassim¹¹ avaliaram a água de poços e a água das redes de comunicações da faixa de Gaza no período 2000 a 2006. Os autores observaram que as águas provenientes de ambas as fontes estavam fora dos padrões exigidos pela Organização Mundial da Saúde. Contudo, os níveis de contaminação foram maiores nas águas das redes de comunicação, sendo que os autores observaram uma forte correlação entre doenças diarreicas e a contaminação por coliformes.

De acordo com as entrevistas realizadas na presente pesquisa, observou-se que a maioria dos consumidores (80,75%) de águas subterrâneas as julgam de boa qualidade, considerando desnecessários os procedimentos de filtragem ou fervura para eliminação de micro-organismos (Tabela

1). Além disso, aproximadamente 30% dos entrevistados afirmaram ter conhecimentos sobre os coliformes. Torna-se importante destacar que das amostras analisadas, 75,94% estavam impróprias para consumo (Ministério da Saúde, 2004)⁶. Estes dados são semelhantes aos de Amaral et al⁴, os quais observaram que 100% das pessoas que foram entrevistadas consideravam a água de boa qualidade, o que justificava a ausência de tratamento da água e o pequeno número de pessoas que utilizavam filtros em suas residências.

Tabela 1. Resultados obtidos pelo levantamento de dados.

Opinião dos consumidores: qualidade da água	Utilização de filtro	Fervem a água antes de consumir	Ocorrência de vômito ou diarreia
Boa – 80,75%	Não - 90%	Não - 92%	Não - 86%
Ruim – 9,25%	Sim - 10%	Sim - 08%	Sim - 14%

Além disso, podemos observar neste estudo que a qualidade da água que a população consome está ameaçada, pois se observaram contagens elevadas de micro-organismos do grupo coliformes. Essa contaminação pode ser associada a diversos fatores, como a condição e localização dos poços, sendo que as atividades que ocorrem nas áreas próximas também podem afetar a potabilidade da água, como por exemplo, áreas que são utilizadas para a criação de animais e plantio agrícola, entre outros fatores que influenciam na contaminação dos mananciais de água. Em sua pesquisa, Amaral et al⁴ chamam a atenção para o fato de que ao utilizarem esta água contaminada a população corre o risco de sofrer enfermidades veiculadas pela mesma.

CONCLUSÃO

Altos níveis de contaminação bacteriológica foram encontrados nas águas dos poços avaliados. Esse fato pode ser decorrente de infiltrações, escoamento superficial, localização em pontos baixos da cidade, presença de lavouras e de criadouros animais próximo às fontes de água e proteção inadequada dos poços.

Foi possível observar que a maioria da população não ferve a água e também não utilizam filtros, e a

preocupação se agrava pelo fato de que a maioria considera a água consumida de boa qualidade, despreocupando-se com os riscos que esta possa oferecer.

Como esses poços exercem papel vital no fornecimento de água para a população, necessita-se que um trabalho intensivo seja realizado para que se efetue a vigilância da qualidade da água utilizada e que se programem ações que visem esclarecer a população sobre a possibilidade de transmissão de patógenos pela água.

REFERÊNCIAS

1. Yassin MM, Amr SSA, Al-Najar HM. Assessment of microbiological water quality and its relation to human health in Gaza Governorate, Gaza Strip. *Public Health*. 2006; 120(12): 1177–87.
2. Canepari P, Pruzzo C. Human pathogens in water: insights into their biology and detection. *Curr Opin Biotechnol*. 2008; 19(3): 241–3.
3. Silva RCA, Araújo TM. Qualidade da água do manancial subterrâneo em áreas urbanas de Feira de Santana (BA). *Ciênc Saúde Coletiva*. 2003; 8(4): 1019-28.
4. Amaral, LA, Filho, NA, Junior ODR, Ferreira FLA, Barros LSS. Água de consumo humano como fator de risco à saúde em propriedades rurais. *Rev Saúde Pública*. 2003; 37(4): 10-514.
5. Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e abastecimento. Secretaria de defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº. 62 de 26 de agosto de 2003. Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, p. 14, 18 de set.2003. Seção 1.
6. Brasil Ministério da Saúde. Portaria nº 518 de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativas ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade e dão outras providências. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, p. 266-9, 26 de mar. 2004, Seção 1.
7. Ramos GDM, Machado Junior HF, Silva VL, Castelan FG, Guerra, AF, Fernandes MM, et al. Qualidade microbiológica da água consumida pela população do Distrito do Sana, Macaé, Rio de Janeiro. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2008; 67(2): 100-5.
8. Reid DC, Edwards AC, Cooper D, Wilson E, McGaw BA. The quality of drinking water from private water supplies in Aberdeenshire, UK. *Water Res*. 2003; 37(10): 245–54.
9. Rodhen F, Rossi EM, Scapin D, Cunha FB, Sardiglia, CU. Monitoramento microbiológico de águas subterrâneas em cidades do extremo do oeste de Santa Catarina. *Cienc. Saúde Coletiva* Disponível em: http://www.abrasco.org.br/cienciaesaudecoletiva/artigos/lista_artigos.php. Acesso em: 02 out. 2009.
10. Fundação do meio ambiente [FATMA]. Instrução Normativa n.13, de 2009. Captação de água subterrânea, Florianópolis, 2009.
11. Amr SSA, Yassin MM. Microbial contamination of the drinking water distribution system and its impact on human health in Khan Yunis Governorate, Gaza Strip: Seven years of monitoring (2000 e 2006). *Public Health*. 2008; 122(11): 1275-83.

Infecção por *Giardia lamblia* em crianças de 0 a 10 anos no município de Chapadinha, Maranhão, Brasil

Giardia lamblia infection in children under 10 years old in the municipality of Chapadinha, Maranhão state, Brazil

RIALA6/1223

Francinaldo Soares SILVA

Endereço para correspondência: Departamento de Biologia, Centro de Ciências Agrárias e Ambientais/CCAA, Universidade Federal do Maranhão/UFMA, Campus IV, MA 230, Km 4, s/n CEP: 65500-000, Bairro Boa Vista, Chapadinha, Maranhão, Brasil. e-mail: sandflybr@yahoo.com.br

Recebido: 20.04.2009 – Aceito para publicação: 31.08.2009

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo determinar a frequência da infecção por *Giardia lamblia* dentro da faixa etária de 0 a 10 anos no município de Chapadinha, Maranhão. Os dados coprocópicos apresentados são provenientes do Laboratório Central de Chapadinha, realizados entre janeiro de 2007 e fevereiro de 2008, obtidos a partir da técnica de Hoffmann, Pons e Janer (Sedimentação Espontânea). Foram analisadas 623 amostras, sendo 102 positivas para *G. lamblia* (16,4%), 376 negativas (60,3%) e 145 (23,2%) positivas para outros enteroparasitas. Os menores valores de infecção por *G. lamblia* foram observadas nos indivíduos menores de 1 ano (6,8%) e os maiores em crianças de 2 a 6 anos, onde 71,5% dos casos positivos ocorreram neste intervalo etário. A frequência das infecções por outros enteroparasitas aumentaram continuamente, principalmente após os 4 anos. O padrão de infecção em Chapadinha é semelhante ao encontrado em outras localidades, onde as taxas de infecção aumentam com a idade e alcança um pico e, em seguida, decrescem, diferindo dos valores progressivos de infecção para os outros enteroparasitas.

Palavras-chave. *Giardia lamblia*, criança, enteroparasitas, Chapadinha, Maranhão.

ABSTRACT

This work aims at assessing the occurrence of *Giardia lamblia* infection among children under 10 years old in the municipality of Chapadinha, Maranhão state, Brazil. The coproscopic data were analyzed between January 2007 and February 2008 according to the method of Hoffmann, Pons and Janer (Spontaneous Sedimentation) in the Central Laboratory of Chapadinha. A total of 623 stool samples were analyzed, being 102 positive for *G. lamblia* (16.4%), 376 negative (60.3%) and 145 (23.2%) positive for other enteroparasites. The lowest infections by *G. lamblia* were observed in children under one year old (6.8%) and the highest in the interval between 2 and 6 years, where 71.5% of the positive cases occurred in this age interval. The frequency of other enteroparasites increased progressively, mainly in children with more than 4 years. The *Giardia* infection pattern observed in Chapadinha is similar to the other localities, where the infection reaches a level and then decreases afterwards, unlike the other enteroparasitic infections.

Key words. *Giardia lamblia*, children, enteroparasites, Chapadinha, Maranhão.

INTRODUÇÃO

Giardia lamblia (Diplomonadida, Hexamitidae) é um protozoário flagelado encontrado parasitando o trato intestinal de aves, répteis e mamíferos, incluindo humanos. No homem, produz um amplo espectro de sintomas, variando desde infecção assintomática, com absorção normal e ausência de alterações na mucosa do intestino, até casos sintomáticos, caracterizados por infecções severas acompanhadas de diarreias crônicas e má absorção intestinal. Os casos assintomáticos desempenham grande importância epidemiológica, pois são considerados fontes de infecção da doença através da eliminação das formas císticas infectantes do parasita¹.

A infecção por *G. lamblia* constitui a enfermidade entérica de veiculação hídrica mais comum nos países desenvolvidos e em desenvolvimento². É uma das infecções parasitárias mais comuns em indivíduos de faixas etárias inferiores a 10 anos³ e pode resultar em danos futuros aos indivíduos infectados, com taxas alteradas de crescimento e de desenvolvimento infantil^{2,3}. No Brasil, a frequência da giardíase em crianças entre 7 e 14 anos é de 28,5%, mas com variação deste valor ao longo do território nacional.

Pouco são os estudos acerca das parasitoses intestinais realizados no estado do Maranhão. No município de Chapadinha, segundo um estudo sobre a frequência das parasitoses intestinais⁴, a maior ocorrência de *G. lamblia* ocorreu em crianças de 0 a 10 anos, sendo também o enteroparasita mais frequente nesta faixa etária. Com o intuito de contribuir ainda mais com os estudos sobre as enteroparasitoses de Chapadinha, o presente trabalho tem como objetivo determinar a frequência da infecção por *G. lamblia* dentro do grupo etário de zero a 10 anos e a relação com outros enteroparasitas encontrados no município.

MATERIAL E MÉTODOS

O município de Chapadinha está localizado na região dos cerrados nordestinos maranhenses, a 3°44'17" Sul e 43°20'29" Oeste, no lado oriental do estado, distante cerca de 230 km da capital São Luís. O município possui uma população de 67.649 habitantes e ocupa uma extensão territorial de 3.447 Km².

O município de Chapadinha tem abastecimento de água tratada, sendo que o abastecimento é proveniente em sua maior parte da barragem do Itamaçoca e tratada

na ETA (estação de tratamento de água). Em Chapadinha é comum a construção de poços artesianos pela população, sendo muitas vezes edificados sem nenhuma infraestrutura básica, comprometidos pela contaminação do solo e dos lençóis freáticos pelas fossas sanitárias residenciais. O município não possui rede de captação de esgoto e tais fossas geralmente são arquitetadas próximas das residências sem respeitar as especificações técnicas, como distância mínima de 30 metros da residência. Em muitos bairros periféricos, os esgotos correm a céu aberto e muitas residências não possuem banheiro no interior das mesmas.

Os dados aqui mostrados são resultados dos exames parasitológicos de fezes realizados no Laboratório Central do município de Chapadinha. Este laboratório é uma ramificação do Instituto Oswaldo Cruz, localizado na capital São Luís, para o qual são enviados os dados coprológicos de todos os municípios do estado. As coletas dos dados são referentes ao período entre janeiro de 2007 e fevereiro de 2008. A população estudada é representada por indivíduos provenientes do município de Chapadinha e de localidades adjacentes.

Nas análises parasitológicas foi utilizada a técnica de Hoffmann, Pons e Janer (Sedimentação Espontânea) ou HPJ para determinar a frequência de cistos de *G. lamblia*, sendo analisada uma amostra de cada indivíduo. Os casos de infecção por *Giardia* apresentados aqui incluem os indivíduos mono, bi e poliparasitados, e tais relações podem ser melhor examinadas em Silva et al.⁴ Os demais enteroparasitas encontrados em Chapadinha foram: *Entamoeba coli*, *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*, *Ascaris lumbricoides*, Ancilostomídeos, *Endolimax nana*, *Enterobius vermicularis*, *Iodamoeba butschlii*, *Strongyloides stercoralis* e *Hymenolepis nana*⁴. *G. lamblia* foi o terceiro parasita intestinal mais prevalente.

Os dados referentes à idade dos indivíduos, assim como os resultados das análises coposcópicas, estão postos em livros de registros do referido laboratório, dos quais foram extraídas as informações contidas no presente trabalho. Nas análises estatísticas foram calculados intervalos de confiança de 95% para as proporções avaliadas, utilizando-se o programa EpiInfo 6.0, CDC, Atlanta.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 623 amostras referente ao grupo etário de zero a 10 anos foi analisado durante o período de estudo, sendo

102 positivas (16,4%) e 376 negativas (60,3%) para *G. lamblia* (Tabela). A ocorrência de *G. lamblia* apresentada aqui é semelhante a outros estudos abordando giardiase em crianças menores de 10 anos^{5, 6, 7}. A frequência de casos positivos no município de Chapadinha pode estar subestimada, pois a eliminação das formas infectantes do parasita por indivíduos infectados ocorre de maneira irregular¹, sendo necessário, pelo menos, três exames alternados para cada paciente no intuito de se obter uma avaliação acurada do nível de infecção por *G. lamblia*. Guimarães et al.⁸ encontraram uma taxa de infecção de 63,3% em creches de Botucatu, São Paulo, utilizando as técnicas da centrifugo-flutuação com sulfato de zinco e HPJ em três amostras analisadas de cada criança. Estes autores relataram ainda que na segunda e na terceira amostras os resultados foram, respectivamente, de 25,5% e 8,5%, demonstrando haver variação de taxa de infecção dependente da ocasião de coleta do material fecal. A taxa de infecção pode ser subestimada também pelo fato de que a maioria das infecções em crianças é assintomática,

constituindo-se de infecções crípticas e de importância epidemiológica significativa.

A sensibilidade da técnica empregada no diagnóstico dos enteroparasitas pode também afetar as taxas de infecção. Para a detecção de cistos de *Giardia*, costuma-se empregar o HPJ e o método de Faust. Comparativamente, o HPJ é menos sensível do que o método de Faust na pesquisa de cistos de protozoários, embora Chaves et al.⁹ e Souza et al.¹⁰ não encontraram diferenças entre estas duas técnicas na detecção de cistos de *G. lamblia*.

As análises das amostras positivas revelaram que a menor frequência da infecção por *G. lamblia* ocorreu nos indivíduos menores de 1 ano, fato este já observado em outros inquéritos epidemiológicos^{8, 11, 12}. Estes resultados podem estar relacionados ao fato de que estas crianças estariam “protegidas” da infecção por encontrarem-se ainda em período de amamentação, como demonstrado por Costa-Macedo & Rey¹³. Estes autores não observaram infecção em crianças alimentadas exclusivamente com leite materno, diferindo significativamente dos resultados

Tabela 1. Ocorrência da infecção por *G. lamblia* em crianças de 0 a 10 anos no município de Chapadinha, entre janeiro de 2007 e fevereiro de 2008.

Idade	Infecção por <i>Giardia</i> *	Demais infecções**	Amostras negativas	Indivíduos examinados	Demais infecções*** (%)	Infecção por <i>Giardia</i> (%)	Intervalo de Confiança (IC 95%)
<1	1	3	12	16	18,75	6,25	(0,15 - 30,23)
1	6	3	54	63	4,76	9,52	(3,57 - 19,58)
2	14	9	32	55	16,36	25,45	(14,67 - 39,00)
3	12	11	41	64	17,18	18,75	(10,08 - 30,46)
4	22	11	42	75	14,66	29,33	(19,38 - 40,97)
5	10	14	30	54	25,92	18,51	(9,25 - 31,42)
6	15	20	21	56	35,71	26,78	(15,83 - 40,30)
7	7	19	38	64	29,68	10,93	(4,51 - 21,24)
8	4	27	37	68	39,70	5,88	(1,62 - 14,38)
9	8	17	39	64	26,56	12,5	(5,55 - 23,15)
10	3	11	30	44	25,00	6,81	(1,42 - 18,65)
Total	102	145	376	623	23,3	16,4	(13,55 - 19,51)

* incluindo os casos mono, bi e poliparasitados.

***Entamoeba coli*, *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*, *Ascaris lumbricoides*, *Ancilostomídeos*, *Endolimax nana*, *Enterobius vermicularis*, *Iodamoeba butschlii*, *Strongyloides stercoralis* e *Hymenolepis nana* 4.

***Total para demais infecções - 23,3% (20 - 26,79).

com crianças da mesma faixa etária amamentadas parcialmente ou sem a alimentação láctea, onde os índices de parasitismo por *G. lamblia* estavam presentes. A ação do leite materno sobre protozoários intestinais já foi relatada¹⁴, supondo que os cuidados parentais e a amamentação constituem fatores protetores de infecção parasitária durante os primeiros meses de vida.

Os maiores valores de infecção por *G. lamblia* em crianças do município de Chapadinha ocorreram entre 2 e 6 anos, onde 71,5% dos casos positivos ocorreram neste intervalo (Tabela 1). Padrão semelhante das taxas de infecção foi observado por vários autores, em que o parasitismo aumenta de acordo com a idade e alcança um pico, geralmente entre 1 e 6 anos, e depois sofre um declínio^{5, 8, 9, 15, 12}. Em contrapartida, a ocorrência de outros parasitas intestinais apresentaram um padrão tendenciosamente ascendente de acordo com a idade, com taxas de infecção menores em crianças de 1 a 4 anos, fato semelhante ao observado por Morales-Espinoza et al.¹⁵ com a infecção por *Entamoeba histolytica*, um dos protozoários mais frequentes em crianças no município de Chapadinha⁴ e, seguramente, também responsável pelos valores crescentes das infecções por outros enteroparasitas observados no presente trabalho.

A diminuição da ocorrência da infecção por *G. lamblia* observada em crianças acima dos 6 anos podem estar relacionadas com o amadurecimento do sistema imunológico da criança e com as mudanças comportamentais geralmente experimentadas pelos indivíduos nesta faixa etária. A resposta imunológica deve ter um papel importante no controle da infecção por *G. lamblia*¹⁶ e, segundo Janoff et al.⁶, há um aumento do nível de anticorpos IgM anti-*G. lamblia* a partir dos dois anos de vida em indivíduos infectados, sendo questionada a possibilidade desta imunoglobulina exercer algum efeito protetor contra a infecção por *G. lamblia*¹⁷, reduzindo as chances do aparecimento dos sintomas característicos da giardíase. Os maiores valores desta imunoglobulina foram encontrados em crianças entre 1 e 4 anos, coincidindo com as elevadas taxas de infecção por *G. lamblia* nesta faixa etária⁶.

Como se sabe, as infecções por *G. lamblia* são mais frequentes em crianças e os sintomas da doença só ocorrem em situações fisiológicas particulares^{1, 9}. Isto significa que a criança, do ponto de vista comportamental, é mais susceptível à infecção. Assim, as mudanças de comportamento da população infantil durante o crescimento podem explicar a redução da ocorrência da infecção no grupo etário acima dos 6 anos.

Conclui-se que a infecção por *G. lamblia* em crianças menores de 10 anos no município de Chapadinha segue um padrão similar ao encontrado em outras localidades, onde as taxas de infecção aumentam de acordo com a idade e alcança um pico e, em seguida, decrescem, diferindo dos valores progressivos de infecção para os outros enteroparasitas.

AGRADECIMENTOS

À Secretaria de Saúde do Município de Chapadinha e ao Laboratório Central, em nome de Alfeu Almeida Mesquita, Ana Célia Sousa e Antonia Sousa Macatrão, pela colaboração e concessão dos dados aqui apresentados.

REFERÊNCIAS

1. Ortega, YR, Adam, RD. *Giardia*: overview and update. *Clin Infect Dis*. 1997; 25: 545-50.
2. Farthing, MJG, Mata, L, Urrutia, J, Kronmal, RA. Natural history of *Giardia* infection of infants and children in Guatemala and its impact on physical growth. *Am J Clin Nutr*. 1986; 43: 395-405.
3. Sadjjadi, SM, Tanideh, N. Nutritional status of preschool children infected with *G. intestinalis*. *Iranian J Publ Health*. 2005; 34 (4): 51-7.
4. Silva, FS, Paulo, ADC, Braga, CMM, Almeida, RJ, Galvão, VP. Frequência de parasitas intestinais no município de Chapadinha, Maranhão, Brasil. *Rev Patol Trop*. No prelo 2009.
5. Monteiro, CA, Chieffi, PP, Benicio, MHA, Dias, RMS, Torres, DMAGV, Mangini, ACS. Estudo das condições de saúde das crianças do município de São Paulo (Brasil), 1984/1985. VII - Parasitoses intestinais. *Rev Saúde Públ*. 1988; 22 (1): 8-15.
6. Janoff, EN, Taylor, DN, Echeverria, P, Glode, MP, Blaser, MJ. Serum antibodies to *Giardia lamblia* by age in populations in Colorado and Thailand. *West J Med*. 1990; 152 (3): 253-6.
7. Giraldo-Gómez, JM, Lora, F, Henao, LH, Mejía, C, Gómez-Marin, JE. Prevalencia de giardiasis y parasitos intestinales em prescolares de hogares atendidos em um programa estatal in Armenia, Colombia. *Rev Salud Pública*. 2005; 7(3): 327-38.
8. Guimarães, S, Sogayar, MI. Occurrence of *Giardia lamblia* in children of municipal day-care centers from Botucatu, São Paulo state, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1995; 37 (6): 501-6.
9. Chaves, A, Acantara, OS, Carvalho, OS, Santos, JS. Estudo comparativo dos métodos coprológicos de Lutz, Kato-Katz e Faust modificado. *Rev Saúde Públ*. 1979; 13: 348-52.
10. Souza, DSM, Barreiros, JT, Papp, KM, Steindel, M, Simões, CMO, Barardi, CRM. Comparison between immunomagnetic separation, coupled with immunofluorescence, and the techniques of Faust et al. and of Lutz for the diagnosis of *Giardia lamblia* cysts in human feces. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2003; 45(6): 339-42.

11. Muniz-Junqueira, Mi, Queiróz, EFO. Relationship between protein-energy malnutrition, vitamin A, and parasitoses in children living in Brasília. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2002; 35 (2): 133-41.
12. Penrose, AS, Wells, EV, Aiello, AE. Infectious causation of chronic disease: examining the relationship between *Giardia lamblia* infection and irritable bowel syndrome. *World J gastroenterol*. 2007; 13 (34): 4574-8.
13. Costa-Macedo, LM, Rey, L. aleitamento e parasitismo intestinal materno-infantil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2000; 33 (4): 371-5.
14. Gillin, FD, Reiner, DS, Gault, M. Cholat-dependent killing of *Giardia lamblia* by human milk. *Infect Immun*. 1985; 47 (3): 619-22.
15. Morales-Espinoza, EM, Sánchez-Pérez, HJ, García-Gil, MM, Vargas-Morales, G, Méndez-Sanchés, JD, Pérez-Ramírez, M. Intestinal parasite in children, in highly deprived area in the border region of Chiapas, Mexico. *Salud pública del México*. 2003; 45 (5): 379-88.
16. Faubert, G. Immune response to *Giardia duodenalis*. *Clin Microb Rev*. 2000; 13 (1): 35-54.
17. Degushi, M, Gilling, FD, Gigli, I. Mechanism of killing of *Giardia lamblia* trophozoites by complement. *J Clin Invest*. 1987; 79: 1296-1302.

Falha na implantação de um novo algoritmo de testes laboratoriais para o diagnóstico de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 em população de risco

Lack in introducing a new algorithm of laboratorial tests for detecting HTLV-1 and HTLV-2 infections in at-risk population

RIALA6/1224

Emanuela Avelar Silva COSTA^{1,2}, Fabrício JACOB^{1,2}, Regiane dos Santos FELICIANO², Elizabeth de los SANTOS-FORTUNA^{1,2}, Adele CATERINO-DE-ARAÚJO^{1,2*}

*Endereço para correspondência: Seção de Imunologia, Divisão de Biologia Médica, Instituto Adolfo Lutz Av. Dr. Arnaldo, 355, 11º andar, CEP 01246-902, São Paulo, SP, Brasil. e-mail: caterino@ial.sp.gov.br

¹Coordenadoria de Controle de Doenças, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências, São Paulo, SP, Brasil.

²Seção de Imunologia, Divisão de Biologia Médica, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil.

Recebido: 02.06.2009 Aceito para publicação: 26.08.2009

RESUMO

Em vista dos problemas detectados no diagnóstico de infecção pelos vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos 1 e -2 (HTLV-1 e HTLV-2) em casuística encaminhada ao Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, foi proposto um novo algoritmo de testes laboratoriais que utiliza duas amostras de sangue seqüenciais. Na primeira o sangue é coletado em tubo seco e feita triagem sorológica com dois ensaios imunoenzimáticos (EIAs). Na segunda, o sangue é coletado em tubo contendo o anticoagulante ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) para a repetição dos EIAs e para os testes confirmatórios de Western blot (WB) e reação em cadeia da polimerase (PCR). Os resultados obtidos com 313 amostras de sangue mostraram ineficiência do algoritmo, pois nos casos EIA reagentes, apenas 25% tiveram uma segunda amostra de sangue coletada e destas, apenas três em EDTA. Portanto, não foi possível comparar o desempenho da PCR em relação ao WB. Um algoritmo simples, de coleta única de sangue em tubo contendo EDTA foi proposto e vem sendo utilizado para a triagem e para os testes confirmatórios.

Palavras-chave. vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1); vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 2 (HTLV-2); diagnóstico; sorologia; ensaio imunoenzimático (EIA); Western blot (WB); reação em cadeia da polimerase (PCR); algoritmo de testes laboratoriais.

ABSTRACT

Taking into account the problems on the human T-cell lymphotropic virus type 1 and 2 (HTLV-1 and HTLV-2) laboratory diagnosis in samples analyzed at Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, it was proposed a new algorithm employing two blood samples serially collected. The first serum sample was for serological screening using two enzyme immunoassays (EIAs), and the second blood sample collected on EDTA was for retesting EIAs and to confirm HTLV-1/2 infection by Western blot (WB) and polymerase chain reaction (PCR). The results obtained on 313 blood samples showed inefficiency of this algorithm as only 25% of EIAs positive samples had a second blood sample collected, and of which the blood were correctly collected on EDTA from three patients only. No feasible data were achieved to compare the actual performance of PCR in relation to WB. Thus, we started to use a simple algorithm (one step) for diagnosing HTLV-1/2 on a single blood sample collected on EDTA for screening and confirmatory assays.

Key words. human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1); human T-cell lymphotropic virus type 2 (HTLV-2); diagnosis; serology; enzyme immunoassay (EIA); Western blot (WB); polymerase chain reaction (PCR); algorithm tests.

INTRODUÇÃO

O diagnóstico de infecção pelos vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos 1 (HTLV-1) e -2 (HTLV-2) se baseia na pesquisa de anticorpos específicos no soro ou de segmentos de DNA proviral em células do sangue periférico. O algoritmo de testes laboratoriais recomendado pelo Ministério da Saúde do Brasil para HTLV-1 e HTLV-2 difere quando se trata de Laboratórios de Diagnóstico e Unidades de Hemoterapia. No primeiro caso, o Ministério da Saúde recomenda a pesquisa de anticorpos no soro usando um ensaio imunoenzimático (EIA) e em amostras reagentes, a repetição em duplicata do EIA antes de submeter o soro ao teste confirmatório de imunofluorescência indireta (IFI) ou Western blot (WB). Para os Hemocentros, o Ministério da Saúde não obriga a realização de teste confirmatório e os doadores de sangue cujos soros resultaram reagentes no EIA são encaminhados a Ambulatórios de Especialidades, para avaliação clínica e confirmação diagnóstica¹.

Desde novembro de 1998, o Instituto Adolfo Lutz de São Paulo – órgão da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (IAL/CCD/SES-SP) vem realizando a sorologia para HTLV-1/2 em população de risco e tem observado problemas no diagnóstico, principalmente de infecção por HTLV-2²⁻⁶. O algoritmo adotado pelo Instituto Adolfo Lutz difere do recomendado pelo Ministério da Saúde, pois usa dois testes EIA de composição antigênica e formatos diferentes na triagem sorológica. Isto porque nenhum EIA disponível no comércio (1ª, 2ª ou 3ª geração) é capaz de detectar todos os casos verdadeiramente soropositivos para a infecção por HTLVs². Apesar da melhora na composição dos kits EIA que tem aumentado sua sensibilidade e especificidade, um grande número de soros com padrão indeterminado no teste confirmatório de WB continua sendo observado⁷⁻¹⁰. No Instituto Adolfo Lutz, cerca de 30% dos soros de população de risco apresenta perfil indeterminado à análise pelo WB³.

Recentemente, foi proposto um novo algoritmo de testes laboratoriais para ser usado pelo Instituto Adolfo Lutz (Figura 1)¹¹. Este algoritmo tomou como base o algoritmo proposto pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico de infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), onde são solicitadas duas amostras seqüenciais de sangue¹². Para o HTLV-1/2, a primeira amostra de sangue deve ser colhida em tubo seco e o soro testado quanto à presença de anticorpos específicos por

dois EIAs. Em soros reagentes em pelo menos um EIA, uma segunda amostra de sangue deve ser solicitada e o sangue coletado em tubo contendo o anticoagulante ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA). Nesta amostra de sangue, o plasma é usado para repetir a triagem sorológica (dois EIAs) e nos casos reagentes, os soros submetidos ao ensaio de WB. A fração de células do sangue periférico (PBL) é utilizada para a pesquisa de segmentos de DNA de HTLV-1/2 (região *tax* do genoma proviral) pela reação em cadeia da polimerase (PCR)¹³⁻¹⁵. Os produtos da PCR são analisados quanto a fragmentos de restrição enzimática (PCR-RFLP) usando a enzima *Taq* I que apresenta sítio em fragmento *tax* de HTLV-2 e, portanto, discrimina HTLV-1 de HTLV-2. Esta estratégia de coleta seqüencial de sangue evita resultados falsos (positivo e negativo) por falha humana de identificação e / ou manuseio das amostras de sangue e, possibilita comparar o desempenho do WB em relação à PCR em população de risco.

Um estudo preliminar usando este algoritmo foi realizado com 313 amostras de soro recentemente encaminhadas ao Instituto Adolfo Lutz para análise. As amostras eram provenientes de Centros de Referência e Treinamento em AIDS (14,4%) e de Ambulatórios de Especialidades do SUS (85,6%). Das 313 amostras de soro analisadas, 36 resultaram pelo menos um EIA reagente (11,5%) sendo requisitada nova coleta de sangue à respectiva unidade de origem dos pacientes. Uma segunda amostra de sangue foi coletada somente de 9 (25%) pacientes, sendo que em apenas três (33%) pacientes o sangue foi coletado corretamente. Isto mostrou ineficiência do algoritmo proposto, não havendo entrosamento entre Laboratório, Unidade solicitante, médico e paciente. No entanto, os pacientes tiveram seus soros analisados pelo teste confirmatório de WB e 35% deles resultaram WB indeterminados, mostrando a necessidade de se implantar a PCR para a confirmação de infecção por HTLV-1/2. Infelizmente, o pequeno número de amostras de PBL (três) não permitiu comparar os resultados do WB com os da PCR. Porém este estudo mostrou que o algoritmo proposto, embora útil em pesquisa, é totalmente inadequado para ser usado na rotina diagnóstica e ele foi substituído por um algoritmo mais simples, de etapa única, onde o sangue é coletado em tubo contendo EDTA e usado para a triagem sorológica e para os testes confirmatórios (2ª etapa da Figura 1). Estudos futuros poderão mostrar a eficácia deste novo algoritmo para o diagnóstico de infecção por HTLV-1/2 em população de risco de São Paulo e mensurar custo/

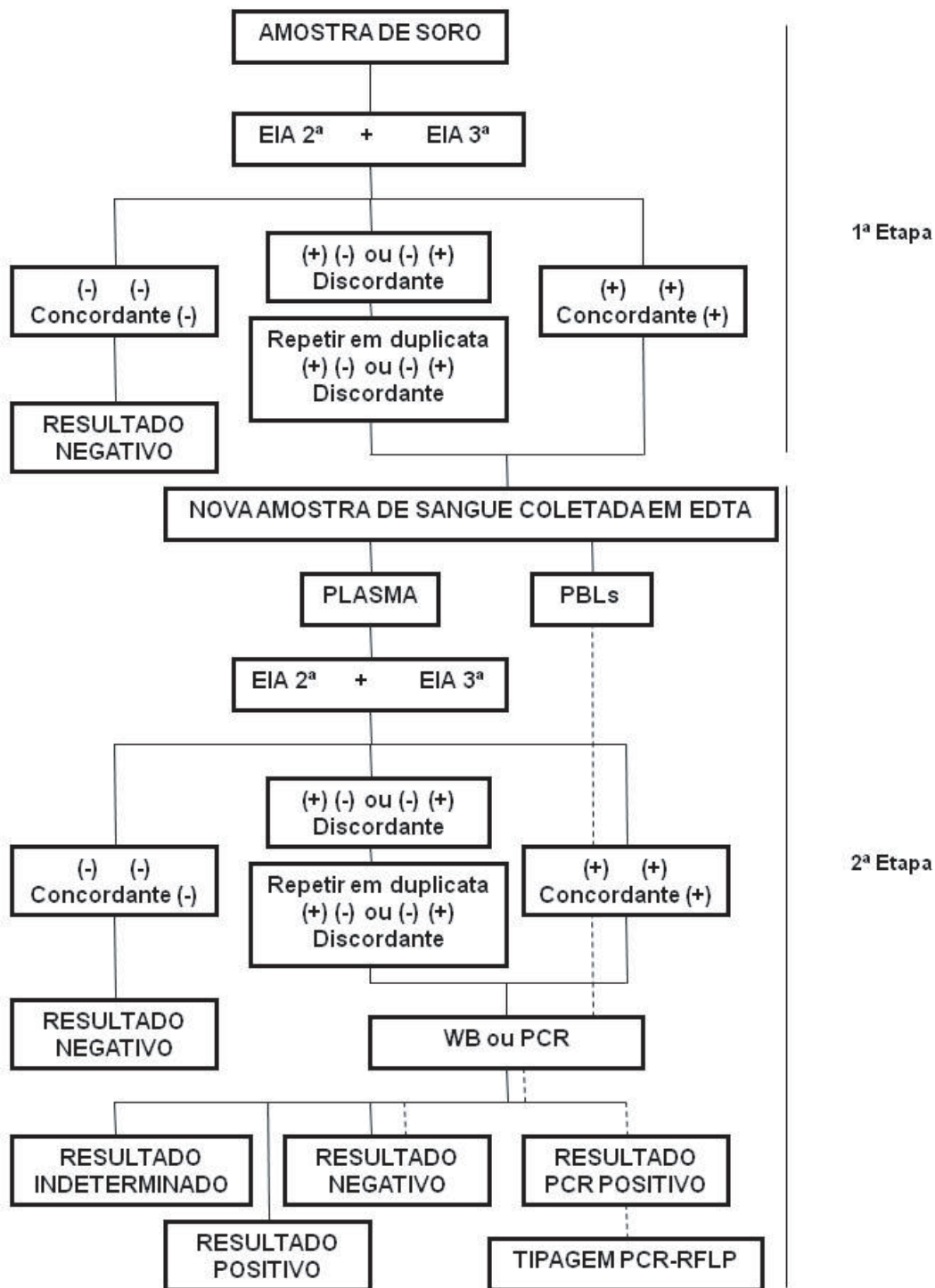


Figura 1. Algoritmo de testes laboratoriais para o diagnóstico de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 utilizado pelo Instituto Adolfo Lutz de São Paulo.

Legenda: +: soro reagente; -: soro não reagente; EIA: ensaio imunoenzimático; EIA 2ª: EIA de segunda geração; EIA 3ª: EIA de terceira geração; PBL: células do sangue periférico; WB: Western blot; PCR: reação em cadeia da polimerase; PCR-RFLP: análise de produto de PCR por polimorfismo de restrição enzimática.

benefício dos testes confirmatórios de PCR e WB. Há que se ressaltar o alto custo do kit disponível no mercado de WB (WB 2.4, Genelabs Diagnostic, Singapore), cujo custo aproximado é de US\$ 240,00 por tira, e o alto número de soros com padrão indeterminado para a infecção por HTLV-1/2 ao se utilizar este kit.

O conhecimento do real status de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 é importante para direcionar a conduta clínica e terapêutica do paciente¹⁶. O HTLV-1 está relacionado com doenças graves como a paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1 e a leucemia de células T do adulto, enquanto o HTLV-2 é reconhecidamente menos patogênico¹⁷. Portanto, o diagnóstico diferencial é de suma importância. Além disto, em países onde o HTLV-1 e o HTLV-2 são endêmicos e onde os isolados virais podem divergir dos isolados empregados na composição dos kits utilizados na detecção de anticorpos específicos⁷, há necessidade de se verificar qual o melhor teste confirmatório para ser usado no diagnóstico. Estudos de novas metodologias e algoritmos de diagnóstico são importantes para a saúde pública e são desafios que se impõem à Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz.

Suporte: Bolsas de Mestrado CAPES para EASC e FJ; Bolsa PAPS/SP para RSF; Bolsa de Produtividade em Pesquisa MCT/CNPq para ACA # 304372/2006-4; Auxílio Financeiro CCD-SES/SP, MCT/CNPq Universal # 481040/2007-2 e IAL # 33/07.

Trabalho parcialmente apresentado na 14th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and related retroviruses. Salvador, Ba, July 1 – 4, 2009.

REFERÊNCIAS

1. Ministério da Saúde. HTLV-I/II - Triagem e diagnóstico sorológico em Unidades hemoterápicas e laboratórios de saúde pública. Brasília: Ministério da Saúde, Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids. 1998. II (Série TELELAB); 54p.
2. Jacob F, Santos-Fortuna E, Azevedo RS, Caterino-de-Araujo A. Performances of HTLV serological tests in diagnosing HTLV infection in high-risk population of Sao Paulo, Brazil. *Rev Inst Med trop Sao Paulo*. 2007; 49: 361-4.
3. Jacob F, Santos-Fortuna E, Azevedo RS, Caterino-de-Araujo A. Serological patterns and temporal trends of HTLV-1/2 infection in high-risk populations attending Public Health Units in São Paulo, Brazil. *J Clin Virol*. 2008; 42: 149-55.
4. Jacob F, Santos-Fortuna E, Caterino-de-Araujo A. Algoritmo de testes sorológicos de triagem para infecção por HTLV-1/2 usado no Instituto Adolfo Lutz de São Paulo. BEPA - Boletim Epidemiológico Paulista. 2008; 5: 12-8.
5. Jacob F, Magri MC, Costa EAS, Santos-Fortuna E, Caterino-de-Araujo A. Comparison of signal-to-cutoff values in first, second, and third generation enzyme immunoassays for the diagnosis of HTLV-1/2 infection in "at-risk" individuals from São Paulo, Brazil. *J Virol Methods*. 2009; 159: 288-90.
6. Caterino-de-Araujo A. Best screening assays for the diagnosis of human T-cell lymphotropic virus types 1 and 2 in South America. *J Virol Methods*. 2009;156: 150-1.
7. Mahieux R, Horal P, Mauclère P, Mercereau-Puijalon O, Guillotte M, Meertens L, Murphy E, Gessain A. Human T-cell lymphotropic virus type 1 gag indeterminate Western blot patterns in Central Africa: relationship to *Plasmodium falciparum* infection. *J Clin Microbiol*. 2000; 38: 4049-57.
8. Berini CA, Eirin ME, Pando MA, Biglione MM. Human T-cell lymphotropic virus types I and II (HTLV-I and II) infection among seroindeterminate cases in Argentina. *J Med Virol*. 2007; 79: 69-73.
9. Morimoto HK, Morimoto AA, Reiche EMV, Ueda LT, Matsuo T, Reiche FV, Caterino-de-Araujo A. Difficulties in the diagnosis of HTLV-2 infection in HIV/AIDS patients from Brazil: Comparative performances of serologic and molecular assays, and detection of HTLV-2b subtype. *Rev Inst Med trop S Paulo*. 2007; 49(4): 225-30.
10. Mangano AM, Remesar M, del Pozo A, Sen L. Human T lymphotropic virus types I and II proviral sequences in Argentinian blood donors with indeterminate Western blot patterns. *J Med Virol*. 2004; 74: 323-7.
11. Jacob F. Levantamento do perfil sorológico de infecção pelos vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos 1 e 2 (HTLV-1 e HTLV-2) em casuística encaminhada ao Instituto Adolfo Lutz de São Paulo para análise. [Dissertação de Mestrado] São Paulo (SP): Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde, 2007. 103 pp.
12. Ministério da Saúde. Portaria nº 34, de jul. 2005. Diário Oficial da União, Brasília, 29 de jul. 2005. Procedimentos seqüenciados para realização do diagnóstico da infecção pelo HIV utilizando-se testes rápidos em indivíduos com idade acima de 18 (dezoito) meses. [Regulamenta o uso de testes rápidos para diagnóstico da infecção pelo HIV em situações especiais].
13. Costa JMP, Segurado AC. Molecular evidence of human T-cell lymphotropic virus types 1 and 2 (HTLV-1 and HTLV-2) infections in HTLV seroindeterminate individuals from São Paulo, Brazil. *J Clin Virol*. 2009; 44: 185-9.
14. Gallego S, Mangano A, Gastaldello R, Sen L, Medeot S. Usefulness of a Nested-Polymerase Chain Reaction for Molecular Diagnosis of Human T-cell Lymphotropic Virus Type I/II. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004; 99(4): 377-80.
15. Gudo ES, Abreu CM, Mussá T, Augusto AR, Otsuki K, Chambo E, Amade N, Tanuri A, Ferreira OC, Jani IL. Serologic and molecular typing of human T-lymphotropic virus among blood donors in Maputo city, Mozambique. *Transfusion*. 2008; 49(6): 1146-50.
16. Casseb J, Penalva-de-Oliveira AC. The pathogenesis of tropical spastic paraparesis/human T-cell leukemia type I-associated myelopathy. *Braz J Med Biol Res*. 2000; 33: 1395-401.
17. Casseb J, Fukumori LMI, Vergara MPP, Sanabani S, Marchiori PE, Duarte AJS, Penalva-de-Oliveira AC. Lack of tax diversity for tropical spastic paraparesis/human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) associated myelopathy development in HTLV-1-infected subjects in São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006; 101(3): 273-6.

Ação ovicida do fungo *Pochonia chlamydosporia* sobre ovos de *Enterobius vermicularis*

Ovicidal activity of *Pochonia chlamydosporia* fungus on *Enterobius vermicularis* eggs

RIALA6/1225

Fabio Ribeiro BRAGA*, André Ricardo e SILVA, Juliana Milani ARAUJO, Sebastião Rodrigo FERREIRA, Jackson Victor de ARAÚJO, Luiza Neme FRASSY

*Endereço para correspondência: Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa. Av. P.H.Rolfs, s/n. CEP 36570-000, Viçosa, MG, Brasil. E-mail: fabioribeirobraga@hotmail.com
Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.
Recebido: 29.07.2009 – Aceito para publicação: 28.08.2009

RESUMO

A capacidade ovicida de dois isolados do fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia* (VC1 e VC4) sobre ovos de *Enterobius vermicularis* foram analisadas e comparadas em meio agar-água 2% (AA2%). Os ovos de *E. vermicularis* foram vertidos para placas de Petri com AA2% contendo os isolados fúngicos crescidos e em placas de Petri sem fungo como controle. Ao completarem 5 e 10 dias de incubação, cem ovos foram removidos e classificados de acordo com os seguintes parâmetros: efeito do tipo 1, efeito fisiológico e bioquímico sem prejuízo morfológico à casca do ovo; efeito do tipo 2, efeito lítico com alteração morfológica da casca e embrião; e efeito do tipo 3, efeito lítico com alteração morfológica do embrião e da casca, além de penetração de hifas e colonização interna do ovo. Os isolados fúngicos eficientes na destruição de ovos de *E. vermicularis*, apresentando o efeito do tipo 3 nos 5 e 10 dias de interação ($p > 0,01$). Foi demonstrada a propriedade dos isolados de *P. chlamydosporia* (VC1 e VC4) em atuar de forma negativa sobre os ovos de *E. vermicularis* e, portanto, ser considerado um potencial candidato como produto a ser utilizado no controle biológico desse nematóide.

Palavras-chave. controle biológico, *Enterobius vermicularis*, fungos nematófagos, *Pochonia chlamydosporia*.

ABSTRACT

The present study compared the ovicidal capacity of two isolates from nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* (VC1 and VC4) on *Enterobius vermicularis* eggs using 2% water-agar (2% WA). *E. vermicularis* eggs were plated on 2% WA Petri dishes containing cultured fungal isolates, and on control plates without fungi. After incubating for 5 and 10 days, 100 eggs were removed and classified according to the following parameters: type 1, biochemical and physiological effect without eggshell morphological damage; type 2, lytic effect with morphological alteration on eggshell and embryo; and type 3, lytic effect with morphological alteration on both eggshell and embryo, in addition to hyphal penetration and internal egg colonization. The fungal isolates were effective in causing complete damage on *E. vermicularis* eggs showing the type 3 effect at 5 and 10 days after being in contact with fungus ($p > 0.01$). Therefore, the *P. chlamydosporia* (VC1 and VC4) isolates negatively influenced on *E. vermicularis* eggs, and this fungus might be considered a potential candidate for being a biological control of nematodes.

Key words. biological control, *Enterobius vermicularis*, nematophagous fungi, *Pochonia chlamydosporia*.

INTRODUÇÃO

Enterobius vermicularis, causador da enterobíase ou oxiúriase, infecção parasitária intestinal cosmopolita, é um nematóide bem frequente em crianças com idade escolar. É um habitante comum da porção terminal do intestino delgado (ceco), onde as fêmeas são fecundadas e, quando grávidas, acumulam cerca de 10.000 ovos em seu interior^{1,2}. Uma vez fecundada, a fêmea migra para a região perianal onde deposita seus ovos e em seguida morre dessecada e pela atrofia dos órgãos internos devido a grande dilatação uterina³. Os ovos, quando mantidos a temperatura e umidade favoráveis tornam-se infectantes em aproximadamente seis horas e permanecem viáveis por várias semanas. Estes são brancos, transparentes e com dupla membrana. Medem aproximadamente 50 a 60µm de largura por 20 a 30µm de comprimento, são resistentes aos desinfetantes comerciais e podem sobreviver em ambientes domiciliares por duas a três semanas.

Cimerman et al.⁴ mencionam que, *E. vermicularis* é o parasito de maior poder de infecção, pois seus ovos necessitam de poucas horas para se tornarem infectantes. O tratamento desta parasitose deve ser estendido a todos os indivíduos que residem em uma mesma residência. Por outro lado, a descontaminação ambiental é outro fator que deve ser levado em consideração juntamente com o tratamento, uma vez que a sua transmissão pode ocorrer pela inalação de poeira mesmo pela ingestão dos ovos do parasito^{5,6}.

Nesse contexto, algumas medidas alternativas que possam ser empregadas no combate à disseminação ambiental, deste, e de outros parasitos gastrintestinais e suas formas infectantes são bem vindas⁷. Entre essas medidas está o controle biológico com os fungos nematófagos. Esses fungos são cosmopolitas e inofensivos aos seres humanos e aos animais, são conhecidos como antagonistas de helmintos e algumas espécies podem ser utilizadas como potenciais agentes de controle de ovos de helmintos presentes no ambiente⁸. Dentre esses fungos destaca-se a espécie *P. chlamydosporia* considerada ovicida, pois apresenta colonização interna dos ovos parasitados e por consequência seu rompimento levando a sua destruição^{9,10}.

Esse estudo procurou avaliar a atividade ovicida do fungo *P. chlamydosporia* sobre ovos de *E. vermicularis*.

Os isolados VC1 e VC4 do fungo nematófago *P. chlamydosporia* foram mantidos em tubos de ensaio a 4°C contendo corn-meal-ágar 2% e no escuro durante

10 dias. Esses isolados estavam previamente armazenados no Laboratório de Parasitologia do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Após o crescimento, discos de cultura de 4mm de diâmetro foram transferidos para placas de Petri de 9cm diâmetro contendo 20mL de ágar-água 2% (AA 2%) e incubados, à temperatura de 26°C durante 10 dias.

Os ovos de *E. vermicularis* foram conseguidos por meio de doação de um laboratório particular de análises clínicas na região de Viçosa, MG e, analisados morfológicamente quanto a sua integridade ao microscópio óptico em objetiva de 10x.

Os ovos foram vertidos sobre a superfície de placas de Petri contendo o meio AA 2% com os isolados fúngicos crescidos por 10 dias e sem fungo como controle, sendo feitas 10 repetições para cada grupo. Cada placa continha mil ovos de *E. vermicularis* com apenas um dos isolados fúngicos. Ao final de 5 e 10 dias, aproximadamente cem ovos foram retirados de cada placa contendo os isolados do fungo e do controle (sem fungo) de acordo com a técnica descrita por Araújo et al.¹¹ e foram avaliados em objetiva de 40x de acordo com os parâmetros estabelecidos por Lysek et al.¹²: efeito do tipo 1, efeito fisiológico e bioquímico sem prejuízo morfológico à casca do ovo; efeito do tipo 2, efeito lítico com alteração morfológica da casca e embrião; e efeito do tipo 3, efeito lítico com alteração morfológica do embrião e da casca, além de penetração de hifas e colonização interna do ovo. Os dados obtidos do intervalo estudado foram submetidos ao teste não paramétrico de Friedman com 1% de probabilidade.

Os resultados percentuais para os efeitos dos tipos 1, 2 e 3 aos 5 e 10 dias de interação dos isolados do fungo *P. chlamydosporia* com os ovos de *E. vermicularis* estão representados na Tabela 1. A análise dos dados revelou diferença ($P < 0,05$) para os efeitos dos tipos 1, 2 e 3 apresentados por *P. chlamydosporia* em relação ao grupo controle. Por meio da microscopia de óptica, objetiva de 40x, foram observadas estruturas vegetativas (hifas) desse fungo colonizando os ovos de *E. vermicularis* e, posteriormente, o seu rompimento (Figuras 1A; B), e com isso caracterizando o efeito do tipo 3^{12,9}.

As espécies de fungos ovicidas têm sido utilizadas com sucesso no controle *in vitro* de ovos de helmintos parasitos gastrintestinais de animais. Contudo, existe uma carência de trabalhos que possam comprovar a eficácia desses fungos sobre ovos de helmintos parasitos

gastrintestinais de seres humanos^{8,13}. A literatura tem sugerido que fungos nematófagos ovicidas são potenciais agentes de controle biológico de geohelmintos e, sendo assim, esses fungos têm sido utilizados em condições laboratoriais com sucesso sobre ovos de helmintos¹⁴.

Braga et al.⁸ demonstraram a eficácia de isolados VC1 e VC4 do fungo *P. chlamydosporia* sobre ovos de *Ascaris lumbricoides*, nematóide gastrointestinal comum

de seres humanos, nos intervalos de sete, 10 e 14 dias, encontrando percentuais para a atividade ovicida, efeito do tipo 3, acima de 26% ao final do experimento para ambos os isolados testados. Em outro trabalho, Braga et al.¹³ demonstraram a ação de *P. chlamydosporia* sobre ovos de *Schistosoma mansoni* registrando resultados percentuais ao final de vinte e um dias para o efeito do tipo 3 de 25,6%.

Tabela 1. Percentuais da atividade ovicida do fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia* (VC1 e VC4) e o grupo controle sem fungos sobre ovos de *Enterobius vermicularis* nos intervalos de cinco e 10 dias de interação.

Isolados	Efeito aos cinco dias		
	Efeito do Tipo 1*	Efeito do Tipo 2**	Efeito do Tipo 3***
VC1	37,28 ^A ± 15,0	23,4 ^A ± 8,3	35,0 ^A ± 11,0
VC4	36,0 ^A ± 14,0	25,1 ^A ± 8,4	33,6 ^A ± 11,7
Controle	0 ^B ± 0	0 ^B ± 0	0 ^B ± 0
Isolados	Efeito aos 10 dias		
	Efeito do Tipo 1*	Efeito do Tipo 2**	Efeito do Tipo 3***
VC 1	28,4 ^A ± 16,8	24,9 ^A ± 9,7	40,0 ^A ± 16,2
VC 4	31,9 ^A ± 13,8	25,7 ^A ± 9,8	38,0 ^A ± 11,3
Controle	0 ^B ± 0	0 ^B ± 0	0 ^B ± 0

Percentuais seguidos de mesma letra maiúscula nas colunas não diferem estatisticamente (P>0,01)-teste de Friedman.

* Efeito do tipo 1, efeito fisiológico e bioquímico sem prejuízo morfológico à casca do ovo;

** Efeito do tipo 2, efeito lítico com alteração morfológica da casca e embrião;

*** Efeito do tipo 3, efeito lítico com alteração morfológica do embrião e da casca, além de penetração de hifas e colonização interna do ovo

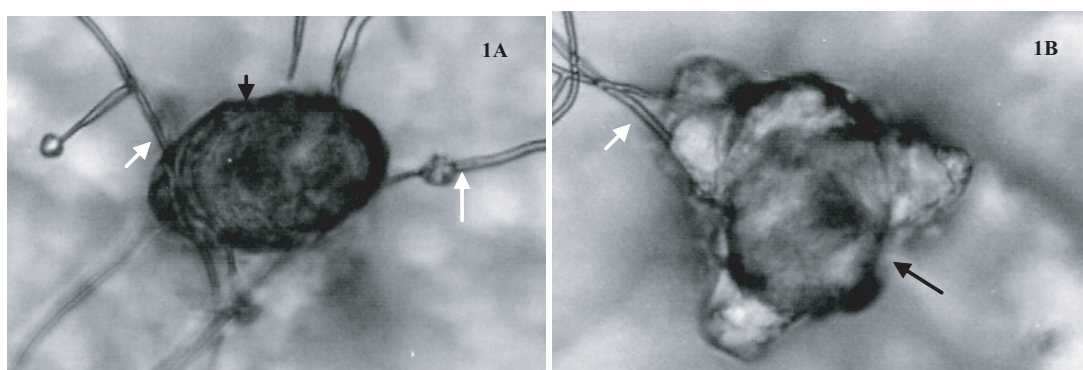


Figura 1. A - Hifas de *Pochonia chlamydosporia* (seta branca) colonizando o ovo de *Enterobius vermicularis* (seta preta); B - Destruição do ovo do nematóide pelo fungo aos 10 dias de interação (Microscopia óptica com aumento de 40x).

Recentemente, Braga et al.¹⁴ observaram a atividade ovicida de *Paecilomyces lilacinus*, sobre ovos de *Taenia saginata*, com percentuais para o efeito do tipo 3 de 25,5% ao final de 10 dias. Segundo Lysek⁹ um fungo é considerado ovicida se apresentar sobre os ovos parasitados o efeito do tipo 3.

Comparando os resultados obtidos no presente trabalho com os resultados registrados por Braga et al.^{8,13} nota-se semelhança no modo de ação dos isolados VC1 e VC4 do fungo *P. chlamydosporia* sobre ovos de *E. vermicularis*, uma vez que, houve a observação do efeito do tipo 3 de 40,0% e 38,0% respectivamente, ao final de 10 dias. Os autores sugerem que qualquer um dos isolados desse fungo poderia ser utilizado com sucesso na destruição de ovos de helmintos parasitos gastrintestinais. Contudo, segundo O'Hara e Jatala¹⁵ a frequência e o sucesso da penetração em ovos por fungos são aparentemente dependentes da composição da cutícula do ovo e no caso específico de ovos de *E. vermicularis*, que apresenta dupla membrana e são muito resistente, a eficácia de penetração ovicida pode ser dificultada. Por outro lado, a penetração de *P. chlamydosporia* nos ovos desse nematóide foi comprovada no presente trabalho. Esse fungo poderia ser utilizado como uma ferramenta para auxiliar no combate à disseminação ambiental, deste, e de outros parasitos gastrintestinais, uma vez que, pode diminuir a presença dos ovos de helmintos gastrintestinais e por consequência a descontaminação ambiental^{7,8,13}.

AGRADECIMENTOS

À Capes e ao CNPq pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Lee SC, Hwang KP, Tsai WS, Lin CY, Lee N. Detection of *Enterobius vermicularis* eggs in the submucosa of the transverse colon of a man presenting with colon carcinoma. *Am J Trop Med Hyg*. 2002; 67(5): 546-8.
2. Borquez C, Lobato I, Montalvo MT, Marchant P, Martinez P. Enteroparasitosis in schoolchildren of Illuta valley, Arica, Chile. *Parasitol Latinoam*. 2004; 59(3-4):175-8.
3. Rey L. Bases da Parasitologia Médica 2nd ed. (RJ): Guanabara Koogan, 2001.
4. Cimerman B, Cimerman S. Enterobíase. *Parasitologia Humana e seus Fundamentos Gerais*. 2nd ed (RJ): Atheneu, 2001.
5. Cimerman S, Cimerman B. Enterobiasis. *Rev Panamericana Infectol*. 2005; 7(3):27-30.
6. Botero D, Restrepo M. Parasitosis intestinales por ne-matodos. En: *Parasitosis Humanas*. 3rd ed. Corporación para Investigaciones Biológicas. Medellín, 1998.
7. Araújo JV, Mota MA, Campos AK. Controle biológico de helmintos parasitos de animais por fungos nematófagos. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2004; 13(1):165-70.
8. 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 Trop*. 2007; 40(3):356-8.
9. Lysek H. Classification of ovicide fungi according to type of ovicidity. *Acta Univ Palack Olomue*. 1976; 76(1):9-13.
10. Fieldler ZA, Sosnowska D. Nematophagous fungus *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson is also a biological agent for control of greenhouse insects and mite pests. *Biol Control*. 2007; 52(4):547-58.
11. Araújo JV, Santos MA, Ferraz S. Efeito ovicida de fungos nematófagos sobre ovos embrionados de *Toxocara canis*. *Arq Bras Med Vet Zoot*. 1995; 47(1):37-42.
12. Lysek H, Fassatióvá O, Pineda NC, Hernández N, Lorenzo. Ovicidal fungi in soils of Cuba. *Folia Parasitol* 1982; 29(3):265-70.
13. Braga FR, Araújo JV, Campos AK, Araujo JM, Silva AR, Carvalho RO, Correa 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 Microb Biotechnol*. 2008; 24(11):2713-16.
14. Braga FR, Araújo JV, Araujo JM, Carvalho RO, Silva AR. Efeito do fungo *Paecilomyces lilacinus* sobre ovos de *Taenia saginata*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008; 41(6): 686-8.
15. O'Hara CM, Jatala P. Ultrastructure of *Meloydogine*, *Globodera* and *Nacobus* eggs shells as related to the activities of biocontrol fungi. *J Nematol*. 1985; 17(1):508.

Evaluation of fatty acid lipid extraction methods in human plasma

Morais, DR. **Avaliação de métodos de extração lipídica em plasma humano.** Maringá, PR. 2009. [Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-graduação em Química – Universidade Estadual de Maringá – UEM – Maringá]. Orientador: Dr. Jesuí Vergílio Visentainer.

The most difficult step in the fatty acid (FA) analysis is the extraction of lipids, which it may interfere in the final answer of the analysis. Determination of fatty acids and their concentrations in biological samples has been performed, due to the different consequences of the FA in the organism. The aim of this work was to present a new methodology of total lipid extraction using microwave; to evaluate the efficiency of total lipid extraction by different methods in human plasma and to analyze its fatty acid composition. The used methods were: Folch, Lees and Stanley (FLS), Bligh and Dyer (BD), Rose-Gottlieb (RG) and Alternative Method (AM). The FLS method is the most used one in the lipid analyses for plasma. That method and BD are cold methods that use chloroform and methanol for lipid extraction. In RG method it is used a basic way and the ether of petroleum and ethyl ether solvents; and the AM uses microwaves and the ethanol and ether of petroleum solvents. The sample of human plasma, 450 mL, was obtained from Hemocentro Regional de Maringá of the Universidade Estadual de Maringá. In relation to human plasma composition the percentage obtained was: moisture, $92.23 \pm 0.08\%$; ashes, $0.63 \pm 0.11\%$; protein, $6.04 \pm 0.58\%$; and the total lipid contents varied between 0.19 and 0.41. The greatest total lipid contents results were obtained by the FLS, MA and RG methods, statistically equal among themselves ($p > 0.05$) but different to BD ($p < 0.05$). The Gerber method could not extract lipids from the human plasma. Through the validation parameters for lipids extraction, accuracy and recovery, the AM and Folch *et al.* (1957) methods were more accuracy and presented percentile of satisfactory recovery. 24 FA were identified and the biggest concentrations were obtained ($p < 0.05$) by the Folch, followed by the AM, Bligh and Dyer and Rose-Gottlieb. This study showed that Folch was the most recommended method for studies of quantitative fatty acid composition in human plasma and indicated the AM method, using microwave and lower toxicity solvents, as a fast technique of lipidic extraction which it might be used on qualitative fatty acid composition analysis.

Dissertação disponível na Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR.
E-mail: damilarodriguesdemorais@bol.com.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://bvsmodeo.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: 4ª 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&proj=sabesp&pub=T&db=&doc>].
- 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.

ISSN 0073-9855



9 770073 985009